



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



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCEN

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

THÈSE De Doctorat

En vue de l'obtention du grade de :

Docteur

Spécialité : Chimie bio-organique et thérapeutique

Présenté Par :

MERAD Nadjiya

Sur le thème

Caractérisation chimique et transformation synthétique et hémisynthétique des composés volatils de trois espèces de la famille des *Apiaceae* : *Smyrniolus atrum*, *Daucus crinitus* et *Eryngium triquetrum*

Soutenue le **05/01/2022** à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr. Zoheir ARRAR	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr. Mourad BENDAHOU	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr. Khodir MADANI	Professeur	Université de Bejaïa, CRTAA	Examineur
Mr. Chaouki SELLES	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr. Cédric BERTRAND	Professeur	Université de Perpignan	Examineur
Mr. David DUVAL	Professeur	Université de Perpignan	Examineur
Mr. Nassim DJABOU	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse

*Laboratoire de chimie organique, substance naturelle et analyse (COSNA)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

Je dédie ce travail à

A mes chers parents

A mon mari

A mes sœurs LAZOUNI Imène et MAMI Imène

A ma chère tante BENYAROU Meriem

A la mémoire de mes grands parents

A mes chères cousines Bouchra et Imène

Avant- propos

Tout d'abord je remercie Dieu tout puissant de m'avoir accordée toute la force, la patience, la foi et la bonne conduite pour mener à bien ce travail

Je voudrais remercier les membres du jury ; Mr. Zoheir ARRAR, Mr. Mourad BENDAHOU, Mr. Khodir MADANI, Mr. Chaouki SELLES, Mr. Cédric BERTRAND, Mr. David DUVAL et Mr. Nassim DJABOU d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être rapporteurs. La version finale de ce mémoire a bénéficié de leur lecture très attentive et de leurs remarques précieuses. Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

Ce projet de thèse est le fruit d'une collaboration interuniversitaire entre l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen et l'université Via-domitia de Perpignan au Centre de Recherches Insulaires et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE). Le développement de cette thèse a été dirigée conjointement par le Professeur Cédric BERTRAND du centre CRIOBE et le Professeur Nassim DJABOU du laboratoire COSNA. La préparation des huiles essentielles fut effectuée au laboratoire COSNA et LASNABIO. Tandis que le fractionnement, l'analyse, et l'évaluation des activités biologiques furent effectués au laboratoire CRIOBE.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude et mon profond respect pour le Professeur Cédric BERTRAND, qui m'a encadré, aidé tout au long de mon stage scientifique. Il a été toujours présent, patient et à l'écoute. J'ai été durablement marqué par nos discussions scientifiques et universitaires. Monsieur, à votre personne aimable, honnête et humaine j'adresse mon amitié et ma profonde reconnaissance.

Je remercie très sincèrement le Professeur Nassim DJABOU, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour son dévouement exemplaire et leur encadrement sans faille que pour son recommandation et son avis judicieux durant nos séances de travail.

Je remercie chaleureusement l'ancien directeur de laboratoire COSNA Pr Joseph KAJIMA pour sa disponibilité ensuite le directeur Pr Zoheir ARRAR, je souhaite lui adresser toute ma gratitude.

Je tiens à remercier chaleureusement le directeur de laboratoire LASNABIO Pr Said GHALEM, ainsi que le chef d'équipe des huiles essentielles le Pr Boufeldja TABTI, Pr Houcine ALLALI qui m'ont aider à accélérer mes extractions, et à tous les membres du laboratoire pour toute l'aide qui m'ont apporté durant cette période en particulier la technicienne KHEIRA qui m'a beaucoup soutenue et aider.

Je veux remercier chaleureusement pour leur précieuse collaboration: le Professeur Mourad BENDAHOU Directeur du laboratoire LAMAABE (laboratoire Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédicale et l'environnement) université de Tlemcen, pour son aide à la réalisation des activités antimicrobiennes des huiles essentielles.

Mes profonds remerciements à mon collègue Ali MEDBOUHI qui m'a beaucoup aidé, soutenu, écouté. Je lui souhaite une bonne continuation dans le domaine professionnel.

J'adresse des remerciements spéciaux à toute l'équipe de laboratoire CRIOBE qui ont contribué dans ce projet en commençant par les enseignants-chercheurs ; Nicolas INGUIMBERT qui m'a donné la chance à travailler dans son laboratoire de synthèse et je lui remercie aussi pour sa confiance, je remercie aussi Nathalie et Ilisabeth, étaient toujours disponible pour répondre à mes problème et je ne peux oublier à remercier chaleureusement Marie virginie SALVIA qui m'a soutenue, aidé, dirigé, écouté durant tout mon séjour à perpignan. Les doctorants ; je tiens à remercier Slimane CHAIB pour son aide et en même temps pour son encadrement dans une partie des activités biologiques, je remercie aussi mathieu LAZARUS, Hikmat GHOSSEON, Chandrashekhar, Mélina pour leurs disponibilités et leurs aides. Un remerciement particulier au Docteur Mahammadou DJIBO qui m'a encadré et m'a appris beaucoup de chose dans la synthèse organique, je lui remercie pour son soutiens, sa

patience et son aide. Je veux exprimer toute ma reconnaissance et mon amitié à la technicienne Delphine RAVIGLIONE pour son effort à régler les problèmes de la salle analytique et sa disponibilité. Je remercie la secrétaire Marie-Louise Mascunano pour son accueil et son aide à régler les documents d'intégration. Je tiens à remercier toute l'équipe AKINAO, Vanessa ANDREU pour son encadrement dans tous les tests biologiques qui sont déroulés au sein de laboratoire. Je remercie Anais AMIOT pour son aide et sa disponibilité, je remercie aussi Annabelle SIMON, Christian, Jule.

Un grand remerciement au Professeur David DUVAL et toute l'équipe de laboratoire l'IHPE, université de Perpignan qui ont contribué dans ce projet, un remerciement chaleureux au Professeur Azucéna GONZALEZ COLOMA de l'institut scientifique de l'agriculture (ICA), Madrid pour son aide, sa gentillesse et sa collaboration dans ce projet.

Ce travail a bénéficié d'un financement, d'une part du Ministère de l'Europe et des Affaires Etrangères sous la forme d'une bourse d'excellence EMIC gérée par CampusFrance et d'autre part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique d'Algérie, auxquels j'adresse mes chaleureux remerciements. Ces financements, origine de conditions les plus favorables de travail, de tranquillité et de sérénité, ont permis une avancée rapide et un aboutissement de ce Doctorat. Un grand remerciement à la personne qui m'a accueilli, aidé, conseillée Gisel CANAL, elle était une personne d'un cœur en or.

Cette thèse était une belle expérience personnelle qui m'a permis de me mieux me connaître. Pendant ces cinq années des personnes de mon entourage se sont impliquées par un soutien actif, réconfortant et stimulant. A vous, mes parents, je vous remercie d'être toujours là pour moi, de m'avoir encouragé et soutenue, je suis fière d'être votre fille. A toi ma chère tante Meriem BENYAROU, un remerciement profondément pour son aide, sa présence durant tout mon parcours universitaire. A toi mon mari, merci d'être toujours à mes côtés.

Listes des figures

Figure 1. Appareil végétatif des Apiaceae.....	8
Figure 2. Coupe florale, ombelle simple et ombelle composée des Apiaceae.....	8
Figure 3. Fruits des Apiaceae.....	9
Figure 4. Quelques principaux actifs des huiles essentielles de la famille des Apiaceae.....	11
Figure 5. Feuilles et fleurs de <i>Smyrniolus satrum</i>	12
Figure 6. Structure du furanoérmophil-1-one.....	18
Figure 7. Les ombelles du genre <i>Daucus</i>	19
Figure 8. Les composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>D. crinitus</i>	22
Figure 9. <i>Eryngium triquetrum</i>	24
Figure 10. Les composés majoritaires de l'huile d' <i>E. triquetrum</i> d'Italie.....	25
Figure 11. Les composés majoritaires de l'huile essentielle d' <i>E. triquetrum</i> de l'Algérie.....	26
Figure 12. Les composés majoritaires présentent dans l'extrait d'acétate d' <i>E. triquetrum</i>	26
Figure 13. Identification des constituants d'une huile essentielle et d'une fraction volatile concentrée par MEPS, par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.....	43
Figure 14. Méthodes d'analyses complémentaires des constituants d'une huile essentielle....	44
Figure 15. Structures des composés majoritaires de l'huile essentielle d' <i>E. triquetrum</i>	66
Figure 16. Chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>E. triquetrum</i>	66
Figure 17. Structures des composés de différentes fractions d' <i>E. triquetrum</i>	70
Figure 18. Chromatogramme de falcarinol pur.....	72
Figure 19. Chromatogramme de l'extrait d' <i>E. triquetrum</i> par la méthode des ultra-sons.....	73
Figure 20. Chromatogramme de l'extrait d' <i>E. triquetrum</i> par la méthode de macération....	74
Figure 21. Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>S. olusatrum</i>	76
Figure 22. Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>S. olusatrum</i>	79
Figure 23. Structures des composés de différentes fractions de <i>S. olusatrum</i>	80
Figure 24. Chromatogramme de la fraction B1 de <i>S. olusatrum</i>	81
Figure 25. Chromatogramme de la fraction B2 de <i>S. olusatrum</i>	81
Figure 26. Chromatogramme de la fraction E de <i>S. olusatrum</i>	82
Figure 27. Chromatogramme de furanoérmophilone pur.....	83
Figure 28. Chromatogramme de l'extrait <i>S. olusatrum</i> par ultra-son.....	84
Figure 29. Chromatogramme de l'extrait <i>S. olusatrum</i> par macération.....	85
Figure 30. Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>S. olusatrum</i> oxydée.....	86
Figure 31. Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>D. crinitus</i> partie racine.....	88

Figure 32. Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>D. crinitus</i> partie aérienne.....	89
Figure 33. Structures des composés majoritaires des huiles essentielles de <i>D. crinitus</i> (racine, aérienne).....	89
Figure 34. Chromatogramme de fractionnement de l'huile de <i>D. crinitus</i> (racine) par flashchromatographie.....	94
Figure 35. Chromatogramme de la fraction 1 de <i>D. crinitus</i> partie racine.....	95
Figure 36. Structures des composés de différentes fractions de <i>D. crinitus</i> (racine).....	95
Figure 37. Chromatogramme de la fraction 2 de <i>D. crinitus</i> partie racine.....	96
Figure 38. Chromatogramme de la fraction 3 de <i>D. crinitus</i> partie racine.....	97
Figure 39. Chromatogramme de la fraction 4 de <i>D. crinitus</i> partie racine.....	97
Figure 40. Chromatogramme de dodécyle acétate pur.....	98
Figure 41. Spectre RMN 1H de produit 2 protection.....	101
Figure 42. Spectre RMN 13C de produit 2 protection.....	102
Figure 43. Spectre RMN 1H de produit 9 couplage.....	106
Figure 44. Spectre RMN 13C de produit 9 couplage.....	106
Figure 45. Spectre RMN 1H de produit 4 déprotection.....	109
Figure 46. Spectre RMN 13C de produit 4 déprotection.....	110
Figure 47. Chromatogramme de l'isochavicol.....	110
Figure 48. Chromatogramme de la flash chromatographique.....	114
Figure 49. Spectre RMN 1H du produit final.. ..	115
Figure 50. Spectre RMN 13C du produit final.....	116
Figure 51. Chromatogramme de composé synthétisé isochavicol isobutyrate.....	117
Figure 52. Test anti-germinatif des huiles essentielles.....	125
Figure 53 Test des thylakoides des huiles essentielles.....	129
Figure 54. Traitement des plantes avec l'huile de <i>D. crinitus</i> partie racine et aérienne.....	132
Figure 55. Traitement des plantes avec l'huile de <i>S. olusatrum</i> et <i>E. triquetrum</i>	133
Figure 56. Traitement des plantes avec le falcarinol et le furanoérmophilone.....	134
Figure 57. Test d'écotoxicologie des huiles essentielles.....	134
Figure 58. Maladies causées par les phytopathogène.....	137
Figure 59. Test antifongique des huiles essentielles.....	142
Figure 60. Les insectes ravageurs des plantes.....	145
Figure 61. Test moulliscide.....	149
Figure 62. Taux de mortalité de <i>Biomphalaria</i> à différentes concentrations d'huile d'Er....	152
Figure 63. Effet de l'huile Er chez les escargots infectés par <i>schistosoma mansoni</i>	152

Figure 64. L'exposition des œufs et embryons de <i>biomphalaria</i> à l'huile Er.....	153
Figure 65. Mortalité des larves nageant librement de <i>Schistosoma</i> exposé à l'huile d'Er.....	154
Figure 66. Observation de l'activité parasiticide sur les miracidies.....	154
Figure 67. Effet de l'huile d'Er sur l'infectivité de <i>Schistosoma</i>	155

Liste des tableaux

Tableau 1. La composition chimique de l'huile essentielle d' <i>E. triquetrum</i>	67
Tableau 2. La composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. olusatrum</i>	77
Tableau 3. La composition chimique des huiles essentielles de <i>D. crinitus</i> (racine et aérienne).....	90
Tableau 4. Les valeurs de la densité des quatre huiles essentielles.....	117
Tableau 5. L'activité anti-radicalaires des huiles essentielles étudiées sur DPPH	120
Tableau 6. Résultats de l'activité microbienne des huiles essentielles par la méthode de disque.....	122
Tableau 7. Résultats de l'activité microbienne des huiles essentielles par la méthode des CMI.....	123
Tableau 8. Résultats de test anti-germinatif des huiles essentielles et le dodécyle acétate.....	126
Tableau 9. Résultats de test anti-germinatif des hydrolats extrait DCM d' <i>E. triquetrum</i>	127
Tableau 10. Résultats de test thylakoides des huiles essentielles et les composés majoritaires.....	130
Tableau 11. Résultats de test thylakoides des fractions d'huile et l'extrait DCM Er.....	130
Tableau 12. Résultats d'essai de croissance sur les grains de Cresson des huiles essentielles.....	133
Tableau 13. Résultats de test écotoxicologie des huiles essentielles et les composés majoritaires.....	136
Tableau 14. Résultats de test écotoxicologie des fractions d'huile essentielle.....	136
Tableau 15. Résultats de test antibactérien des extraits aux solvants.....	138
Tableau 16. Résultats de test antibactérien des huiles essentielles.....	139
Tableau 17. Résultats de test antibactérien des fractions d'huile essentielle.....	140
Tableau 18. Test antifongique des huiles essentielles par la méthode de contact.....	144
Tableau 19. Test antifongique des huiles essentielles par la méthode de fumigation.....	144
Tableau 20. Résultats de l'activité insecticide des huiles essentielles et composés majoritaires.....	147

Tableau 21. Résultats de l'activité insecticide des huiles essentielles et composés majoritaires contre les tiques.....	148
Tableau 22. Résultats de l'activité nématocide des huiles essentielles et composés majoritaires.....	148
Tableau 23. Résultats de l'activité molluscicide des huiles essentielles.....	150

Liste des schémas

Schéma 1. Réarrangement de cope de l'isofuranodiène.....	15
Schéma 2. Réarrangement du germacrone.....	15
Schéma 3. Courte synthèse de falcarinol.....	29
Schéma 4. La photoréduction catalytique du colorant rédox.....	54
Schéma 5. Réarrangement de Cope.....	76
Schéma 6. La rétrosynthèse de l'isochavicol isobutyrate.....	99
Schéma 7. Synthèse de l'isochavicol isobutyrate.....	99
Schéma 8. La protection de 4-bromophénol par le méthyleméthoxy éther.....	100
Schéma 9. Le mécanisme réactionnel de la protection du 4-bromophénol.....	101
Schéma 10. Couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura avec différentes conditions opératoires.....	103
Schéma 11. Mécanisme réactionnel de couplage de Suzuki-Miyaura.....	105
Schéma 12. La déprotection du groupement méthylméthoxy éther avec différentes conditions.....	108
Schéma 13. Mécanisme de la déprotection du groupement méthylméthoxy.....	109
Schéma 14. Réaction d'estérification de l'isochavicol.....	112
Schéma 15. Mécanisme réactionnel de la réaction d'estérification.....	113
Schéma 16. Protection du composé 1.....	170
Schéma 17. Couplage de Suzuki-Miyaura.....	172
Schéma 18. Réaction de déprotection.....	173
Schéma 19. Réaction d'estérification.....	175

Liste des abréviations

^{13}C	Carbone-13
^1H	Proton
COSNA	Chimie organique substance naturelle et analyse
LASNABIO	Laboratoire des Sciences Naturelles et Bioactives
CRIOBE	Centre de recherche insulaire et observatoire de l'environnement
IHPE	Intéraction hôte-pathogène et environnement
ICA	Institut scientifique de l'agriculture
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl_3	Chloroforme deutéré
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
OMS	Organisation mondiale de la santé
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CPG-DIF	Chromatographie en phase gazeuse à détecteur à ionisation de flamme
DI	Diamètre d'inhibition
DL_{50}	Dose Létale médiane
MFC	Concentration fongicide minimale
MEC	Concentration efficace minimale
DMSO	Diméthylsulfoxyde
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse
IC	Impact chimique
IC_{50}	Concentration nécessaire à 50 % d'inhibition
IE	Impact électronique
IK	Indice de Kovalts
Ir	Indice de rétention
IR	Infra-rouge
J	Constante de couplage (NMR)
DPPH	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
IFD	Isofuranodiène
m/z	Rapport masse sur charge
ABT	Antibiotique
MHz	Mégahertz
NIST	National Institute of Standards and Technology
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
ppm	Partie par million
FaOH	Falcarinol
RMN	Résonance nucléaire magnétique
Tr	Temps de rétention
UV	Ultra-violet
δc	Déplacement chimique du carbone-13
δH	Déplacement chimique du proton
Rf	Ratio frontal

Sommaire

Introduction	1
Partie A / Etude bibliographique	6
I- Etude bibliographique de la famille des Apiaceae et les trois espèces	7
1. Famille des <i>Apiaceae</i>	7
1.1. Classification des <i>Apiacées</i> dans le système botanique.....	7
1.2. Caractérisation des <i>Apiacées</i>	7
1.3. La composition chimique des huiles essentielles de la famille des <i>Apiaceae</i>	10
1.4. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des <i>Apiaceae</i>	11
2. L'espèce <i>Smyrniololus</i>	12
2.1. Définition de l'espèce.....	12
2.2. La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Smyrniololus</i>	13
2.3. L'intérêt thérapeutique de l'huile essentielle de <i>Smyrniololus</i> et ces composés majoritaires.....	16
2.3.1 L'intérêt thérapeutique de l'huile essentielle de <i>S. Olusatrum</i>	16
2.3.2 L'intérêt thérapeutique de l'isofuranodiène.....	16
2.3.3 L'intérêt thérapeutique de furanocoumarone.....	18
2.3.4 L'intérêt thérapeutique de Curcumène.....	18
3. L'espèce <i>Daucus Crinitus</i>	19
3.1. Définition de l'espèce.....	19
3.2. La composition chimique de l'huile essentielle et les extraits aux solvants de <i>Daucus crinitus</i>	20
3.3. Propriétés biologiques des huiles essentielles et les extraits aux solvants de <i>D. crinitus</i>	22
3.4. Propriétés biologiques des composés majoritaires de <i>D. crinitus</i>	22
4. L'espèce <i>Eryngium triquetrum</i>	23
4.1. Définition de l'espèce.....	23
4.2. La composition chimique des huiles essentielles et des extraits de l' <i>E. triquetrum</i>	25
4.3. Les propriétés biologiques des huiles essentielles et les extraits d' <i>E. triquetrum</i> et le Falcarinol.....	27
4.3.1. Les propriétés biologiques des huiles essentielles et les extraits d' <i>E. triquetrum</i>	27
4.3.2. Les propriétés biologiques du falcarinol.....	28

II. Préparation et analyse des huiles essentielles.....	29
II.1.L'échantillonnage de la matériel végétale.....	31
II.2.Préparation des huiles essentielles.....	31
II.2.1.L'hydrodistillation.....	31
II.2.2.Expression à froid.....	32
II.2.3.Technique d'extraction au CO ₂ supercritique.....	32
II.2.4.L'extraction assistée par micro-ondes.....	33
II.3.L'analyse des huiles essentielles.....	34
II.3.1.Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	35
II.3.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM).....	36
II.3.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	39
II.4.Séparation des constituants préalablement à leur identification.....	40
III. Méthodologie d'analyse pour l'identification des constituants volatils d'un mélange complexe.....	41
IV. Activité biologique.....	44
IV.1.Activité antioxydante.....	45
a)- La méthode par le radical DPPH.....	46
b)- Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	46
c)- Réduction du fer (FRAP)	47
IV.2.Activité antibactérienne.....	47
IV.2.1.Activité antibactérienne contre les souches pathogènes.....	47
a-Méthode de diffusion sur gel.....	47
b-Méthode de dilution en milieu liquide.....	48
IV.2.2.Activitéantibactérienne contre les souches phytopathogènes.....	48
IV.3.Activité antifongique.....	50
a-Méthode de fumigation.....	50
b-Méthode de contact.....	50
IV.4.Activité herbicide.....	52
a-Activité anti-germinatif.....	53
b-Activité thylakoïdes.....	53
IV.5.Activité écotoxicologie.....	54
IV.6.Activité insecticide.....	55
IV.7.Activité molluscicide.....	58
V. Problématique de recherche.....	61

Partie B / Etude chimique.....	64
A.Huiles essentielles d’<i>Eryngium triquetrum</i> source naturelle du falcarinol.....	66
1-Analyse préliminaire de l’huile essentielle d’ <i>E. triquetrum</i> et fractionnement.....	66
2-Fractionnement de l’huile essentielle d’ <i>E. triquetrum</i> en fraction moins complexe.....	70
3-Purification du composé majoritaire de l’huile essentielle d’ <i>E. triquetrum</i>	71
4-Etude de la composition chimique d’extrait cyclohexanique d’ <i>E. triquetrum</i>	72
B-Huiles essentielle de <i>Smyrniolum olusatrum</i> source naturelle des sesquiterpene.....	76
1-Analyse préliminaire de l’huile essentielle de <i>S. olusatrum</i>	76
2-Fractionnement de l’huile essentielle de <i>S. olusatrum</i> en fraction moins complexe.....	80
3-Purification des composés majoritaires de l’huile de <i>S. olusatrum</i>	83
4-Etude chimique des extraits de <i>S. olusatrum</i>	84
5-L’oxydation de l’huile de <i>S. olusatrum</i>	86
C-Les huiles essentielles de <i>Daucus crinitus</i> description de nouveau phénylpropanoïde	88
1-Analyse préliminaire de l’huile essentielle de <i>D. crinitus</i>	88
2-Fractionnement de l’huile essentielle de <i>D. crinitus</i> en fraction moins complexe.....	94
3-Etude de la composition chimique des extraits de <i>D. crinitus</i> partie racine.....	99
4-La synthèse de l’isochavicol isobutyrate.....	99
4.1.Protection du 4-bromophénol par le groupement méthylmethoxy.....	101
4.2.Couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura.....	103
4.3.Déprotection du groupement méthylmethoxy.....	108
4.4.Réaction d’estérification.....	112
Partie C / Etude biologique.....	119
1-L’activité antioxydante.....	121
1-L’activité antimicrobienne.....	123
a-Méthode par les disques.....	123
b-Méthode par les CMI.....	124
2-L’activité bioherbicide.....	125
2.1.Test anti-germinatif.....	126
2.2.Test des thylakoides.....	129
2.3.Essai de croissance sur les grains de Cresson (test d’allélopathique).....	133
3-Test d’écotoxicologie sur les larves d’Artémie (<i>Artemia salina</i>).....	135
4-L’activité antibactérienne contre les phytopathogènes.....	138
5-L’activité antifongique.....	143
6-L’activité insecticide.....	146

7-L'activité molluscicide.....	151
Conclusion.....	159
Partie expérimentale.....	166
1-Echantillonnage du matériel végétal.....	167
2-Préparation des échantillons.....	167
2.1.Extraction des huiles essentielles.....	167
2.2.Extraction des extraits aux solvant.....	167
3-Appareillage.....	168
Analyse par CPG/FID.....	168
Analyse par CPG/SM.....	168
Analyse par RMN.....	169
HPLC.....	169
4-Fractionnement et purification.....	169
4.1.Fractionnement de l'huile d' <i>E. triquetrum</i>	169
4.1.1.Premier fractionnement de l'huile d' <i>E. triquetrum</i>	170
4.1.2.Deuxième fractionnement de l'huile d' <i>E. triquetrum</i>	170
4.1.3.Purification de falcarinol à partir de l'huile d' <i>E. triquetrum</i>	170
4.2.Fractionnement de l'huile de <i>S. olusatrum</i>	170
4.2.1. Premier fractionnement de l'huile de <i>S. olusatrum</i>	171
4.2.2. Deuxième fractionnement de l'huile de <i>S. olusatrum</i>	171
4.2.3. Troisième fractionnement de l'huile de <i>S. olusatrum</i>	171
4.2.4.Purification des composés majoritaires de l'huile de <i>S. olusatrum</i>	171
4.3.Fractionnement de l'huile de <i>D. crinitus</i> partie racine.....	171
4.4.Chromatographie sur une couche mince (CCM).....	172
4.5.Chromatographie sur colonne flash inversée.....	172
5-La synthèse de l'isochavicol isobutyrate.....	172
a-Protection du 4-bromophénol par le groupement méthylmétoxy éther.....	172
b-Couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura.....	173
b.1.Protocol de la réaction 1.....	174
b.2.Protocol de la réaction 2.....	174
b.3.Protocol de la réaction3.....	175
c-Déprotection du groupement méthylmethoxy éther.....	175
c.1.Protocol de la réaction 1.....	176
c.2.Protocol de la réaction 2.....	176

c.3.Protocol de la réaction 3.....	176
d-Réaction d'estérification.....	177
6-Activité biologique.....	177
6.1.Activité antibactérienne.....	177
6.1.a.Méthode par disque (ou diffusion par gélose).....	178
6.1.b.Determination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	178
6.2.Activité bioherbicide	179
6.2.1.Test anti-germinatif.....	179
6.2.2.Test des thylakoides.....	179
6.2.3.Essais de croissance.....	180
6.3.Activité écotoxicologie.....	181
6.4.Activité antibactérienne contre les phytopathogènes.....	182
6.5.Activité antifongique.....	183
6.6.Activité insecticide.....	184
6.7.Activité molluscicide.....	185
Références.....	189
Annexes.....	203
Article 1.....	204
Article 2.....	205
Article 3.....	206

INTRODUCTION

Dans toutes les civilisations du monde, l'histoire des peuples montre que les plantes ont toujours occupé une place importante dans la vie quotidienne. Plus particulièrement dans le domaine de la santé, les plantes ont connu un réel intérêt qui s'est perpétué au fil du temps en donnant naissance à la médecine actuelle. Les plantes médicinales sont une source incontournable et inépuisable de composés biologiquement actifs. L'atout principal des PAM (Plante Aromatique et Médicinale) consiste dans le fait qu'elles sont utilisées pour le traitement de diverses pathologies que ce soit sous forme directe (infusions ou macérations) ou indirecte (extraction d'actifs). Cependant, depuis le début de l'ère industrielle, ces usages se perdent, les sociétés modernes ayant à leur disposition d'autres molécules, d'autres matériaux, et des moyens de production autrement plus conséquents. Néanmoins, l'impact massif qu'à exercé l'industrialisation sur l'environnement a conduit à une prise de conscience générale en faveur de la santé de l'homme, qui commence à avoir la volonté de se retourner vers « le naturel ». L'effort de recherche porte sur la caractérisation chimique et biologique de métabolites secondaires contenus dans des extraits aux solvants ou des huiles essentielles qui seront, demain, les agents actifs susceptibles de faire aboutir un nouveau médicament [1].

L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique grâce à sa situation géographique et climatique et à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes [2]. Cette flore comprend environ 4000 taxons répartis en 131 familles et 917 genres. Le nombre d'endémiques nationales est de 464 (387 espèces, 53 sous espèces et 24 variétés) [2]. Par ailleurs, on ne peut que se réjouir du fait que l'Algérie est un bon exemple de pays en développement qui a pris conscience de la richesse et de l'importance de sa médecine traditionnelle. Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique. Cependant, la problématique majeure émergente aujourd'hui vise la valorisation de la richesse biologique qui reste à ce jour quasiment inexistante [2].

Toutes les plantes possèdent principalement la capacité de produire des composés volatils, la diversification de la production d'huiles essentielles ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée et celle-ci passe par la connaissance de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur commercialisation [1]. Les substances végétales se présentent, pratiquement toujours, sous forme de mélanges complexes de molécules volatiles ou non, constitués de plusieurs dizaines de composés en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées. La caractérisation de ces substances naturelles nécessite la mise en oeuvre de diverses techniques analytiques qui permettent non seulement d'apprécier sa valeur marchande, mais aussi de réaliser le contrôle de la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité [1].

Actuellement, de nombreuses techniques analytiques sont disponibles et la démarche analytique adoptée est différente, suivant qu'il s'agit d'identifier des composés connus et dont les caractéristiques spectrales sont disponibles ou lorsque l'objectif est l'élucidation d'une structure non décrite dans la littérature [1]. D'une manière générale, la fiabilité des résultats constitue le premier critère à prendre en compte et implique souvent la mise en oeuvre de plusieurs techniques complémentaires. Globalement, on distingue les deux voies analytiques suivantes. La première voie est basée sur le couplage «en ligne» d'une technique chromatographique, qui permet d'individualiser les différents constituants, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) ou la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) et/ou la spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres [1]. Dans certains cas, plus difficiles, il est souvent nécessaire de combiner les techniques d'analyses si l'on veut garantir

un résultat exact. Cette démarche est sans aucun doute plus longue à mettre en œuvre mais aussi plus fiable, en partie grâce à la RMN du ^{13}C qui apporte des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule [1].

Les huiles essentielles (HE) sont des produits végétaux naturels très intéressants et possèdent, entre autres qualités, diverses propriétés biologiques. Le terme «biologique» comprend toutes les activités que ces mélanges de composés volatils (principalement les mono et sesquiterpénoïdes, les benzénoïdes, les phénylpropanoïdes, etc.) exercent sur l'homme, les animaux et d'autres plantes [3]. Les principaux composés respectifs sont principalement dérivés de trois voies de biosynthèse seulement, la voie du mévalonate menant aux sesquiterpènes, la voie du méthyl-érythrythol menant aux mono et diterpènes, et la voie de l'acide shikimique menant aux phénylpropènes [3]. Un bon nombre de ces substances volatiles ont diverses fonctions écologiques. Ils peuvent agir en tant que messagers internes, en tant que substances défensives contre les herbivores ou en tant que substances volatiles [3].

Le volet chimique de notre travail consiste à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de trois espèces de la famille des *Apiacéaes*. Les huiles essentielles ont été obtenues à partir de plantes provenant de plusieurs zones d'échantillonnage; leurs compositions chimiques ont été étudiées à l'aide des techniques chromatographiques et spectroscopiques modernes. Le volet biologique développé dans notre travail s'intéresse à des activités de bio-control (pesticide, herbicide, fongicide, antibactérienne, insecticide) et des activités moulluscicide. Ces travaux ont été réalisés au sein des laboratoires ; COSNA, LASNABIO université de Tlemcen, CRIOBE, IHPE université de Perpignan, (ICA), CSIC Madrid. Cet ouvrage implique 3 chapitres présentant les principaux travaux :

La **partie A**, est la partie bibliographique qui expose la description des différentes plantes qui font l'objet de notre étude, des principales techniques d'extraction d'huiles essentielles, d'analyses d'huiles essentielles et d'études d'activités biologiques.

La **partie B**, nous présentons dans des parties dédiées, les compositions chimiques des huiles essentielles de *Smyrniium olusatrum*, *Daucus crinitus* et *Eryngium triquetrum*. En corolaire nous détaillons les analyses menant à l'identification de composés détectés au cours de l'étude des trois plantes. Nous y exposons la composition des différentes fractions des trois huiles essentielles et la synthèse du composé majoritaire de *D. crinitus*.

La **partie C**, est consacrée aux études finalisées menées sur chacune des plantes. Les activités biologiques des huiles essentielles et de leurs fractions, leurs composés majoritaires sur une gamme de bactéries et champignons. Les activités de bio-control, insecticides molluscicides qui font l'objet de cette étude.

PARTIE A
BIBLIOGRAPHIQUE

I-Etude bibliographique de la famille des *Apiaceae* et les trois espèces :

1. Famille des *Apiaceae* :

La famille des *Apiaceae* a été créée par Antoine Laurent de Jussieu en 1789 sous le nom d'Umbellifère, puis nommée *Apiaceae* par John Lindley en 1836 [4]. Les plantes de cette famille sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces, comprennent environ 3.000 espèces se répartissant dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord [5]. C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées. Les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres [5].

1.1. Classification des *Apiaceae* dans le système botanique : [5]

- Embranchement des Spermatophytes (plantes à graine)
- Sous embranchement des Angiospermes (plantes à ovaire)
- Eudicots (embryon à deux cotylédons)
- Eudicots évolués
- Classe des Astéridées (fleurs pentamères gamopétales à carpelles)
- Sous classe des Euastéridées II (espèces herbacées à ovaire infère et regroupement des fleurs en inflorescence)
- Ordre des Apiales
- **Famille des *Apiaceae* (ex-Ombellifères)**

1.2. Caractérisation des *Apiaceae* :

L'appareil souterrain pérennant est très varié : racine pivotante, rhizome ou tubercule [5]. Les feuilles sont alternes, composées, rarement simples. Souvent, les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige [4]. La tige est souvent cannelée, creuse par résorption précoce de la moelle au cours de la croissance [4-5].

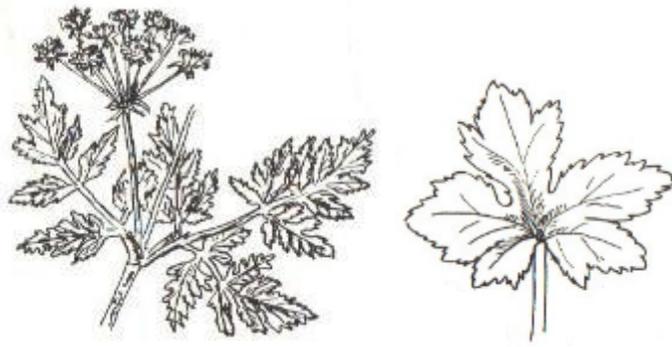


Figure 1 : Appareil végétatif des *Apiaceae* [5]

Les fleurs sont réunies en ombelles simples ou composées, munies de bractées à la base appelées involuclles. Elles comptent 5 pétales et 5 étamines et un ovaire à deux loges [4]. Les fleurs s'épanouissent toutes à un même niveau au bout de chaque pédicelle [5]. Les fleurs sont généralement blanches et plus rarement jaunâtres, verdâtres ou rosées. Leur disposition en inflorescence relativement condensée explique qu'elles soient généralement de petite taille [5].

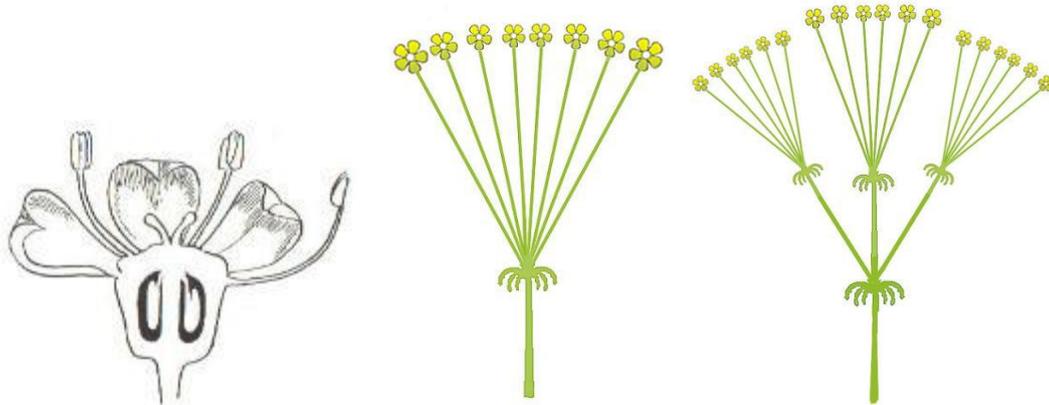


Figure 2 : Coupe florale, ombelle simple et ombelle composée des *Apiaceae* [5].

Les fruits sont formés de deux méricarpes accolés à un axe central, le carpophore, se séparant à maturité. Chaque méricarpe présente deux faces : commissurale (plane) et dorsale (convexe). La face dorsale porte au moins 5 côtes séparées par 4 vallécules contenant des canaux sécréteurs courts (bandelettes) [4]. Les différentes formes du fruit ainsi que la présence ou l'absence de bandelettes, leur nombre, leur évolution sont autant de critères permettant la classification des différentes espèces au sein de cette famille [5].

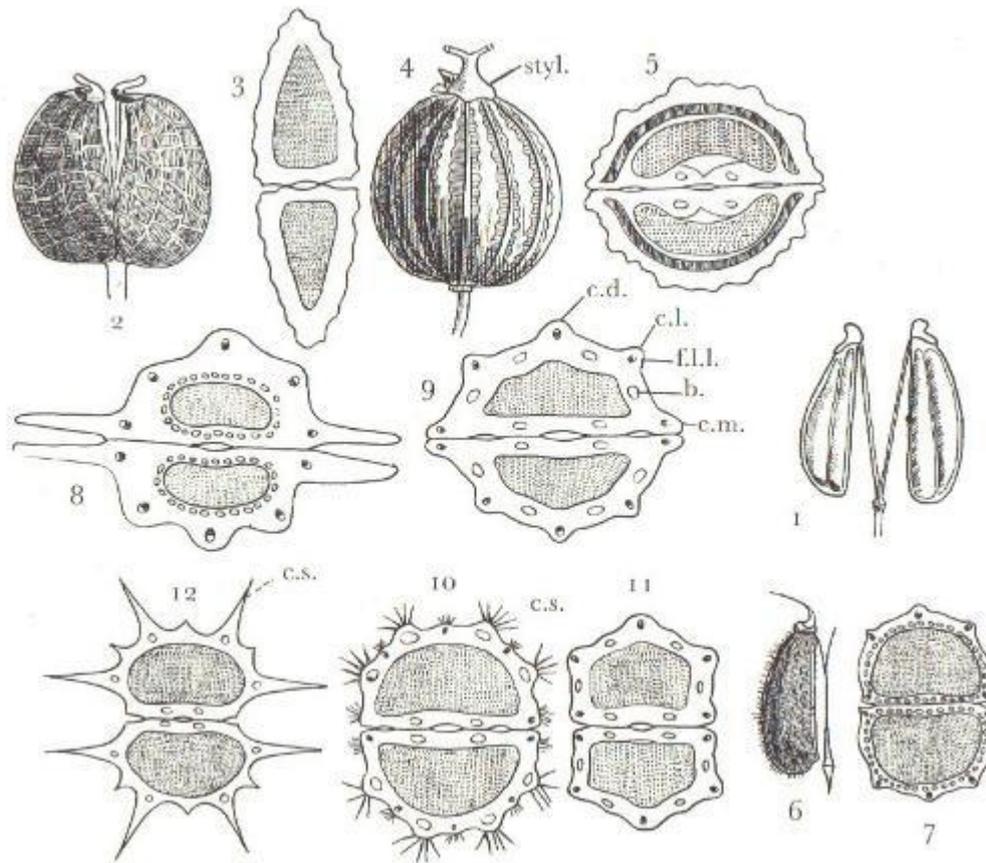


Figure 3 : Fruits des *Apiaceae* [5]

Les espèces d'*Apiaceae* jouent un rôle écologique important en tant que plantes vivrières pour un grand assemblage d'espèces d'insectes à circulation variable appartenant aux ordres Coléoptères, Hyménoptères, Lépidoptères et Diptères [6]. Ces plantes offrent une riche source de nectar, facilement accessible aux insectes anthophiles, même les plus sensibles à la bouche. Des pièces, par exemple Hyménoptères parasites [6]. De nombreux membres d'*Apiaceae* sont utilisés commercialement comme épices ou médicaments. Par conséquent, les recherches sur les produits chimiques de cette famille concernent principalement les huiles essentielles [6].

Bien qu'un grand nombre d'espèces d'insectes visitent certaines *Apiaceae*, seules quelques-unes peuvent agir comme de véritables vecteurs polliniques de ces plantes, comme cela a été rapporté dans le cas de *Thaspium* et *Zizia* [6]. La grande quantité de monoterpènes en fleurs, les odeurs pourraient être une caractéristique chimique des *Apiaceae*. La famille des *Apiaceae* comprend des espèces aromatiques utilisées au niveau industriel dans les

arômes et les parfums, ainsi que dans les produits pharmaceutiques et les cosmétiques tels que le fenouil (*Foeniculum vulgare Mill.*), L'aneth (*Anethum graveolens L.*) [7].

Actuellement, des espèces de la famille des *Apiaceae* ont produit un certain nombre de métabolites neuroactifs, tels que des dérivés de la coumarine dotés d'une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et un potentiel thérapeutique pour le traitement de troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, ainsi que pour l'épilepsie et d'autres troubles [8]. Des plantes de la famille des *Apiaceae* sont utilisées depuis des siècles en médecine traditionnelle [8].

1.3. La composition chimique des huiles essentielles de la famille des *Apiaceae* :

Les plantes de la famille des *Apiaceae* sont souvent des plantes aromatiques et elles sont connues pour la grande diversité en métabolites secondaires notamment pour ceux de leurs huiles essentielles, la présence de canaux sécréteurs synthétise des huiles essentielles ou des gommés résinent, leur conférant des odeurs et saveurs caractéristiques [4].

Les huiles essentielles de cette famille ont une composition hétérogène, étant dominées par différentes classes de composés basés sur l'espèce et la partie de plante considérée, elles sont riches en principes actifs intéressants tels que les phénylpropanoïdes, les hydrocarbures monoterpènes et les monoterpènes contenant de l'oxygène, les coumarines, les oléorésines, les lactones sesquiterpéniques, les saponosides [7].

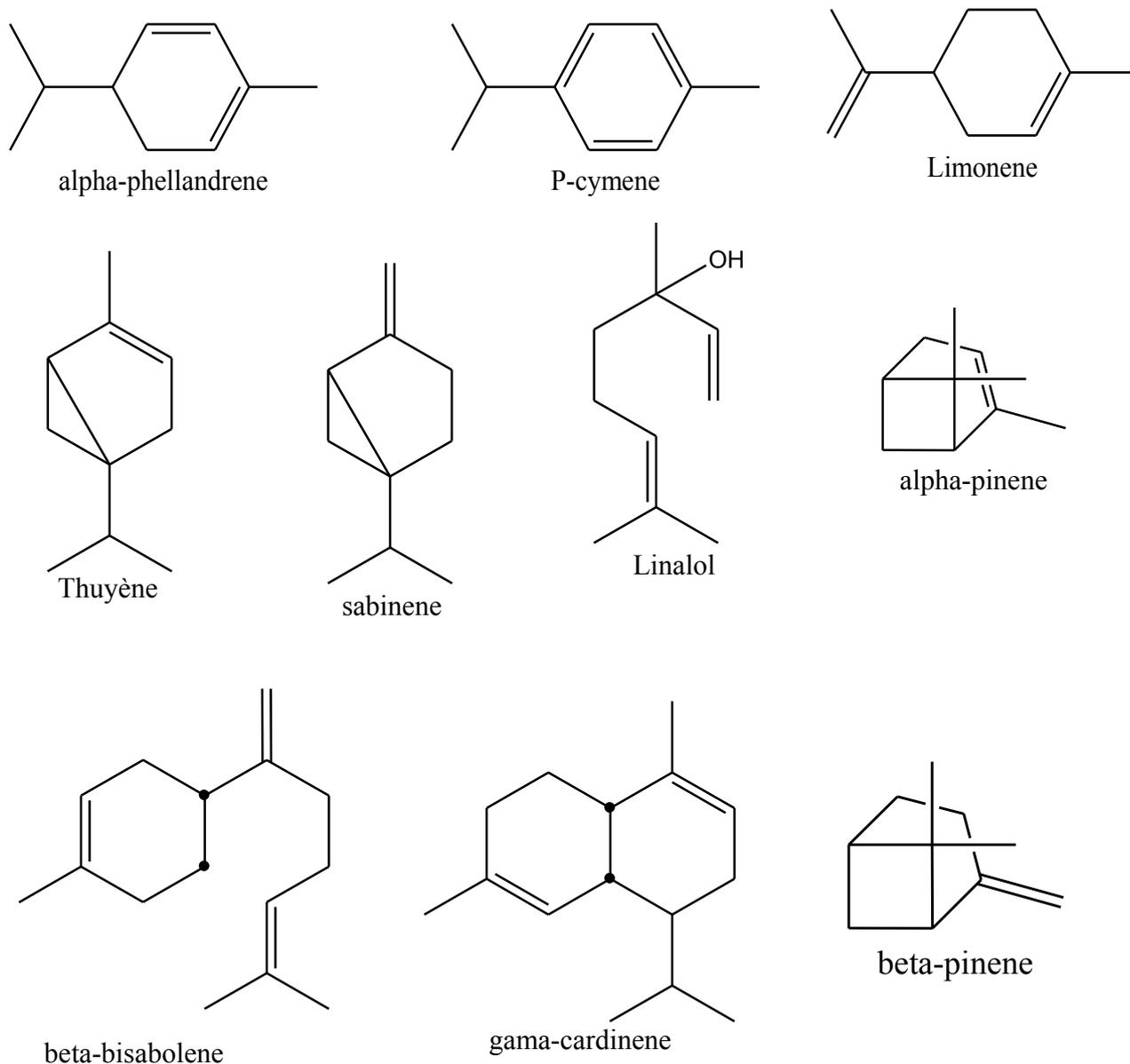


Figure 4: Quelques principaux actifs identifiés dans les huiles essentielles de la famille des *Apiaceae*. [4]

1.4. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des *Apiaceae* :

La majorité des *Apiaceae* utilisées comme condiments sont également réputées pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques telles que les propriétés anti-inflammatoire, analgésique, antibactérienne, anticonvulsivante, antirhumatismale, antioxydante, antitumorale, cytotoxique et des propriétés chimiopréventives, qui sont attribuées à différentes substances bio actives [4]. Les huiles essentielles des espèces d'*Apiaceae* jouissent d'une bonne réputation en tant qu'un candidat prometteur à des biocides écologiques pour le contrôle des

parasites et des vecteurs, avec une référence particulière à *Culicidae* (moustique). Les huiles essentielles d'*Apiaceae* ont montré une activité insecticide contre les larves du moustique tigre asiatique *Aedes albopictus* Skuse et de la blatte germanique *Blattella germanica* (L.) [7,9].

2. L'espèce *Smyrniium Olusatrum* :

2.1. Définition de l'espèce :

Alexandre, *Smyrniium olusatrum* L, également connu sous le nom de céleri sauvage, une herbe aromatique bisannuelle de la famille des *Apiaceae* [7,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18, 19, 20] originaire d'Égypte (c'est-à-dire de l'ancienne ville d'Alexandrie, en Égypte) [10]. Les Romains amenèrent des Alexandre dans toute l'Europe, où ils étaient cultivés dans des potagers et consommés comme légume jusqu'au moyen-âge, il a été remplacé par du céleri commun (*Apium graveolens* L) [7,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20]. Aujourd'hui, *S. olusatrum* est répandu dans toute la région méditerranéenne jusqu'au nord de l'Europe et peut représenter une biomasse importante à exploiter au niveau industriel [10,7]. En médecine traditionnelle, la plante était utilisée en tant qu'agent antiscorbutique, diurétique, stomacal, laxatif et dépuratif [12,7,14,15,17]. L'odeur de cette plante, qui ressemble à celle de la myrrhe, est donnée par des sesquiterpènes oxygénés portant un anneau furane et appelés furanosesquiterpènes [10]. La molécule mère de ce groupe et la plus abondante dans la fraction volatile d'Alexandre est notamment l'isofuranodiène ($C_{15}H_{20}O$, poids moléculaire: 216.15 g/mol). Ce composé présente une large distribution dans la nature [10].



Figure 5: Feuilles et fleurs de *Smyrniium Olusatrum* [17]

2.2. La composition chimique de l'huile essentielle de *Smyrniium Olusatrum* :

L'huile de *S. olusatrum* est riche en sesquiterpène ; classe chimique qui jouit d'une bonne réputation en tant qu'une source alternative de médicaments anti-inflammatoires et anticancéreux [11]. Les sesquiterpènes sont des composés de quinze atomes de carbone formés par biosynthèse via la voie du mévalonate à partir de farnésyl pyrophosphate (FPP). Selon l'enzyme spécifique catalysant le réarrangement moléculaire du FPP, plusieurs groupes de sesquiterpènes avec bisabolane, germacrane, cuparane, cadinane, des épines dorsales humulane, élémmane, eudesmane et guaiane peuvent être formées [11]. Les sesquiterpènes se retrouvent fréquemment dans les usines productrices d'huiles essentielles, où ils jouent un rôle important en tant que médiateurs environnementaux [11].

En Italie, la source la plus riche en huiles essentielles a été produite par les fleurs, avec un rendement moyen de 1,8 %, suivies des racines d'été (1,0 %), des fruits verts (0,6 %) et des racines d'hiver (0,5 %), feuilles basales (0,5%) et fruits mûrs (0,2%) [20]. Les rendements élevés en huile essentielle, en particulier dans les fleurs et les racines, sont comparables à ceux de la plupart des huiles essentielles commercialisées distillées à partir d'*Apiaceae* et utilisées dans les domaines pharmaceutique, agronomique, alimentaire, sanitaire, cosmétique, etc, et font de *S. olusatrum* un bon candidat en tant que source importante d'huiles volatiles à utiliser au niveau industriel [20].

En Italie, l'huile obtenue des racines récoltées pendant la dormance permet l'identification de 86 composants volatils, qui correspond à 91,8–99,4% du total des huiles essentielles [7]. Ces huiles essentielles étaient dominées par les furanosesquiterpénoïdes (47,6–89,6%), suivis par les hydrocarbures monoterpènes (0,9–37,3%) et des quantités plus faibles d'hydrocarbures sesquiterpéniques (2,8-10,1%) et de sesquiterpènes oxygénés (1,4–8,9%). Parmi les furanosesquiterpénoïdes, le couple isofuranodiène / curzerène (30,6–51,0%) et le furanoéremophil-1-one (8,4–41,3%) étaient les composés les plus abondants [7]. Les

autres composés représentant la minorité de cette fraction étaient le 1- β -acétoxyfuranoeudesm-3-ène (0,3-1,4%), le 1- β -acétoxyfuranoeudesm-4-(15)-ène (trace – 1%) et l'attrylsyle (trace - 1%) [10]. Parmi les hydrocarbures monoterpènes, les β - le phellandrène (0,4–21,6%) et le δ -3-carène (traces – 18,8%) étaient les principaux composés. Les huiles essentielles obtenues à partir de racines récoltées en été, la composition est similaire avec celles collectées pendant la dormance avec seulement des différences quantitatives concernant principalement une abondance relative plus élevée dans les hydrocarbures monoterpènes (1,6–37,3%) [7]. Un total de 78 composants volatils ont été détectés dans l'huile des feuilles, représentant 92,1 à 97,8% de la composition totale. Les feuilles présentaient une composition de l'huile essentielle similaire à celle des racines, dominée par les furanosesquiterpènes (45,0–66,8%), suivie des hydrocarbures monoterpéniques (4,3–38,8%). Parmi furanosesquiterpénoids, furanoéremophil-1-one (9,6–44,7%) et le couple isofuranodiène / curzerène (18,2–49,8%) [20]. Ensuite 47 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle provenant d'inflorescences de *S. olusatrum*, représentant 98,5% de la composition totale. La majeure partie de cette huile était fournie par les composés oxygénés (68,2%), parmi lesquels les furanosesquiterpènes apportaient l'apport majeur. Parmi ces derniers, le curzerène/l'isofuranodiène (40,3%) et le furanoéremophil-1-one (12,1%). Le germacrone (10,4%) était le composé le plus abondant parmi les composés sans furane. Les hydrocarbures monoterpéniques (22,2%) ont complété le profil chimique de *S. olusatrum*, le myrcène (18,2%) étant le composé le plus représentatif [20]. L'huile essentielle des fruits ; les principaux composés volatils étaient β -acétoxyfuranoeudesm-4 (15) –ène (31,2%), curzerène/ isofuranodiène (30,4%), phellandrène (6,2%) et α - pinène (5,4%) [13].

En Grèce, la composition chimique de l'huile essentielle de *S. olusatrum* est similaire de celle de l'huile provenant de l'Italie avec des différences dans les proportions des composés majoritaires et les composés minoritaires telle que, l'huile essentielle des feuilles est

caractérisée par la présence de fortes quantités de β -myrcène (11,7%) et de β -phellandrène (5,2%) [14].

Smyrniium Olusatrum est riche en acide gras notamment l'acide oléique avec une teneur de 74,14% en poids [21], il contient les concentrations les plus élevées d'acide ascorbique (16,54 mg / kg) [22]. Les fruits d'Alexandre sont une source riche en protéines et glucides, parmi les acides gras ; l'acide pétrosélinique était le plus abondant (67,5%), tandis que l'acide linoléique (32,8-57,7%) était le composé principal dans les autres parties [22].

L'isofuranodiène est tout à fait disposé à l'oxydation donnant lieu à des lactones à cinq chaînons. De plus, il peut subir une photooxygénation après une exposition aux rayons ultraviolets et chaque fois dissous dans certaines solutions de solvant organique [14]. À noter, lorsqu'il est exposé à des températures élevées, l'isofuranodiène subit le traitement dit «Réarrangement de Cope »consistant en un réarrangement [3,3] sigmatropique donnant lieu au curzerène produit d'artefact qui est doté d'un pouvoir biologique inférieur. Cette dégradation se produit, bien que lentement, à température ambiante rendant ce composé assez instable [14].

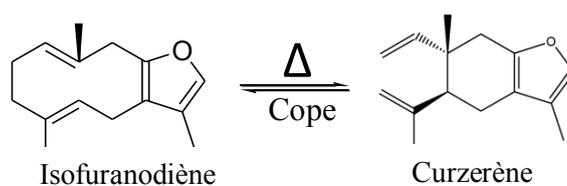


Schéma 1 : Réarrangement de Cope de l'isofuranodiène [10]

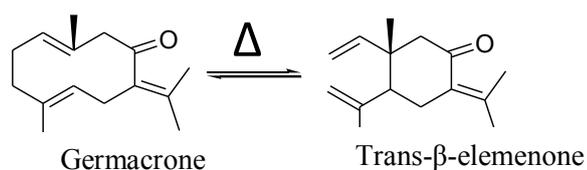


Schéma 2 : Réarrangement du germacrone [10]

2.3. L'intérêt thérapeutique de l'huile essentielle de *Smyrnum Olusatrum* et ces composés majoritaires:

2.3.1 L'intérêt thérapeutique de l'huile essentielle de *S. Olusatrum* :

L'huile essentielle de feuille de *S. olusatrum* a montré un potentiel en tant qu'agents larvicides de moustiques contre le vecteur de la filariose *Culex quinquefasciatus* (CL₅₀ 18,6 µL / L) [7,10]. L'huiles essentielles de *S. olusatrum* étaient actives, en particulier contre *Staphylococcus aureus* et les dermatophytes; les valeurs de CMI allaient de 32 à 64 µg / ml qui lui confère un potentiel antibactérien et antifongique [23]. Elle possède aussi une forte activité antiparasitaire contre *Trypanosoma* avec une IC₅₀ comprise entre 1,9-4,0 µg/ml [13]. Les huiles essentielles de *S. olusatrum* possèdent des caractéristiques thérapeutiques intéressantes, telles que les propriétés antiprolifératives, propriétés neurogènes, hépatoprotectrices et antioxydantes [16]. L'huile de fleur a montré une activité remarquable sur les cellules tumorales du colon avec une IC₅₀ de 10,71 µg/ml [18].

2.3.2 L'intérêt thérapeutique de l'isofuranodiène :

L'isofuranodiène (IFD), un sesquiterpène contenant un cycle furane naturel et bioactif, d'abord isolé et décrit dans *Rhizoma Curcumae* en 1968, puis trouvé dans des organismes marins et végétaux [11]. Principal composé volatil de l'huile essentielle de *Smyrnum olusatrum*, il est abondant dans les huiles essentielles obtenues à partir de diverses parties de *S. olusatrum* [11]. Ce composé est également considéré comme le précurseur des lactones sesquiterpéniques, qui jouent un rôle important dans la défense des plantes [11]. L'IFD possède des caractéristiques thérapeutiques intéressantes, telles que des propriétés antiprolifératives des lignées cellulaires du cancer du sein et de la prostate et l'apoptose induite dans des cellules de carcinome du côlon humain [15,16], propriétés neurogènes [9, 15], hépatoprotectrices [16] et antioxydantes [15]. En effet IFD possède une activité anticancéreuse dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines, il était capable d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses du sein in vitro et in vivo et d'inhiber la

croissance induite par le tamoxifène dans les cellules cancéreuses du sein de MCF-7 [11,19]. L'IFD a également augmenté l'activité anti-proliférative du paclitaxel dans les cellules de cancer du poumon 95-D et du côlon HCT 116 [11]. En outre, l'IFD a montré une activité anti-proliférative contre les lignées cellulaires d'adénocarcinome de la prostate (PC3) avec une efficacité proche de celle du cisplatine [11-19]. Plus récemment, il a été découvert que l'IFD exerce un effet anti-angiogénique [11]. En raison de son faible poids moléculaire et de sa grande hydrophobicité, l'IFD est capable de franchir facilement la barrière hémato-encéphalique [11]. La cytotoxicité des traitements combinés IFD et TMZ (principe actif anticancéreux) a été évaluée dans le but de vérifier une synergie possible entre eux. Les résultats de cette étude ont mis en lumière l'utilisation d'IFD pour réduire la posologie et les effets secondaires du traitement par TMZ [11]. L'isofuranodiène pure a montré un potentiel en tant qu'agents larvicides de moustiques contre le vecteur de filariose *Culex quinquefasciatus*. (CL₅₀ de 29,2 µl/L) [7,10]. Cependant, sa faible solubilité ainsi que sa sensibilité à l'oxydation et à la dégradation thermique, limitent son application à grande échelle. Pour faire face à ces défis, l'isofuranodiène a été encapsulé dans des microémulsions stables (ME) à deux concentrations (ME 750: 0,75%, ME 375: 0,375%) [10]. L'isofuranodiène formulé dans du ME 750 s'est montré efficace contre les larves de *Culex. quinquefasciatus*, entraînant une mortalité larvaire importante dans le temps et une diminution marquée de l'émergence des adultes [10]. Les deux ME d'isofuranodiène ont eu peu d'impact sur le microcrustacé aquatique non ciblé *Daphnia magna* ainsi que sur les vers de terre [10]. L'isofuranodiène possède une activité antiparasitaire significative et sélective contre *Trypanosoma brucei* avec une IC₅₀ de 0.6 µg/ml. [13]. L'isofuranodiène possède une activité acaricide intéressante contre *Tetranychus urticae* (*Tetranychidae*), un important ravageur agricole, qui s'attaque à plus de deux cents espèces de plantes avec une IC₅₀ de 4,1 µg/ml [9].

2.3.3 L'intérêt thérapeutique de furanoérmophilone :

Le furanoérmophil-1-one possède un pouvoir antifongique intéressant contre *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *P. verucosum* var. *cyclopium*, avec des valeurs de CMI comprises entre 0,0008 et 0,125 mg / mL et des valeurs de MFC de 0,025-0,050 mg / mL [14].

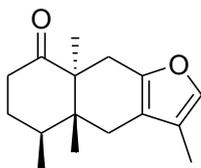


Figure 6 : Structure du furanoérmophil-1-one

2.3.4 L'intérêt thérapeutique de Curzerène :

Le curzerène est un sesquiterpène et un composant utilisé en médecine orientale. Le curzerène présentait des effets antiprolifératifs dans les cellules de l'adénocarcinome pulmonaire humain SPC-A1 de manière dépendante du temps et de la dose. Les IC₅₀ anticancéreuses étaient de 403,8, 154,8 et 47,0 µM pendant 24, 48 et 72 heures, respectivement [24]. C'est une molécule idéale pour la formulation de nouveaux larvacides de moustiques, en raison de sa CL₅₀ extrêmement basse contre *An. Subpictus* (CL₅₀ = 4,14µg / ml), *Ae. albopictus* (CL₅₀ = 4,57µg / ml) et *Cx. Tritaeniorhynchus* (CL₅₀ = 5,01 µg/ml) [25]. Elle possède aussi un effet anticonvulsifs avec une valeur de ED₅₀ dans le modèle PTZ (pentylentétrazole) 0,25 mg / kg [26].

3. L'espèce *Daucus Crinitus* :

3.1. Définition de l'espèce :

Le genre *Daucus* comprend environ 600 espèces largement répandues autour du monde. *D. carota* (carotte) est la principale espèce du genre *Daucus*, est l'un des légumes racines les plus populaires cultivés dans le monde [27]. En Algérie, le genre *Daucus* est représenté par des espèces vivantes dans des zones sèches et non cultivées, parmi ceux-ci, *D. crinitus* Desf. syn. et *D. meifolius* Brot qui sont répandus le long de la côte ouest algérienne de Tlemcen à

Mascara [27]. *D. crinitus* est caractérisé par la présence de nombreuses sous-espèces qui colonisent les sables et les falaises [27]. Il s'agit d'une plante vivace à tiges dressées, souvent plus longues que 50 cm, et à feuilles (10-20 cm) divisées en de nombreux segments linéaires pseudoverticoïdes. Ses feuilles basales sont velues, nombreuses et sous-jacentes, et les ombelles sont convexes ou plates avec des rayons inégaux. Ses racines pivotales non tubéreuses ont généralement une longueur de 6 cm et ses fruits sont petits (poids moyen = 3,25 g / 1 000 graines). En Algérie, il est connu localement sous les appellations «Fassoukh» et «Eurq Sidi Messaoud» [28]. En médecine traditionnelle les racines, tiges et la plante entière de *Daucus crinitus* utilisés en poudre ou en décoction contre les pathologies du système digestif (diarrhée) [29], problèmes de puissance (fatigue) et les maladies cardiovasculaires [29]. Une enquête menée par les herboristes identifiés qu'une boisson à base de racines de *D. crinitus* est utilisé en décoction pour expulser le placenta après l'accouchement et comme tonique [27]. La phytochimie du genre *Daucus* a été largement étudiée (par exemple, les flavonoïdes, les caroténoïdes, polyacétylènes, anthocyanes) [27-28].



Figure 7 : Les embelles du genre *Daucus* [29]

3.2. La composition chimique de l'huile essentielle et les extraits aux solvants de *Daucus crinitus* :

L'huile essentielle de *D. crinitus* produit deux types d'huiles: les huiles provenant des racines sont composées principalement de composés aliphatiques (87,0% à 90,1%) notamment le dodécyle acétate [27], undecane [27] et les huiles provenant des parties

aériennes, sont composés principalement de phénylpropanoïdes (43,1% - 88,6%) notamment l'isochavicol isobutyrate [27-30-28].

La composition chimique de l'huile essentielle de *D. crinitus* de la partie aérienne varie significativement avec le stade physiologique de la plante. Tout au long de la vie végétative de la plante, *D. crinitus* produit trois huiles essentielles qui diffèrent par le pourcentage de leurs composés de classe [31]. Au début de la phase végétative (fin Mars), 56 composants, représentant 93,8% de la composition totale, ont été identifiés. Les groupes chimiques les plus abondants de cette huile étaient les composés aliphatiques (49,9%), les composés phénoliques (36,4%), les hydrocarbures sesquiterpéniques (4,3%) et les sesquiterpènes oxygénés (2,1%). Les principaux composants aliphatiques étaient le décanol (10,4%), l'heptadécane (9,8%), le dodécanol (6,3%), le pentadécane (5,4%), l'undécane (4,0%), suivis du décanal (2,7%), de l'hexadécane (1,8), l'acide hexadécanoïque (1,5%) et l'hexadécanol (1,1%). Toutefois, l'isobutyrate d'isochavicol (26,4%) et le 2-méthylbutyrate d'isochavicol (7,9%) constituaient les principaux constituants des composés phénoliques. Les composés terpéniques n'étaient représentés que par le α -humulène (1,9%), le butyrate de géranyle (1,2%) et le α -cédrol (1,2%) [31]. En ce qui concerne le stade de début de floraison (mi-Mai), la composition de l'huile essentielle est semblable d'un point de vue qualitatif à celle observée au début du stade végétatif, caractérisée par un pourcentage élevé de composés phénoliques (54%) et la présence de zizaène (2,3%), d'oxyde de caryophyllène (2,1%), d'acétate de bornyle (2,1%) et de myrcène (1,4%) [31]. En revanche, l'huile produite au stade de la pleine floraison était caractérisée par l'isobutyrate d'isochavicol (76,1%), l'isochavicol-2-méthyl butyrate (5,4%), le myrcène (1,9%), le zizaène (3,1%), le limonène (1,5%) et le pentanoate de dodécyle (1,3%) [31].

L'analyse HS-SPME a montré une distribution plus précise des substances volatiles dans les organes étudiés: les composés aliphatiques oxygénés étaient bien présent dans les racines

(44,3% -84,0%), les composés aliphatiques hydrocarbonés dans les feuilles et les tiges (31,3% à 88,7%), et phénylpropanoïdes dans les fleurs et les ombelles (47,9% - 64,2%) [27].

Le criblage phytochimique des extraits bruts organique (méthanolique) et aqueux de tiges / feuilles a révélé la présence de différents types de groupes chimiques tels que les tanins [32-33], les flavonoïdes [32-33], les acides phénoliques [32-33], les coumarines, sucres réducteurs, stéroïdes et terpènes [32]. D'après les analyses, l'extrait méthanolique avait la teneur totale en composés phénoliques la plus élevée (130,19 µg de GA / mg d'extrait) [33].

La fraction d'acide gras des différents organes (feuilles, tiges et racines) était caractérisée par l'acide laurique (17,9, 17,5 et 18,1% respectivement) et d'autres acides gras à longues chaînes (jusqu'à C22) [34]. Différences qualitatives et Quantitative ont été enregistrées parmi les fractions insaponifiables des différents organes de *D. crinitus*. En fait, les fractions insaponifiables de la racine, de la feuille et de la tige ont montré des quantités élevées de composants aliphatiques (83,4%, 87,2% et 91,4%, respectivement). Les composants monoterpéniques, diterpéniques et sesquiterpéniques étaient seulement présent dans un petit pourcentage [34].

3.3. Propriétés biologiques des huiles essentielles et les extraits aux solvants de *D. crinitus* :

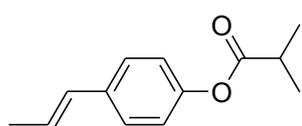
L'huile essentielle de *D. Crinitus* possède une modeste activité antimicrobienne et antifongique contre les champignons phytopathogènes [30-28], par contre l'huile avait une activité contre *penicillium sp2* mais cette activité était plus prononcée, où le pourcentage d'inhibition a augmenté à 54,32% à 2 µg mL⁻¹, atteignant un maximum de 77,77% à 5 µg/ mL [30]. Les huiles essentielles des différents stades phénologiques ont montré une forte activité contre *C. albicans* et *S. aureus* [31].

L'extrait méthanolique a montré une activité antioxydante (89,82%) avec la méthode DPPH [33]. L'augmentation de la concentration des extraits a entraîné une augmentation de la réduction ferrique [33]. Un effet antimicrobien remarquable a été observé dans des extraits

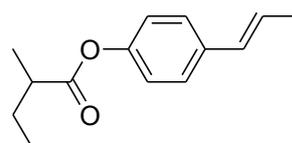
organiques de tiges et de graines (CMI = 0,31-0,83 mg / ml sur *S. aureus*, *B. cereus* et *C. albicans* car ces extraits contiennent de nombreuses familles phytochimiques telles que les coumarines, flavonoïdes, sucres réducteurs, stéroïdes, tanins et terpènes [32]. La fraction insaponifiable de *D. crinitus* possède des propriétés antimicrobienne contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* [34].

3.4. Propriétés biologiques des composés majoritaires de *D. crinitus* :

L'isochavicol isobutyrate est le composé principal de l'huile essentielle des parties aérienne de *D. crinitus* possède une activité antiradicalaire modéré avec une $IC_{50} = 10^3 \mu\text{g/ml}$ [28], une activité antibactérienne intéressante avec une CMI= 25 $\mu\text{g/ml}$ contre *M. bovis* [28], ainsi des activités antispasmodiques et cytotoxiques intéressantes avec des IC_{50} de 14 $\mu\text{g/ml}$, 27 $\mu\text{g/ml}$ respectivement [28].



Isochavicol isobutyrate



Isochavicol-2-methyl butyrate

Figure 8 : Les composés majoritaires de l'huile essentielle de *D. crinitus* [28]

4. L'espèce *Eryngium triquetrum* :

4.1. Définition de l'espèce :

Le genre *Eryngium L.* est l'un des plus grands et des plus complexes genres de la famille des *Apiaceae* et comprend plus de 250 espèces réparties en Europe, Asie, Afrique du Nord, l'Amérique du Nord et Sud et l'Australie [35-36-37], couramment utilisées comme plantes comestibles et plantes médicinales dans différents pays [38]. Parmi les espèces *Eryngium campestre L.*, *Eryngium triquetrum*, *Eryngium kotschyi*, *Eryngium maritimum L.* et *Eryngium trisectum* [35], qui sont utilisées comme remède traditionnel pour le traitement de divers maladies telles que l'hypertension, des problèmes gastro-intestinaux, de l'asthme, brûlures, fièvres, diarrhée, paludisme [35]. L'analyse phytochimique du genre *Eryngium* (23 espèces

étudiées) a montré que les espèces du genre *Eryngium* sont une source riche en flavonoïdes, les tanins, les saponines et les triterpénoïdes [35-36-38]. Les métabolites secondaires isolés de plantes appartenant à ce genre ont montré des activités biologiques importantes, notamment des propriétés antitumorales, antibactériennes, antifongiques, phototoxiques et autres propriétés chimiques et médicinales [35]. Les huiles essentielles et les extraits obtenus à partir de différentes espèces d'*Eryngium* ont une activité antimicrobienne à large spectre contre plusieurs souches de bactéries gram-positives et gram-négatives, certaines espèces de champignons et de levures ainsi que de virus [38]. Les résultats montrent que ces activités peuvent être attribuées à la présence de différents composés phytochimiques, en particulier des composés apolaires [38].

Eryngium triquetrum Vahl est une plante annuelle, vivace, épineuse, vert glauque à la base, bleu-azuré ou améthyste à l'apex d'origine d'Afrique du Nord largement répandue dans toutes les régions de l'Algérie, Maroc et Tunisie [35-36-39], d'une hauteur de 15 à 50 cm, à racines noires et épaisses. Ces tiges sont rigides, épaisses, très ramifiées et très feuillées à rameaux triquètres. Les feuilles basales en rosette sont coriaces et épineuses. Les inflorescences sont de couleur bleu clair, à nombreux pseudocapitules. Les bractées florales semi globuleuses sont plus courtes ou tout au plus de taille égale aux fleurs [39]. *E. triquetrum* pousse particulièrement bien dans les pâturages rocheux et non cultivées [35-36]. Les populations locales l'appellent «Choukzerka» [35]. Au Maroc, une décoction d'*E. triquetrum* mélangé à d'autres plantes est utilisé pour le traitement de lithiase rénale [36].



Figure 9 : *Eryngium triquetrum* [39]

4.2. La composition chimique des huiles essentielles et des extraits de l'*E. triquetrum* :

En Italie, l'huile essentielle des fleurs de *E. triquetrum* a donné une huile jaune, Vingt composés ont été identifiés, représentant 96,8% du total des composants. L'huile était riche en monoterpènes oxygénés (93,7%) [36]. Le pulegone (50,6%) et la pipériténone (30,5%) étaient les principaux composants de cette classe ainsi que de l'huile. Il convient également de mentionner la présence de menthone (7%) et de pipéritone (2%) [36]. Les hydrocarbures monoterpènes étaient présents avec une faible quantité (1,8%) avec du limonène (1,3%) comme composé principal de la classe [36]. Autres métabolites tels que α -pinène et (E) - β -caryophyllène, présents dans *E. amethystinum*, *E. aquifolium*, *E. bourgatii*, *E. corniculatum*, *E. glaciale*, *E. paniculatum* et *E. planum* se produisent dans *E. triquetrum* seulement en faible quantité (0,2% et 0,1%, respectivement) [36].

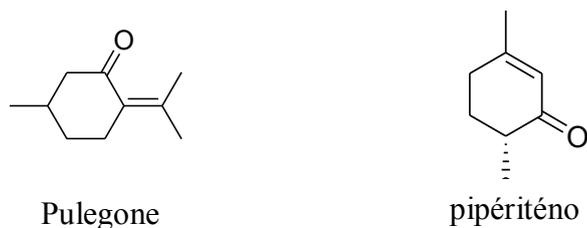


Figure 10: Les composés majoritaires de l'huile d'*E. triquetrum* d'Italie

En Algérie, L'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes fraîches de *E. triquetrum*, donnant (p / p) 0,02 à 0,11% (moyenne 0,05%) des huiles essentielles rouges [39-40]. Environ 24 composants ont été identifié, représentant 93,2% de la composition totale. L'huile essentielle contient principalement des composés oxygénés linéaires (92,6%), dominés par le falcarinol (71,2%), suivis de l'octanal (9,1%) et du nonanal (2,5%) [39-40]. Les compositions chimiques des échantillons d'huiles obtenues à partir de matériel végétal récolté à différents endroits aux mêmes stades végétatifs sont très proches et elles ont démontré que des paramètres tels que l'altitude, la composition du sol et les conditions climatiques étaient peu impliquées dans la chimie de la plante [39-40]. À l'inverse, l'analyse des données chimiques acquises au cours du cycle végétatif total a montré que la composition chimique de l'huile essentielle de la plante semble être liée à l'état phénologique de la plante [39-40]. Le groupe I contenant les quantités les plus élevées de falcarinol (83,6 à 90,6%) et les quantités les plus faibles d'octanal (1,0 à 2,5%). Les groupes II et III sont différent du groupe I en ce qu'ils présentaient des quantités plus faibles de falcarinol (moyennes 76,2% et 67,2%) et plus élevées d'octanal (moyennes 5,7% et 11,6%), respectivement [39-40]. L'huile du groupe I a été obtenue à partir de matériel végétal récolté avant la floraison, tandis que toutes les autres huiles essentielles ont été préparées à partir de matériel végétal récolté au stade de la floraison [39-40]. Les fleurs étaient les organes les plus aromatiques, avec un rendement en huile essentielle de 0,1%, contre 0,05% pour les tiges et les racines, respectivement. Le falcarinol (39,6% et 36,5%) et l'octanal (28,5% et 32,7%) étaient les deux composants principaux des

huiles essentielles de la tige et de la fleur, respectivement. Le falcarinol (91,5%) était le composant principal de l'huile de racine. [39-40].

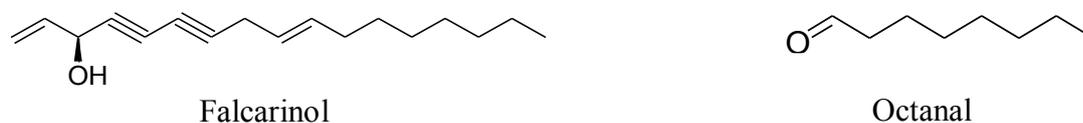


Figure 11: Les composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. triquetrum* en Algérie [39]

Une étude phytochimique des parties aériennes indiquent la présence des cinq glycosides de flavonol ont été signalés pour la première fois chez l'espèce *E. triquetrum*, et deux ont été isolés pour la première fois dans le genre, qui est le kaempférol-3-O- (6-OEp-coumaroyle), D-glucopyranoside et kaempférol-3-O-L-rhamnopyranosyl-(1,6),-D-glucopyranoside [37].

L'extrait d'acétate d'éthyle des parties aériennes d'*E. triquetrum* est riche en polyacétylène, les lignanes et les flavonoïdes [35].

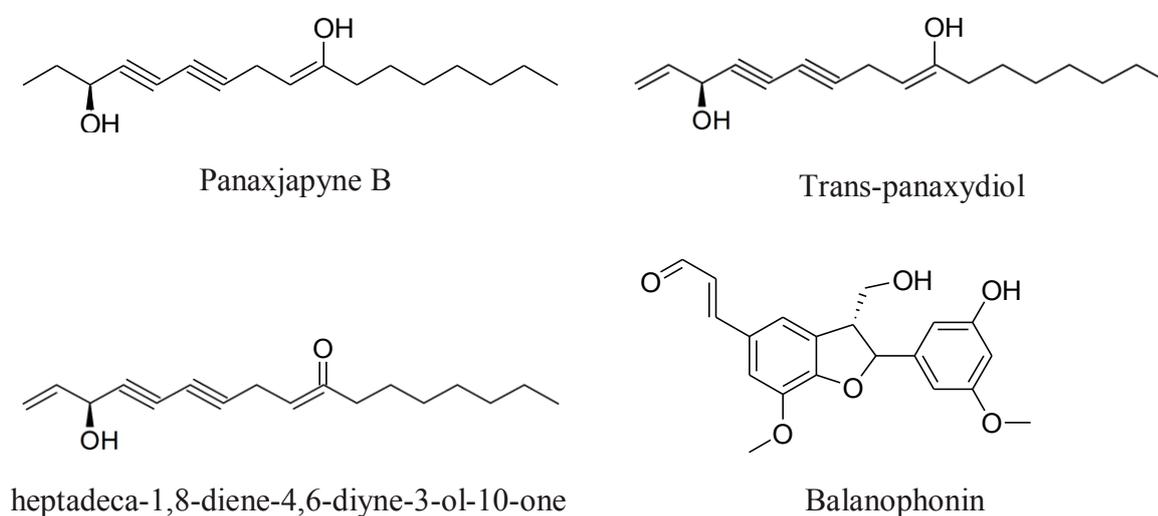


Figure 12 : Quelques composés majoritaires présentent dans l'extrait d'acétate d'éthyle de l'*E. triquetrum* [35]

4.3. Les propriétés biologiques des huiles essentielles et les extraits d'*E. triquetrum* et le Falcarinol :

4.3.1. Les propriétés biologiques des huiles essentielles et les extraits d'*E. triquetrum* :

En Italie, l'huile d'*E. triquetrum* a montré une activité antimicrobienne assez bonne vis-à-vis les *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* et en particulier de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* [36]. L'activité antimicrobienne de l'huile pourrait s'expliquer par le pourcentage élevé, dans les huiles, de pulegone, dont il a été démontré qu'il possédait une forte activité antibactérienne [36]. Le pulegone a une structure similaire à la carvone, qui s'est avérée affecter la membrane de la paroi cellulaire en dissipant le gradient de pH et le potentiel membranaire des cellules. [36-38].

En Algérie, l'huile essentielle d'*E. triquetrum* possède une activité antibactérienne modérée par contre l'huile a montré une capacité de piégeage intéressante de DPPH avec une IC_{50} de 28,68 $\mu\text{g} / \text{ml}$, ce qui est proche de la valeur de référence BHT, $IC_{50} = 17,90 \mu\text{g} / \text{ml}$ [39-40]. Cette capacité d'élimination des radicaux de l'huile essentielle pourrait être attribuée à la présence de falcarinol, principal composant de l'huile [39-40].

L'extrait au chloroforme d'*E. triquetrum* possède une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Morganella morganii* [37]. L'extrait d'*E. triquetrum* possède un contenu phénolique important ($> 16 \text{ g} / 100 \text{ g}$ d'extrait sec) et une bonne activité de balayage des radicaux a été trouvés dans l'extrait n-butanolique d'ET (BEET) ($IC_{50} 136 \text{ g} / \text{mL}$), par rapport à la référence (IC_{50} pour la quercétine, $12 \text{ g} / \text{mL}$). L'extrait du chloroforme d'Et (CEET) a inhibé la croissance des microorganismes testés, la meilleure activité antibactérienne a été observée contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Morganella morganii* avec des diamètres de zone d'inhibition de 30, 24, 22, 20 et 20 mm, respectivement, avec une valeur de CMI de $80 \text{ g} / \text{ml}$ [37].

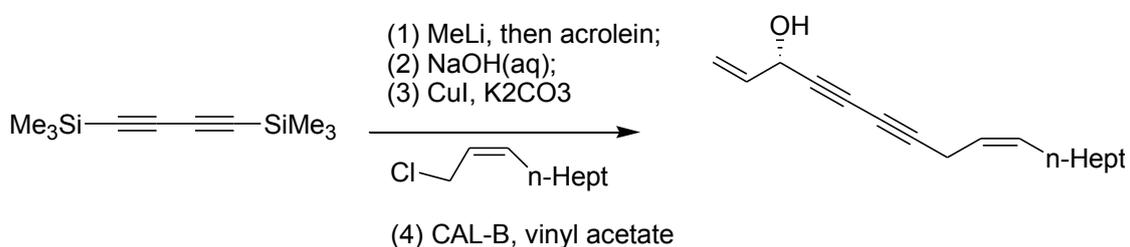
4.3.2. Les propriétés biologiques du falcarinol :

Dans l'alimentation humaine, les carottes et les plantes destinées à la consommation humaine de la famille des *Apiacées* constituent les principales sources alimentaires de polyacétylènes de type falcarinol [41-42-43], en particulier le falcarinol et le falcarindiol [43]. Le falcarinol (FaOH) et le falcarindiol (FaDOH) sont des oxylipines polyacétyléniques cytotoxiques et anti-inflammatoires, que l'on trouve couramment dans la famille des carottes (*Apiaceae*). FaOH et FaDOH ont déjà démontré un effet chimio-préventif sur les lésions précurseurs du cancer colorectal [44-45].

Le falcarinol possède un effet inhibiteur sur la lignée cellulaire ABCG2 (cancer du sein) avec un $IC_{50} = 19,3-79,3 \mu M$ [46], Sur la lignée cellulaire de leucémie aiguë lymphoblastique CEM-C7H2 avec un $IC_{50}=3.5 \mu mol/L$ [42], les cellules TNF- α in L929 avec $IC_{50}=4.8\mu M$, ce composé possède aussi une activité Anti-inflammatoire avec $MEC=5\mu M$ [41-47-48]. Le falcarinol est un pesticide naturel et possède une activité nématocide contre *Bursaphelenchus xylophilus* et *Meloidogyne incognita* avec une concentration $C=1,06-4,96 \mu g / mL$ [49]. Ce polyacétylène possède une activité cytotoxique contre *T. b. brucei* a une concentration de $0.01 \mu g/mL$ [50] et contre *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* $MICs= 25.6 \mu M$ et $IC_{50s}=15.3 \mu M$ [43]. Un effet hormesis a été observé pour tous les polyacétylènes isolés lorsqu'elles sont ajoutées aux cellules Caco-2 à des concentrations allant de $1 \mu g / mL$ à $20 \mu g / mL$. Le pouvoir inhibiteur était falcarinol > panaxydol > falcarindiol. Aucun effet hormesis n'a été observé lorsque les polyacétylènes sont ajoutés aux cellules FH 74 Int (intestin grêle). Une réponse de croissance inhibitrice a été observée au-dessus de $1 \mu g / mL$. Le pouvoir inhibiteur relatif était panaxydol > falcarinol > falcarindiol. Maximum l'inhibition à $20 \mu g / mL$ correspondait à environ 95% et 80% d'inhibition de la prolifération cellulaire chez les cellules normales et cellules cancéreuses, respectivement [51]. Des combinaisons de falcarinol et de falcarindiol ajoutées à des cellules normales et cancéreuses ont montré une réponse

synergique pour l'inhibition de la croissance cellulaire [51]. De plus, la forme oxydée du falcarinol, le falcarinon, ont montré un effet inhibiteur de croissance significativement moins important dans l'intestin [51]. Le falcarinol présente une meilleure activité antibactérienne globale avec des CMI= 18,8-37,6 µg/mL [52] et l'activité antimycobactérienne contre *M. fortuitum* et *M. aurum* avec des CMI= 16,4 µM [53].

Le falcarinol est une molécule assez intéressante donc la chimie organique a mis en évidence des méthodes pour la synthèse du falcarinol [54-55-56-57] et la synthèse de ces analogues afin de pouvoir augmenter l'activité biologique [54-58-59].



Schema 3 : Courte synthèse de Falcarinol [55]

II. Préparation et analyse des huiles essentielles :

Les premières enquêtes systématiques sur les constituants des huiles essentielles peuvent être attribuées au chimiste français M. J. Dumas (1800-1884), qui a analysé certains hydrocarbures et oxygène ainsi que des constituants contenant du soufre et de l'azote [60]. Il publia ses résultats en 1833 [60]. Le chercheur français M. Berthelot (1859) caractérisa plusieurs substances naturelles et leurs produits de réarrangement par rotation optique [60]. Cependant, les investigations les plus importantes ont été effectuées par O. Wallach, assistant de Kekule. Il s'est rendu compte que plusieurs terpènes décrits sous des noms différents selon leurs sources botaniques étaient souvent chimiquement identiques [60]. Il a donc tenté d'isoler les différents composants de l'huile et d'étudier leurs propriétés fondamentales. Il a employé avec ses collègues hautement qualifiés la distillation fractionnée pour séparer les huiles essentielles et a effectué des réactions avec des réactifs inorganiques pour caractériser les

fractions individuelles obtenues [60]. À cette époque, on connaissait des hydrocarbures présents dans les huiles essentielles de formule moléculaire $C_{10}H_{16}$, nommés par les terpènes Kekule en raison de leur présence dans l'essence de térébenthine. Les constituants de formules moléculaires $C_{10}H_{16}O$ et $C_{10}H_{18}O$ étaient également connus à cette époque sous le nom générique de camphre et étaient manifestement liés à des terpènes [60]. En 1891, Wallach caractérisa les terpènes pinène, camphène, limonène, dipentène, phellandrène, terpinolène, fenchène et sylvestrène, qui ont été ultérieurement reconnus comme des artefacts [60].

Les cellules contenant des huiles essentielles peuvent être situées dans différentes parties de la plante. Deux types différents de cellules d'huiles essentielles sont connus: les cellules superficielles, par exemple les cellules glandulaires, des poils situés à la surface de la plante, communs à de nombreuses plantes telles que l'origan, la menthe, la lavande, etc.[60] Ainsi que des cellules incrustées dans des tissus végétaux, se présentant sous la forme de cellules isolées contenant les sécrétions (comme dans les feuilles d'agrumes et d'eucalyptus), ou en tant que couches de cellules entourant l'espace intercellulaire (canaux ou cavités sécrétoires), par exemple des canaux résinifères du pin [60]. La plupart des huiles essentielles sont des mélanges complexes d'hydrocarbures terpéniques et sesquiterpéniques et de leurs dérivés oxygénés terpénoïdes et sesquiterpénoïdes (alcools, aldéhydes, cétones, esters et parfois des acides carboxyliques), ainsi que des composés aromatiques (benzénoïdes) tels que des phénols, des éthers phénoliques et des esters aromatiques [60].

1. L'échantillonnage de matériel végétale :

L'échantillonnage est une étape très intéressante dans l'étude phytochimique, c'est l'étude des constituants de la fraction volatile du fait de leur sensibilité aux facteurs environnementaux. Ces derniers peuvent influencer considérablement la quantité mais aussi la qualité des métabolites secondaires des végétaux. Plusieurs études ont montré l'influence du

climat, de l'exposition lumineuse, des conditions édaphiques (liés à la nature du sol) ou encore de l'état végétatif de la plante [39]. Il existe plusieurs plantes dont la composition chimique en huiles essentielles varie selon le stade de développement des fleurs. Cette variation s'observe au travers de la couleur des huiles essentielles produites durant le cycle de maturité des fleurs [39]. Il est donc indispensable d'être particulièrement vigilant quant à la détermination botanique, à la phénologie, à la période de récolte et au recueil d'informations relatives à l'environnement afin d'être en mesure d'expliquer les éventuelles variations de composition en métabolites volatils [39].

2. Préparation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des substances plus ou moins volatiles ayant un impact plus ou moins odorant, produites par: distillation à la vapeur ou distillation à sec ou au moyen d'un traitement mécanique d'une seule espèce [60].

2.1. L'hydrodistillation :

Historiquement, l'hydrodistillation a été la première méthode employée pour la préparation d'une huile essentielle et c'est encore aujourd'hui la méthode de référence. L'hydrodistillation est une distillation hétérogène. L'eau recouvrant le matériel végétal est portée à ébullition sous pression atmosphérique [61]. Une fois libérés, sous forme d'un mélange azéotropique, les composés volatils contenus dans des glandes sécrétrices, sont entraînés mécaniquement par la vapeur d'eau [61]. Dans le « système Clevenger » préconisé par la pharmacopée européenne, l'eau distillée est recyclée dans le bouilleur par cohobage. Après refroidissement, le mélange eau-huile essentielle se sépare par décantation. Le système Clevenger permet ainsi la conservation d'une quantité d'eau identique durant toute la durée de l'extraction [61].

2.2. Expression à froid

Le procédé de l'expression à froid est plus rentable que l'hydrodistillation pour l'obtention des huiles essentielles de zestes d'hespéridés [61]. Le principe est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois, via une gamme variée d'appareillage [61].

II.2.3. Technique d'extraction au CO2 supercritique

L'extraction par les fluides supercritique et plus spécifiquement le dioxyde de carbone s'est développée à partir des années 70 [61]. Les principaux avantages de cette technique résident dans l'utilisation de fluides supercritiques qui présentent l'avantage d'avoir une vitesse de diffusion dix fois supérieure et une viscosité dix fois inférieure à celles des solvants liquides [61]. Ces caractéristiques permettent d'extraire avec facilité, notamment, les molécules d'intérêt tels que les hydrocarbures aromatiques bicycliques, les pesticides, les polychlorobiphényles mais aussi les caroténoïdes, les flavonoïdes et les terpènes dans les huiles essentielles et cela sans dégradation thermique [61]. Les fluides supercritiques ont des propriétés se situant entre celles d'un gaz et celles d'un liquide. Ils ont ainsi une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle du liquide avec un meilleur pouvoir de diffusion. Le point critique est atteint lorsque le changement d'état liquide-gaz n'est plus observé. Le fluide est alors dans un état supercritique intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux (pour CO₂ : 303 K, 73,8 bars) tout en restant à basse température par rapport à l'hydrodistillation. Le principal désavantage de cette technologie réside dans son coût élevé à l'achat [61].

II.2.4.L'extraction assistée par micro-ondes

Les différentes techniques d'extraction assistée par microondes ont été développées depuis et de plusieurs brevets ont été déposés [61]. Elle a été présentée pour la première fois en 1986 par Ganzler *et al.* et Lane et Jenkins furent. D'une manière générale, les micro-ondes

interagissent simultanément et sélectivement par rotation dipolaire et conduction ionique avec les molécules polaires présentes dans les glandes sécrétrices du végétal entraînant un échauffement localisé suivi d'une expansion puis d'une rupture des membranes cellulaires [61]. D'une manière générale, par rapport à une hydrodistillation classique, les avantages de cette technique sont la rapidité, l'atténuation des risques d'altération thermique et la présence en plus grande quantité de composés oxygénés. Une revue détaillée des diverses techniques d'extraction assistée par microondes a été présentée par Marie Lucchesi dans sa thèse de doctorat :

- le mode « MAE » (Microwave Assisted Extraction) : les analytes sont libérés dans le solvant, il ne s'agit plus d'une huile essentielle mais bien d'un extrait au solvant [61]. Ce procédé présente un grand intérêt notamment pour l'extraction de composés thermosensibles puisqu'en utilisant un solvant de faible constante diélectrique ce dernier reste froid [61].
- Le mode « VMHD » (Vaccum Microwave HydroDistillation) ou hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé, est une technique d'extraction qui s'inspire de l'hydrodistillation classique ; elle est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé [61]. L'extraction est dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement similaire. Les composés les plus thermosensibles semblent être conservés après extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique [61].
- Le mode « SFME » (Solvent Free Extraction Microwave Extraction) est le mode d'extraction le plus récent. Ce mode décrit par Lucchesi et *al.* est mis en oeuvre sans ajout de solvants organiques, par simple humidification du végétal sec avant extraction [61]. Dans ce cas, l'eau localisée en surface du végétal s'échauffe libérant ainsi les composés volatils qui sont récupérés par distillation. Le procédé ne correspond ni à une extraction assistée par micro-ondes classique consommatrice de solvant, ni à une hydrodistillation consommatrice d'eau, mais s'avère être une originale combinaison entre un chauffage par micro-ondes et une

distillation à sec sous pression atmosphérique [61]. Les principaux avantages de cette technique résident dans la faible durée d'extraction (30 minutes en moyenne), son caractère respectueux de l'environnement mais également la diminution du risque d'altération thermique des composés. Les rendements sont similaires voire supérieurs à ceux obtenus par hydrodistillation et la proportion de composés oxygénés est plus importante que dans les huiles essentielles classiques [61].

2. L'analyse des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des produits fragiles et très sensibles aux agressions extérieures [60]. La production et l'émission des composés volatils d'une plante sont affectés par des facteurs extérieurs comme, la température, le stress hydrique et la présence de polluants [60]. L'étude de la composition chimique de ces matrices ne s'avère donc pas chose facile, elle nécessite des appareils analytiques performants et des méthodes adaptées capables d'identifier les composés sans causer d'altérations ou de modifications sur leurs structures. Donc Une bonne connaissance de la théorie chromatographique est en effet un support précieux pour le processus d'optimisation de la méthode, ainsi que pour le développement de techniques innovantes [60]. En outre, il est indispensable de maîtriser l'ensemble des étapes de la séquence analytique, de l'échantillonnage jusqu'à la conservation [60].

3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

En analyse chromatographique en phase gazeuse, les composés à analyser sont vaporisés et élués par la phase gazeuse mobile, le gaz vecteur, à travers la colonne. Les analytes sont séparés en fonction de leurs pressions de vapeur relatives et de leurs affinités pour le lit fixe. En revanche, en chromatographie liquide, les composés sont élués par une phase liquide constituée d'un solvant ou d'un mélange de solvants dont la composition peut varier au cours de l'analyse (élution par gradient), et sont séparés en fonction de leur composition. En général, la fraction volatile d'une huile essentielle est analysée par GC, tandis que la fraction

non volatile par chromatographie en phase liquide (LC) [60]. L'analyse des huiles essentielles par GC a commencé dans les années 50, lorsque James et Martin ont décrit pour la première fois la chromatographie en phase gazeuse, communément appelée GC [60]. La CPG est une méthode d'analyse pour séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans ce domaine avec la présence de plus en plus fréquente de « *fast GC* » raccourcissent considérablement le temps d'analyse tout en conservant une bonne efficacité de séparation. La CPG-DIF (détecteur à ionisation de flamme) permet une analyse quantitative ; elle fournit le pourcentage relatif de chaque signal par rapport à l'ensemble des signaux du mélange analysé. Cette méthode est utilisée dans notre ouvrage [61].

Elle permet, également, une analyse qualitative sur la base des temps de rétention. Ceux-ci, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes. Pour une colonne donnée, chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Ces derniers demeurent constants dans la mesure ou la programmation de température reste identique ; ils sont calculés sur colonne polaire (I_{rp}) et apolaire (I_{ra}) et sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans une bibliothèque de référence propre au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou encore reportés dans la littérature [61].

3.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) :

La spectrométrie de masse (MS) peut être définie comme l'étude de systèmes par la formation d'ions gazeux, avec ou sans fragmentation, qui sont ensuite caractérisés par leurs

rapports masse / charge (m/z) et les abondances relatives. L'analyte peut être ionisé thermiquement, par un champ électrique ou par impact d'électrons, d'ions ou de photons énergétiques. Au cours de la dernière décennie, la popularité des spectromètres de masse a considérablement augmenté comme outil à la fois pour les expériences analytiques de routine et la recherche fondamentale. Cela est dû à un certain nombre de fonctionnalités, notamment un coût relativement bas, une conception simple et des taux d'acquisition de données extrêmement rapides. Bien que l'échantillon soit détruit par le spectromètre de masse, la technique est très sensible et seules de faibles quantités de matériau sont utilisées dans l'analyse. De plus, le potentiel de la chromatographie en phase gazeuse combinée avec la spectrométrie de masse (GC-MS) pour la détermination de composés volatils, contenus dans des échantillons d'arôme et de parfum très complexes, est bien connu. L'introduction ultérieure de puissants systèmes d'acquisition et de traitement de données, y compris des techniques de recherche automatisée dans les bibliothèques, a permis d'exploiter pleinement le contenu en informations des grandes quantités de données générées par les instruments GC-MS. La méthode d'identification la plus fréquente et la plus simple en GC-MS consiste à comparer les spectres de masse inconnus acquis avec ceux contenus dans une bibliothèque de référence MS. Un spectromètre de masse produit une énorme quantité de données, en particulier en combinaison avec prises d'échantillons chromatographiques. Au fil des ans, de nombreuses approches pour l'analyse des données GC-MS ont été proposées à l'aide de divers algorithmes, dont beaucoup sont sophistiqués, visant à détecter, identifier et quantifier tous les pics chromatographiques. Les algorithmes de recherche dans les bibliothèques sont généralement fournis avec des systèmes de données de spectromètre de masse dans le but de faciliter l'identification des composés inconnus. Cependant, comme on le sait bien, les composés tels que les isomères peuvent être identifiés de manière incorrecte lors de l'analyse au moyen de la GC-MS. un inconvénient qui est souvent observé dans l'analyse des huiles

essentielles. Comme il est largement reconnu, la composition des huiles essentielles est principalement représentée par les terpènes, qui génèrent des spectres de masse très similaires; par conséquent, un facteur d'appariement favorable n'est pas suffisant pour l'identification et l'affectation des pics devient une tâche difficile, voire irréalisable. Afin d'accroître la fiabilité des résultats analytiques et d'aborder la détermination qualitative des compositions des échantillons complexes par GC-MS, les indices de rétention peuvent être un outil efficace. L'utilisation d'indices de rétention en association avec les informations structurales fournies par la GC-MS est largement acceptée et couramment utilisée pour confirmer l'identité des composés. On peut observer que le spectre de masse d'un sesquiterpène donné est généralement suffisant pour garantir son identification lorsqu'il est associé à son indice de rétention obtenu sur des phases stationnaires de méthylsilicone. En effet, pour la classe de composés susmentionnée, il ne serait pas nécessaire d'utiliser une phase de polyéthylèneglycol, ce qui pourrait même conduire à des interprétations erronées causées par des modifications possibles du comportement de rétention des hydrocarbures sesquiterpènes à la suite du vieillissement ou de la détérioration de la colonne [60].

Deux modes d'ionisation sont possibles : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Dans ce dernier cas, on distingue l'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN).

❖ **CPG/SM en mode « Impact Electronique » (CPG/SM-IE) :** En mode impact électronique (IE), l'ionisation des substances sortant de la colonne capillaire se fait par bombardement à l'aide d'un faisceau d'électrons d'énergie de 70 eV provenant d'un filament chauffé. Les fragments ioniques positifs ainsi obtenus, dont éventuellement l'ion moléculaire, forment le spectre de masse du composé. Les spectres de masse ainsi obtenus sont comparés avec ceux des produits de référence contenus dans des bibliothèques informatisées commerciales riches de plusieurs milliers de composés. En mode IE, il se présente des difficultés qui sont dues

principalement à la similitude des spectres de masse. C'est le cas de composés proches d'un point de vue structural et à la faible intensité voire à l'absence du pic moléculaire sur le spectre de masse [61].

❖ **CPG/SM en mode « Ionisation Chimique » (CPG/SM-IC) :** l'ionisation chimique comprend l'ensemble des réactions ions-molécules entre les molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactif. Cette technique a trouvé de nombreuses applications chimiques et biochimiques dans les domaines de l'environnement et du médical. La technique d'ionisation Chimique Positive ICP consiste, dans un premier temps, à ioniser le gaz réactif X par impact électronique pour donner X⁺. qui réagit ensuite avec les molécules de gaz réactif par le biais de collisions produisant le gaz réactif ionique appelé « plasma d'ionisation » et composé majoritairement d'ions XH⁺. Les ions XH⁺ ainsi formés, d'énergie moindre que les électrons qui leur ont donné naissance, réagissent avec la substance M étudiée selon des réactions de types ions-molécules engendrant peu de fragmentations. Cette ionisation est régie par les affinités protoniques de X et de M. L'ionisation Chimique Négative (ICN) est liée à deux processus distincts. Dans le cas d'une interaction électrons-molécules, l'ionisation chimique a lieu par capture électronique tandis que dans le cas d'une interaction ions-molécules, l'ionisation chimique est produite par des ions réactants. Dans ce dernier cas, le processus est analogue à celui de l'ICP. Parmi les gaz réactifs, l'ammoniac est le plus fréquemment utilisé pour la formation des ions quasi moléculaires [M-H] [61].

II.3.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La RMN est la technique spectrométrique de choix pour la caractérisation des molécules organiques; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules. Une alternative aux méthodes d'analyse chromatographiques décrites supra est la RMN du carbone-13 des mélanges, sans

individualisation des constituants. Cette technique, initiée par Formáček et Kubeczka, développée par Casanova et *al.* Offre d'intéressantes potentialités [61].

La RMN du carbone-13 des mélanges s'est montrée particulièrement utile pour :

-la différenciation et l'identification de molécules structurellement très proches (ie : stéréoisomères) comme le montrent les travaux réalisés sur les isomères du menthol, du dihydrocarvéol et sur leurs acétates ou ceux portant sur les cédrènes et les funébrènes qui ne diffèrent que par la jonction des cycles. [61].

- l'identification des composés qui coéluent en CPG.

- l'identification de deux sesquiterpènes furaniques, molécules thermosensibles, dans l'huile essentielle de *Smyrnia olusatrum* a été rendue possible par cette technique ; le furanodiène se réarrange en furanoélémane et cette transposition de Cope se produit principalement dans l'injecteur de la CPG [61].

Cette méthode trouve ses limites pour les produits présents dans le mélange avec une abondance relative trop faible alors même que l'analyse chromatographique est encore opérante. La complémentarité des deux méthodes a montré son efficacité pour l'analyse d'un grand nombre d'huiles essentielles de plantes aromatiques [61].

La RMN bidimensionnelle conduit à des spectres de corrélation proton-proton (COSY et NOESY) et proton-carbone (HSQC et HMBC) et permet de mettre en évidence des interactions (directes et indirectes) entre les noyaux. Elle fournit des renseignements très précis sur la structure moléculaire. La séquence HSQC permet de savoir à quel carbone est lié chaque proton (couplage 1JCH). Les séquences COSY (3JHH) et HMBC (2JCH-4JCH) autorisent la construction du squelette de la molécule. La séquence NOESY peut fournir de nombreuses informations sur l'orientation spatiale des protons et donc sur la stéréochimie de la structure. [61].

- les spectres de corrélation carbone-carbone (INADEQUATE : 1JCC) permettent de construire pas à pas le squelette carboné de la molécule. Cependant, leurs enregistrements nécessitent une importante quantité de produit, ce qui limite l'utilisation de cette technique. [61].

4. Séparation des constituants préalablement à leur identification

Lorsque les constituants identifiés représentent moins de 90% en masse de l'huile essentielle totale après analyse, on procède à un fractionnement de cette huile essentielle par distillation fractionnée et/ou par une ou plusieurs techniques chromatographiques (CC, CCM, HPLC, CPG préparative). Chaque fraction, est un mélange moins complexe avec un nombre moins important de coélutions. Un grand nombre d'huiles essentielles, plus ou moins complexes, ont été étudiées selon cette voie. (Bicchi et al) pour l'analyse poussée de l'huile essentielle d'*Artemisia roxburghiana*. Le fractionnement poussé de l'huile essentielle (80 g), mené par distillation fractionnée sous vide, CC et CCM préparatives, a permis l'identification de 108 constituants, principalement par comparaison des indices de rétention en CPG et des spectres de masse en CPG/SM. Les composés isolés ont été identifiés sur la base de leurs données spectrales de masse et de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13. Ainsi, ce n'est pas moins de 150, 160 et 170 composés qui ont été identifiés respectivement dans les huiles essentielles de *Pulicaria gnaphalodes*, d'*Artemisia sieberi* et du Lantana du Brésil [61].

III. Méthodologie d'analyse pour l'identification des constituants volatils d'un mélange complexe:

L'huile essentielle ou la fraction volatile est analysée par CPG-Ir d'une part, et par CPG/SM-IE, d'autre part (figure 13). Le calcul des indices de rétention sur colonne polaire et apolaire ainsi que la quantification des composés s'effectuent par CPG-DIF. L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants individualisés qui sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, l'une élaborée au laboratoire

: bibliothèque « Arômes » et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées [König-Joulain, Wiley, Adams, Nist]. Chaque proposition du logiciel de comparaison des spectres de masse est assortie d'une note de concordance qui reflète la validité de la structure proposée. Si la note de concordance est correcte, on compare les indices de rétention du constituant proposé à ceux présents dans la bibliothèque élaborée au laboratoire, ou dans des bibliothèques commerciales [Joulain, NIST], ou répertoriés dans la littérature [59]. La bibliothèque « Arome » construite dans le laboratoire CPN (Chimie des produits Naturels) de l'Université de Corse (France), et reproduite partiellement au laboratoire COSNA (Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses) de l'Université de Tlemcen, est élaborée à partir de spectres de masse enregistrés dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'analyse des mélanges complexes, assurant ainsi une fiabilité accrue dans l'identification. Elle contient actuellement les indices de rétention sur deux colonnes de polarité différentes et les spectres de masse de plus de 1300 composés volatils dont plus de 900 molécules terpéniques. Cette bibliothèque a été constituée à partir de molécules disponibles dans le commerce et elle est enrichie continuellement par des molécules isolées par fractionnement à partir des huiles essentielles ou encore obtenues par héli-synthèse et dans tous les cas, identifiées par RMN [2].

Toutefois, on ne se limite pas simplement à la note de concordance ; on procède systématiquement à l'examen du spectre de masse du composé recherché afin d'en tirer les principales informations : masse de l'ion moléculaire et fragmentations caractéristiques. A ce stade, trois cas peuvent se présenter :

(a), le spectre de masse du constituant individualisé et ses indices de rétention coïncident à ceux d'un composé présent dans la bibliothèque élaborée au laboratoire. L'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté de façon suffisamment fiable pour rendre inutile toute autre opération. [61].

(b), les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé de la bibliothèque « Arômes » mais correspondent à celles d'un composé présent dans les bibliothèques commerciales (ou dans la littérature). Dans ce cas, par l'étude des fragmentations principales, nous vérifions si le spectre de masse du produit proposé est bien en accord avec la structure de ce dernier. Cette approche mécanistique peut être complétée, lorsque cela s'avère possible, soit par une hémisynthèse suivie de l'exploitation de l'analyse du composé synthétisé, soit par une analyse par RMN du carbone 13 [61].

(c), aucune proposition fiable de structure n'est faite par aucune des bibliothèques. Dans le cas d'une huile essentielle, il convient de fractionner afin d'obtenir le composé aussi pur que possible dans une fraction afin de la soumettre à l'analyse structurale par RMN. Cette complémentarité peut être mise à profit pour obtenir une information plus fiable sur plusieurs points :

- la détermination de la masse moléculaire si le pic moléculaire n'est pas observable sur le spectre de masse en mode IE ;
- l'identification des groupes fonctionnels présents dans la molécule, basée sur les fragmentations caractéristiques des différentes familles de composés ;
- la stéréochimie des composés à partir des intensités relatives de certains pics caractéristiques. [61].

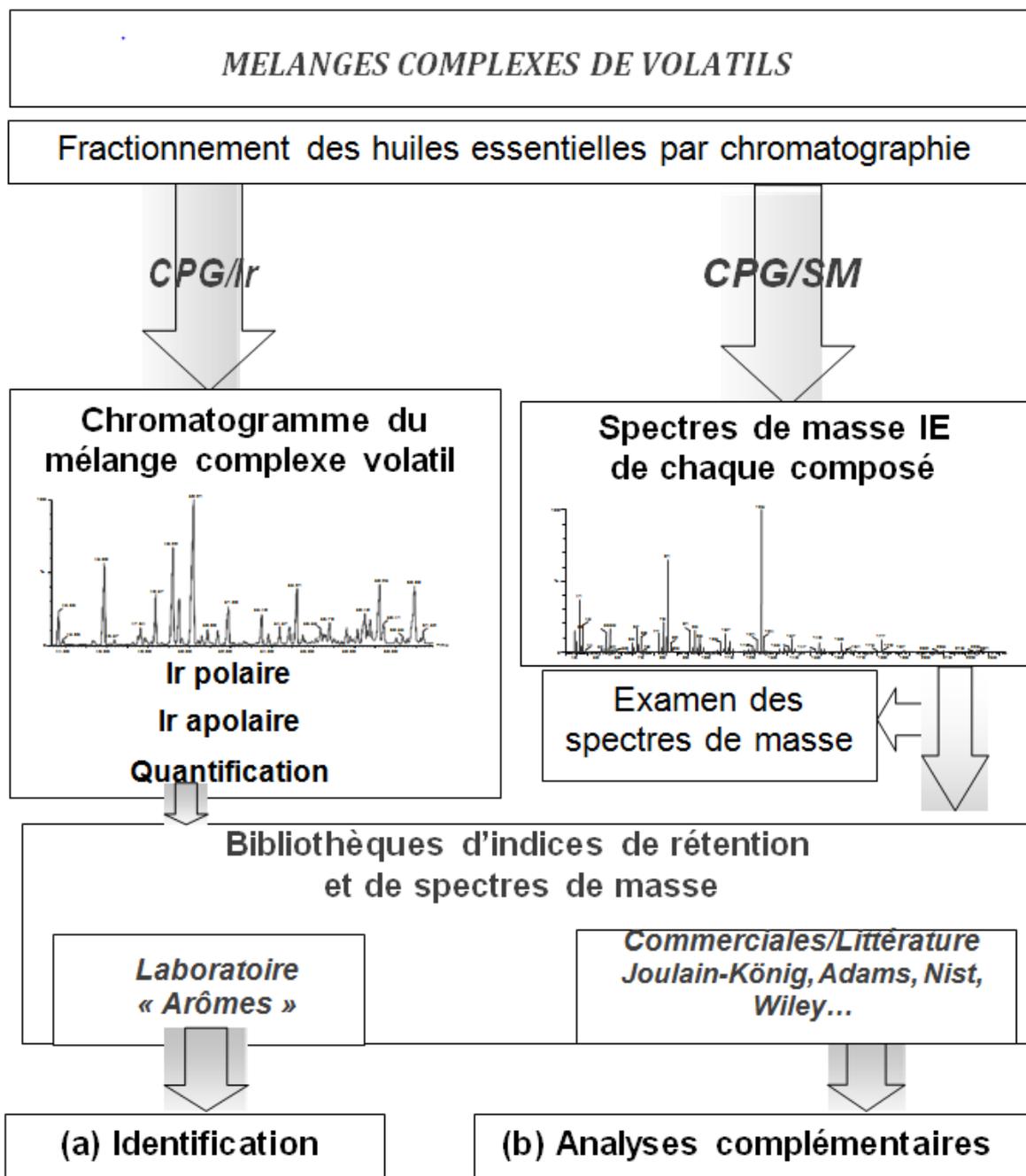


Figure 13: Identification des constituants d'une huile essentielle et d'une fraction volatile concentrée par MEPS, par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM [39,61].

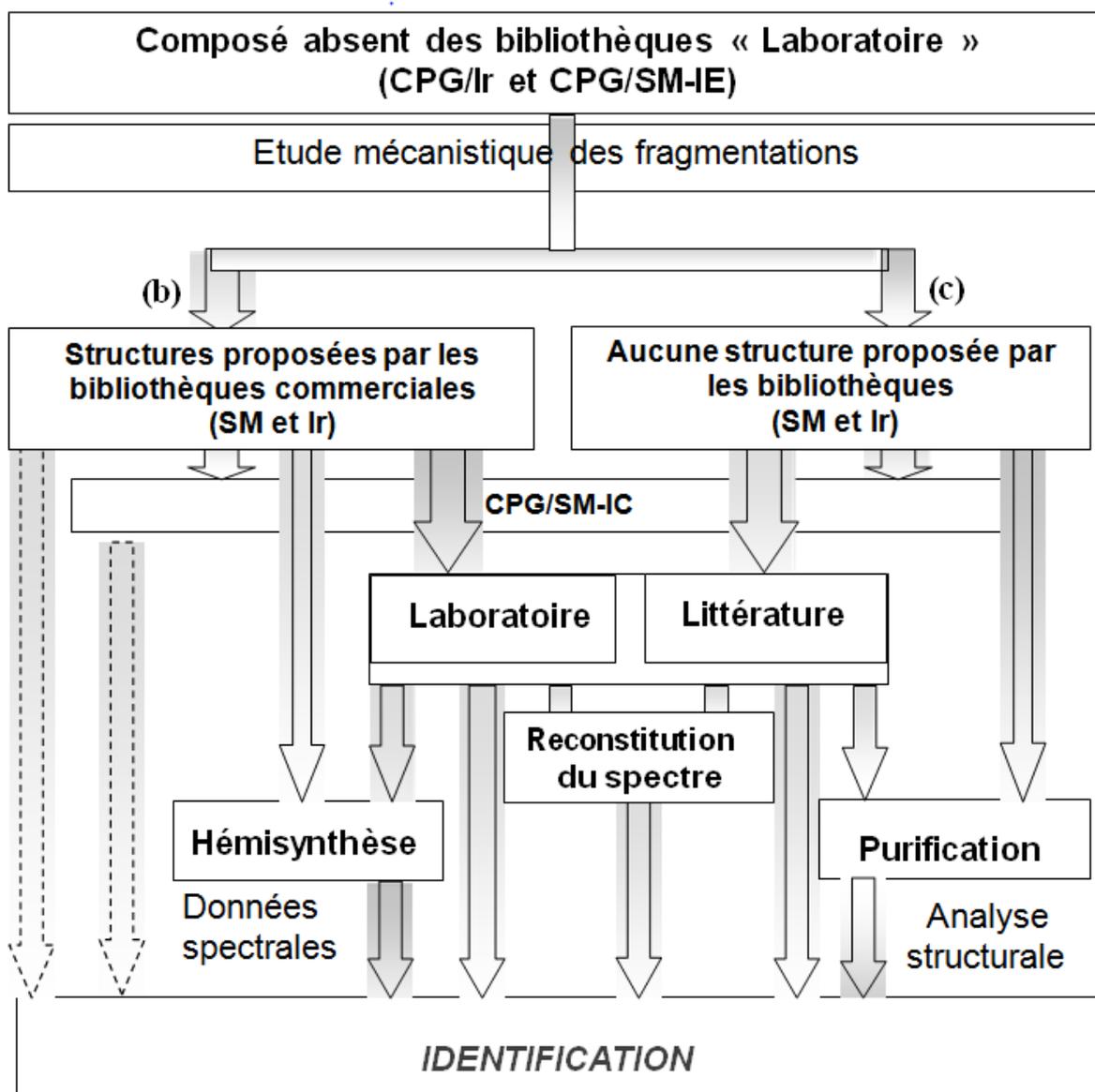


Figure 14 : Méthodes d'analyses complémentaires des constituants d'une huile essentielle [39,61].

IV. Activité biologique :

L'étude des activités biologiques des huiles essentielles est l'un des principaux moyens de valoriser commercialement ces dernières ou d'expliquer son utilisation en médecine traditionnelle [61]. Les plantes sont une source incontournable de molécules d'intérêt pouvant agir d'une manière efficace comme agents anticancéreux, anti-infectieux, antioxydant, etc.....

IV.1. Activité antioxydante :

Les cellules et les tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant [62].

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié [63]. Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [64]. Ces espèces radicalaires sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, conduit à un stress oxydatif qui est un déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [62-60]. En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques. La conséquence de ce déséquilibre est que tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN [65-66]. Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies [67]. Parmi ces maladies, nous citons, les maladies d'Alzheimer [68], de Parkinson [69] de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites, [70] maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque [71], les oedèmes, vieillissement prématuré de la peau [72] et le cancer [70].

Une molécule antioxydante est une substance chimique naturelle ou synthétique qui empêche ou inhibe les réactions d'oxydation de type radicalaire. Ces composés font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme conservateurs dans les denrées

alimentaires, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies [72]. C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

Il existe trois méthodes pour déterminer l'activité antioxydante :

a)- La méthode par le radical DPPH :

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC₅₀, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue [73].

Généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (IC₅₀), (des comparaisons d'IC₅₀ sont réalisées), le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale. En ajoutant une référence connue, on pourrait standardiser la méthode, en ramenant par exemple les résultats à un équivalent Trolox (antioxydant) [74]. Cette méthode est très utilisée pour étudier des extraits végétaux et alimentaires pour mesurer la capacité antioxydante totale.

b)- Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique :

Le β -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits [74]. Cependant, dans le test du blanchiment du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système (sous forme d'émulsion aqueuse) en résultant le blanchiment du β -carotène [73]. La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β -carotène

en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système [75].

c)- Réduction du fer (FRAP) :

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, évalue la réduction du fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) en présence d'un antioxydant [76]. Une molécule change de couleur une fois qu'elle est réduite, ce qui permet la quantification par spectrophotométrie (UV-visible). C'est une méthode simple, rapide, peu coûteuse et robuste. En revanche, cette méthode n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant les thiols (SH), qui peuvent transférer l'hydrogène. Pour cette raison, le test FRAP sous-estime souvent l'activité antioxydante du sérum sanguin [77].

IV.2. Activité antibactérienne :

IV.2.1. Activité antibactérienne contre les souches pathogènes :

Les huiles essentielles sont recherchées pour leurs propriétés antimicrobienne et antiparasitaire. Les terpènes ou terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. De 1977 jusqu'au 1999 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries. Le triterpénoïde, l'acide betulinique est de juste un de plusieurs terpénoïdes qui ont montrés une action inhibitrice envers HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles [78].

a-Méthode de diffusion sur gel.

Des disques de papier buvard imprégnés des matrices à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, la matrice diffuse de manière uniforme si bien que sa concentration est inversement proportionnelle à la distance du disque. Après incubation, les

disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Pour les tests standards, on considère qu'une huile essentielle, fraction ou molécule est active pour une souche donnée si le diamètre d'inhibition est supérieur ou égal à 15 mm.

Cette technique est la plus couramment utilisée dans le domaine de recherche des huiles essentielles, elle présente l'avantage d'être rapide, d'une grande simplicité à mettre en oeuvre et de nécessiter qu'une faible quantité de matrice. S'agissant des inconvénients, une huile très visqueuse, voire une huile qui cristallise, aura un diamètre d'inhibition faible ou nul même si elle est fortement bactéricide. Cela est dû, dans ces cas à un problème de diffusion sur le gel [61].

b-Méthode de dilution en milieu liquide.

Cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes de matrice à tester, selon une progression géométrique [61]. L'inoculum bactérien est distribué de façon égale dans une série de tubes (méthode de macrodilution) contenant la matrice testée. Après incubation, la Concentration Minimal Inhibitrice (CMI) est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration de matrice où aucune croissance n'est visible. Pour les tests standards, on considère qu'une huile essentielle, fraction ou molécule est active pour une souche donnée pour une CMI inférieure à 1000 µg/ml. Cette technique, complémentaire de la méthode de diffusion, donne directement la CMI mais, par rapport à la méthode précédente, présente l'inconvénient d'être grande consommatrice en temps d'expérience et en quantité de matrice nécessaire. [61].

IV.2.2. Activité antibactérienne contre les souches phytopathogènes :

Il existe un intérêt croissant pour le développement de nouveaux agents antibactériens capables de contrôler les bactéries phytopathogènes sans effets environnementaux. Différentes études démontrent que certaines plantes médicinales produisent de nombreux composés biologiquement actifs, sources d'une grande importance pour la recherche de

nouveaux agents antimicrobiens [79]. Ces composés, dérivés de plusieurs voies métaboliques secondaires, comprennent les alcaloïdes, les flavonoïdes, les lignines, les composés phénoliques et les terpénoïdes [79]. Récemment, les propriétés antimicrobiennes de divers extraits de plantes contre certains agents pathogènes ont été rapportées. Les composés phénoliques jouent souvent un rôle important dans la résistance de nombreux agents phytopathogènes, y compris la résistance de la pomme de terre au *pectobacterium atrosepticum*. Les composés phénoliques peuvent inhiber directement la croissance bactérienne, en inhibant les enzymes qui dégradent les parois, ou comme précurseurs dans la formation de barrières physiques telles que la lignine [79].

Pectobacterium atrosepticum, anciennement *Erwinia carotovora subs. atroseptica*, infecte presque exclusivement la pomme de terre, causant la jambe noire pourriture molle de la tige et du tubercule. En conséquence, il provoque des pertes importantes dans les régions tempérées froides, où la culture de la pomme de terre a toujours été traditionnelle. Il n'y a pas actuellement une méthode efficace curatives de protection de la pomme de terre contre *Pectobacterium spp.* Bien que les composés du cuivre réduisent la propagation de ces agents phytopathogènes, ils peuvent causer des dommages environnementaux et présenter un risque pour la santé humaine [79].

Pseudomonas cichorii est une bactérie de Gram négatif très polyphage, qui est largement répandue dans le monde et sur pratiquement tous les continents (Japon, USA, Italie, Portugal, Espagne...). Elle est responsable des taches bactériennes et des nervures noires de laitue [80]. Elle sévit de temps à autre en association avec une ou plusieurs bactéries décrites sur salade. En France, comme dans de nombreux pays, on la rencontre surtout à l'automne et durant l'hiver sur des salades plutôt âgées. Elle a une vaste gamme de plantes hôtes et peut avoir des effets économiques importants sur des cultures maraichères [80].

IV.3. Activité antifongique :

Les plantes aromatiques sont de plus en plus utilisées pour le stockage agro-alimentaire et la lutte contre les ravageurs de la bio-agriculture. Les huiles essentielles et les composants volatils extraits de ces plantes sont largement utilisés en tant que nouveaux agents de substitution à la lutte biologique contre les souches microbiennes et les insectes nuisibles, en raison de leur spécificité d'action, de leur nature biodégradable et de leurs applications commerciales [81].

a-Méthode de fumigation :

Cette méthode consiste à évaluer l'activité antifongique du fumigant sur la base de la capacité des huiles essentielles à inhiber la croissance mycélienne [81]. Un tampon mycélien de 3 mm de diamètre de chaque agent pathogène issu d'une culture âgée de 7 jours a été placé au centre du milieu dans une boîte de pétrie. Les huiles essentielles ont été introduites sur un disque en cellulose de 6 mm, placé sur le couvercle de la boîte de Petri [81]. Un contrôle négatif (disque de cellulose sans huile essentielle) a été réalisé de la même manière. Les boîtes de Pétri ont ensuite été scellées avec du parafilm et incubées à 23 ° C dans l'obscurité [81]. La croissance radiale du mycélium a été mesurée après 3 à 7 jours d'incubation et l'indice antifongique a été calculé avec la formule comme suite :

$$\text{Indice antifongique (\%)} = (1 - \text{Dex}/\text{Dc}) \times 100$$

Où Dex est le diamètre de la zone de croissance de la plaque expérimentale (cm) et Dc est le diamètre de la zone de croissance de la plaque témoin (cm) [81]

b-Méthode de contact :

Cette méthode a le même principe que la méthode précédente. Les huiles essentielles ont été introduites sur un disque en cellulose de 6 mm placé au centre du milieu de gélose dans une boîte de pétrie [82]. Un tampon mycélien de 3 mm de diamètre de chaque agent pathogène issu d'une culture âgée de 7 jours a été placé au centre du milieu. Contrôles

négatifs réalisé de la même manière [82]. La croissance radiale du mycélium a été mesurée après 1 à 6 jours d'incubation à 23 ° C à l'aide d'un compas d'épaisseur numérique permettant de calculer l'indice antifongique avec la formule suivante:

$$\text{Indice antifongique (\%)} = (1 - \text{Dex}/\text{Dc}) \times 100$$

Où Dex est le diamètre de la zone de croissance de la boîte expérimentale (cm) et Dc est le diamètre de la zone de croissance de la boîte témoin (cm) [82]

Botrytis cinerea est largement distribué dans le monde entier; ce champignon provoque ce qu'on appelle la moisissure grise et peut infecter presque toutes les plantes et leurs parties. De plus, il peut provoquer des infections latentes qui endommagent les fruits avant maturation. *B. cinerea* produit une gamme d'enzymes, de toxines et d'autres composés de faible poids moléculaire qui dégradent la paroi cellulaire. Les preuves suggèrent que l'agent pathogène amène l'hôte à déclencher le processus de mort cellulaire programmée en tant que stratégie soulignée [83].

Penicillium expansum affecte la plupart des fruits et légumes. Dans certains fruits, tels que les agrumes, les infections peuvent commencer au champ, mais sont essentiellement des maladies post-récolte et peut souvent provoquer jusqu'à 90% de décomposition en transit, stockage et commercialisation. *Penicillium* pénètre dans les tissus à travers les plaies. Cependant, il peut également se transmettre des fruits infectés à une peau saine au contact, même si la peau n'a pas de plaie ouverte. En plus des pertes causées par la pourriture des fruits et des légumes, *Penicillium* produit également plusieurs mycotoxines qui contaminent les produits à base de fruits sains et de parties pourries. Par exemple, près de 100% des souches de *P. expansum* produisent de la patuline sous forme de toxine [83].

La fusariose est associée à un complexe d'espèces composé de deux genres de champignons phytopathogènes, *Fusarium* et *Microdochium*. Ces deux genres comprennent environ 19 espèces capables d'induisant la fusariose chez le blé. Les espèces les plus

communes en Europe sont *F. graminearum*, *F. Culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *m. nivale* et *m. majus*. Le genre *Fusarium* appartient à la division Ascomycota et à la famille Nectriaceae. Le genre *Microdochium* appartient à la famille des Tuberculariaceae et comprend deux espèces, *M. nivale* et *m. majus*, causant les mêmes symptômes à l'oreille et aux feuilles que *Fusarium*. Plusieurs espèces de *Fusarium*, dont ***Fusarium graminearum*** est la plus représentée, peuvent être trouvées ensemble dans une région donnée, une parcelle ou une oreille, formant ainsi le complexe *Fusarium*. La gravité, l'incidence et la prévalence de chaque espèce varient selon la localisation géographique, les variations climatiques et les pratiques culturales. La présence de plusieurs de ces espèces sur la même oreille est susceptible de modifier leur équilibre et leur dynamique de production de toxines. La fusariose du blé peut dévaster une culture quelques semaines avant la récolte. Il peut être associé à des pertes de rendement élevées (avortement des grains et poids réduit), à une diminution de la qualité germinative ou à une diminution de la qualité en raison de la présence de toxines dans les grains [84]. Il existe d'autres genres de champignons qui affectent le blé comme *Tilletia tritici* qui provoque la carie du blé et ***Zymoseptoria tritici*** qui cause la septoriose du blé [84].

IV.4. Activité herbicide :

L'allélopathie fait référence aux effets bénéfiques ou nocifs d'une plante sur une plante, par le dégagement de produits chimiques de cette plante, notamment par lessivage, exsudation de racines, volatilisation et décomposition [85]. Les principaux effets fréquemment cités sont la germination réduite des graines et la croissance des plantules. En tant qu'herbicides synthétiques, il existe un mode d'action commun ou une destination physiologique pour tous les produits allélochimiques [85]. Cependant, les effets de certains composés allélochimiques incluent des changements dans la division cellulaire [85], la germination du pollen, l'absorption des nutriments, la photosynthèse et une fonction enzymatique spécifique. En tant

qu'inhibiteurs naturels de la germination et de la croissance des plantes, les huiles essentielles interviennent dans les interactions allélopathiques et jouent donc un rôle important dans la structure et la normalisation des communautés végétales. De nombreuses études ont démontré ce potentiel [85].

4.1. Activité anti-germinatif :

Les huiles essentielles présentent le potentiel allélopathique associé à leurs capacités phytotoxiques. Parmi les familles chimiques couramment présentes dans les huiles essentielles, les terpénoïdes ont de fortes capacités phytotoxiques et anti-germinatives et des propriétés aromatiques. Ces propriétés offrent leur développement en tant que bioherbicides naturels, qui causent moins de risques pour l'environnement et ne permettent pas l'accumulation de résistances chez les organismes [86].

L'expérience consiste en deux facteurs ; les graines de culture cresson (*Lepidium sativum*) et différente concentration des huiles essentielles. Pour évaluer l'activité anti-germinatif des huiles essentielles, dans une boîte de Pétri et sur un papier filtre 10 graines sont placées dessus et trempées dans une solution contenant les huiles essentielles dissoutes dans le DMSO 1% à différentes concentrations [85]. La germination était enregistrée quotidiennement par le nombre de graines dont la radicule était sortie de l'enveloppe de la graine et par comptage périodique de la longueur des tiges et des racines [85,86].

4.2. Activité thylakoïde :

Au cours des dernières années, un nouveau type de biocapteur pour la détection des herbicides, basé sur l'utilisation d'anticorps, a été développé [87]. Il permet de détecter des herbicides individuels avec une sensibilité élevée, mais en raison de la spécificité d'un anticorps, il est difficile d'utiliser l'immunosensor pour surveiller les herbicides dans des échantillons contenant des herbicides inconnus de l'analyste ou plusieurs herbicides différents [87]. Un autre test de biorecognition repose sur la liaison de certaines classes d'herbicides

au centre de réaction photosynthétique. L'application des propriétés des récepteurs des membranes thylacoïdiennes semble être le schéma le plus direct de l'essai de biorecognition adapté à détecter tous les herbicides possibles inhibant le photosystème II [87]. Le test repose sur la photoréduction catalytique du colorant rédox par les centres de réaction du photosystème II des chloroplastes conformément à l'équation de Hill :

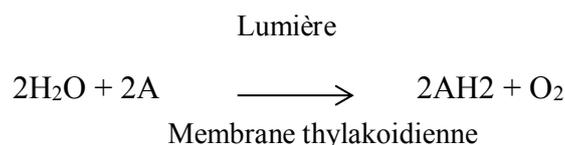


Schéma 4 : La photoréduction catalytique du colorant rédox [87]

Où A représente un accepteur artificiel d'électrons et de protons, AH₂ en est sa forme réduite. Dans les expériences présentées ici, le 2,6-dichlorophénolindophénol (DPIP) a été utilisé comme accepteur d'électrons artificiel. Sous illumination, la suspension à membrane de thylacoïde réduit le DPIP bleu en une forme incolore de leuco en quelques minutes, tandis que la suspension inhibée par un herbicide reste bleue [87, 88].

IV.5. Activité écotoxicologie :

Plusieurs huiles essentielles sont connues pour montrer des activités cytotoxiques. L'un des tests les plus courants pour déterminer la toxicité de divers extraits de plantes est le test de létalité d'*Artemia salina*. (*A. salina*) a un métabolisme en purine similaire à celui des cellules de mammifère et il a été démontré qu'il avait une bonne corrélation avec l'activité antitumorale [83].

La systématique de l'*Artémia* a évolué progressivement au cours du temps. Au début, les chercheurs se sont basés sur la morphologie de l'animal, mais ce critère a été abandonné car il est influencé par la salinité du milieu [89]. L'*Artémia* est un petit crustacé aquatique de forme allongée et dépourvu de carapace; il effectue 15 mues. Son corps est composé d'au moins 19 segments et de 11 paires d'appendices plates attachées à son tronc, semblables à des feuilles

appelés phyllopodes (pattes), lesquels battent à un rythme régulier. La taille des adultes d'Artémia est en général d'environ 8-12 mm, mais peut atteindre jusqu'à 20 mm [89].

Il en est de l'*artemia* comme de la daphnie ; on en trouve sur tous les continents. voici quelques dizaines d'années, on dénombrait 80 souches provenant de salines disséminées à travers le monde, la généralisation de l'utilisation d'*artemia* en aquariophilie et aquaculture a permis d'en dénombrier plus de 200, toutes répertoriées à l'*Artemia* [90]. L'*Artemia* a développé un système de défense écologique qui lui permet de supporter des compositions ioniques et des salinités l'étales pour la majorité des espèces animales aquatiques [90]. L'*Artemia* se maintient entre 6 et 37° C et peut survivre quelques semaines à 40° C [90]

Les kystes d'*Artemia* étaient lyophilisés dans de l'eau de mer filtrée recueillie à Canet, en France. À l'éclosion de kystes, l'eau de mer a été ajoutée à environ 80% d'une boîte de Pétri. Moitié de la plaque est restée dans le noir et le côté opposé à la lumière a été maintenu pendant 48 h. Parce qu'ils sont phototropiques, les artémias ont migré vers le côté lumière [83]. À l'aide d'une pipette, 10 *artemia* sont maintenue dans chaque tube. Chaque concentration a été testée en triple. Les tubes ont été laissés au contact de la lumière et, après 24 h, analysés. Les larves ont été considérées comme mortes lorsqu'elles n'ont pas montré de mouvement normal pendant l'observation pendant 10 secondes. La Toxicité a été déterminée en utilisant une CL₅₀, estimée selon la méthode de Reed-Muench et le pourcentage de mortalité des larves. Les données sur la mortalité des larves ont été soumises à une analyse de variance, et les moyennes ont été séparés en utilisant les tests de Tukey $\alpha=0,05$ et R [83].

IV.6. Activité insecticide :

Les nématodes parasites des plantes sont le groupe le plus destructeur de phytopathogènes dans le monde et leur contrôle est extrêmement difficile [91]. Ils parasitent une grande variété de cultures à travers le monde et leur impact sur les pertes de rendement a été estimé à un milliard d'euros par an. Les nématodes parasites des plantes attaquent leur hôte

en utilisant une gamme de stratégies. Ils peuvent être des ectoparasites, qui se nourrissent des tissus végétaux externes ou des endoparasites qui vivent dans les tissus végétaux [91]. Les endoparasites sédentaires (nématodes à kystes et à racines) représentent le type de parasitisme le plus avancé et le plus abouti [91], ils sont biotrophes et induisent de profonds changements dans les racines de leur hôte tout en se nourrissant [91]. Les nématodes *cécidogènes*, *Meloidogyne Javanica*, sont un des genres de nématodes les plus dangereux sur le plan économique parasite des plantes horticoles et des grandes cultures. Les nématodes endoparasites migrants ne se nourrissent pas de site unique mais traversant la plante, causant des dommages considérables lorsqu'ils se déplacent et s'alimentent. Au sein de ce groupe, il convient de noter que le nématode du bois de pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, qui cause la maladie de la flétrissure du pin responsable de graves pertes économiques dans les pinèdes [91].

L'utilisation prolongée d'insecticides à large spectre a entraîné le développement de populations d'insectes résistants [92]. Les substances naturelles constituent une alternative aux pesticides conventionnels. En revanche, les huiles essentielles ont traditionnellement été utilisées pour tuer ou repousser les insectes [92]. L'intérêt des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles a considérablement augmenté au cours des dix dernières années puisque elles ont été utilisées depuis l'Antiquité en tant qu'agents antimicrobiens et insecticides. La présence de monoterpènes volatils dans les huiles essentielles fournit une stratégie de défense importante à la plante contre les insectes nuisibles et organismes pathogènes [91]. Ces terpénoïdes jouent également un rôle dans les interactions parasites des plantes, agissant en tant que molécules de signalisation. Les insectes phytophages utilisent les substances volatiles des plantes pour reconnaître leur hôte [92]. Ainsi, au cours des dernières années, beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'étude de l'activité nématicide des huiles essentielles et de leurs effets néfastes [91]. Il existe plusieurs espèces d'insectes qui ont été largement sensibles aux

huiles essentielles tel que le *Tribolium castaneum*, un ravageur mondial des produits céréaliers moulus, principalement la farine, qui a été sensible à certaines huiles essentielles [92, 93, 94].

Rhopalosiphum padi : est un puceron de la superfamille des *Aphidoidea* dans l'ordre des hémiptères. C'est un vrai insecte qui suce la sève des plantes. Il est considéré comme un ravageur majeur des cultures céréalières, en particulier dans les régions tempérées, ainsi que d'autres hôtes dans certaines parties de l'Europe du Nord. C'est le principal vecteur de nombreux virus dans les grandes cultures économiquement importantes [91,92,93].

Myzus persicae : le puceron vert du pêcher est une espèce d'insectes hémiptères, un puceron ravageur majeur du pêcher auquel il transmet de nombreux virus dont la Sharka. Son action provoque généralement le flétrissement des feuilles et une nécrose des tissus. Ce ravageur peut également s'attaquer à la pomme de terre et à la betterave [91,92,93].

Spodoptera littoralis : est une espèce de papillons de la famille des *Noctuidae*, originaire d'Afrique. Cette espèce est notamment connue pour les dégâts causés par sa chenille polyphage et phyllophage à de nombreuses plantes cultivées, notamment les légumineuses et les plantes du genre des cotonniers véritables [91,92,93].

Les tiques sont des acariens ectoparasites de vertébrés. Elles passent une partie de leur cycle au sol, et une autre partie ancrée sur la peau de mammifères (sauvages et d'élevage), d'oiseaux ou de reptiles, se nourrissant de leur sang. Elles peuvent à cette occasion transmettre à leurs hôtes de nombreux agents pathogènes connus (virus, bactéries, protozoaires, nématodes) responsables des maladies vectorielles à tiques, et parfois des neurotoxines (responsables de paralysie à tiques) tel que *Hyalomma lusitanicum* [93-94].

IV.7. Activité molluscicide :

La schistosomiase est une maladie d'origine hydrique causée par les trématodes du genre *Schistosoma*. C'est la deuxième maladie tropicale la plus dévastatrice sur le plan socio-

économique après le paludisme [95,96,97,98,99]. Parmi les schistosomes pathogènes, *Schistosoma mansoni* est l'espèce la plus répandue. On le trouve principalement en Afrique, en Amérique du Sud, dans les Caraïbes et au Moyen-Orient, et infecte plus de 83 millions de personnes dans le monde. Les escargots aquatiques du genre *Biomphalaria* agissent comme hôtes intermédiaires de *S. mansoni* [95,96,97,99]. Au siècle dernier, il a subi expansion de la portée périphérique pour envahir les Caraïbes et d'autres pays néotropicaux. Au cours des dernières décennies, l'aire de répartition de l'escargot s'est élargie à l'extérieur des néotropes. La distribution mondiale de la schistosomiase humaine coïncide avec la distribution géographique des hôtes intermédiaires d'escargots. Historiquement, la Chine est une zone non endémique pour *S. mansoni*. Cependant, le pouvoir agressif de colonisation de mollusques suscite l'inquiétude des organisations gouvernementales et non gouvernementales [95]. En outre, en raison du développement rapide du commerce international, du tourisme florissant, des échanges fréquents de personnel international et de l'exportation de main-d'œuvre, le nombre de cas de *S. mansoni* importés en Chine a fortement augmenté depuis les années 1990. Avec une telle activité agressive, une attention particulière doit être accordée au risque de transmission de *S. mansoni* en Chine continentale. Dans le cadre d'un programme intégré de lutte contre la schistosomiase, les stratégies de lutte contre les mollusques sont considérées comme un moyen efficace d'interrompre la transmission de la schistosomiase, et l'application de molluscicides est le moyen le plus efficace. À l'heure actuelle, les efforts déployés pour réduire les populations d'escargots utilisent principalement le molluscicide ; niclosamide, qui est très puissant contre tous stades de développement de l'escargot [95,96,97,98]. Cependant, le niclosamide est hautement toxique pour les poissons et certains amphibiens. Pour les espèces d'escargots d'eau douce, l'utilisation de niclosamide pour réduire leur population n'est pas le meilleur choix en raison de son effet dangereux sur les organismes aquatiques non ciblés [95].

Les stratégies sont des mesures importantes dans la lutte contre la schistosomiase, en particulier dans les zones de faible endémie [96]. Actuellement, les molluscicides synthétiques ne sont pas pris en compte en raison de leur coût élevé et de leurs problèmes environnementaux [96]. Les produits végétaux deviennent des alternatives de plus en plus intéressantes pour leur large gamme de propriétés idéales, y compris la biodégradabilité et la spécificité de la cible. En conséquence, les recherches sur les plantes molluscicides sont devenues si populaires que de nombreuses espèces de plantes ont été examinées. Selon de récents des études, *Glinus lotoides* et *Jatropha gossypifolia* se sont révélés être des plantes molluscicides efficaces. Malgré un potentiel de biodiversité botanique élevé et une variété des plantes médicinales traditionnellement revendiquées, de telles études en Ethiopie sont limitées [97].

Un autre problème de santé publique grave est le spectre des maladies parasitaires négligées comme la leishmaniose [100]. Ces maladies sont causées par des parasites protozoaires du genre *Leishmania* et affectent la peau, les muqueuses et les organes internes. Leishmaniose est endémique dans 88 pays où vivent 12 millions de personnes infectées. Chaque année, entre un et deux millions de nouveaux cas sont signalés dans le monde. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* appartient à l'espèce de parasite distribuée au Brésil. Cette espèce est l'un des agents étiologiques de la leishmaniose tégumentaire américaine qui est transmis par la piqûre d'un phlébotome infecté [100]. Le traitement de la leishmaniose consiste en des agents chimiothérapeutiques toxiques nécessitant une administration parentérale sous surveillance médicale [100]. La nécessité d'identifier un nouveau *leishmanicidal* qui est plus efficace et moins toxique que ceux actuellement utilisés a encouragé la recherche de produits naturels isolés d'espèces végétales. Les alcaloïdes, terpènes, flavonoïdes, benzopyrannes, composés phénoliques et lactones sesquiterpéniques

sont les principales classes de substances identifiées chez les espèces de plantes à activité leishmanicide [100].

L'activité molluscicide de l'huile contre *Biomphalaria glabrata* a été évalué selon les normes recommandées par l'organisation mondiale de la santé, des groupes de dix escargots sauvages (10-15 mm de diamètre) qui n'étaient pas libérés par les cercaires ont été exposés à des différentes concentrations d'huile. Un groupe d'escargots a été exposé à un témoin vierge ne contenant pas d'huile. Le test était en triple et les animaux ont été exposés aux solutions d'huile pendant 24 h. Les escargots étaient alors transférés dans des flacons propres ne contenant que de l'eau ultra pure et de la nourriture (laitue). Les groupes ont été observés après 24, 48 et 72 h. Le nombre des escargots décédés a été enregistré à chaque point d'observation. La Mort d'escargot décoloration, contraction de l'hémolymphe, absence de contractions musculaires, saignements et détérioration des tissus corporels [100].

V. Problématique de recherche :

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons mis en place une séquence analytique constituée de plusieurs étapes permettant d'aborder les potentialités et vise à développer dans sa partie de valorisation des résultats, des activités ayant relation avec le bio-control pour l'étude des constituants volatils des plantes. Nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles de trois espèces de trois différents genres appartenant à la famille des *apiaceas* : *E. triquetrum*, *S. olusatrum* et *D. crinitus*. Nous avons choisi ces trois espèces sur la base de leur composition chimique déjà étudié dans le monde et leurs propriétés biologiques très intéressantes rapportées par la littérature, notre but était de faire une comparaison entre les résultats trouvés et la spécificité que peut représenter notre région et de s'intéresser des composés majoritaires pour leur propriétés biologiques et de développer des activités qui ont une relation avec le bio-control en Algérie afin de pouvoir

résoudre les problèmes actuelles de l'agriculture. L'approche analytique que nous avons développée est basée sur :

Un échantillonnage permettant d'avoir une vision globale du végétal. Pour cela nous avons procédé à un échantillonnage rigoureux dans différentes localités représentatives de la répartition des espèces sélectionnées sur la zone nord-ouest de l'Algérie.

L'étape d'échantillonnage est suivie par la phase de préparation de l'échantillon chimique. Cette étape consiste à la production des huiles essentielles des parties aériennes et racines destinées à l'étude de la caractérisation chimique et l'activité biologique. Le matériel végétal a été hydrodistillé à l'aide d'un appareil de type Clevenger dans le respect des recommandations de la pharmacopée européenne. Par ailleurs, des hydrolats ont été préparés à des fins de recherche et d'identification de composés non-identifiés dans les huiles essentielles.

Afin d'identifier les constituants volatils de nos huiles essentielles, une démarche analytique basée sur la méthodologie a été mise en place. Les huiles essentielles de chaque espèce sont soumises à une analyse de routine. Par un regroupement d'échantillons individuels, une huile essentielle dite « collective » est obtenue pour chaque espèce. Cette huile essentielle collective est soumise à une étude détaillée des fractions obtenues par un fractionnement chromatographique. Au sein de notre laboratoire, ce procédé est réalisé par deux méthodes la première à l'aide d'un système de fractionnement classique et la deuxième avec un système de chromatographie automatisé qui réunit à la fois rapidité, précision et efficacité permettant d'aboutir à des fractions contenant des composés concentrés. Cette procédure s'avère particulièrement efficace pour accéder à l'identification des composés dont les données spectrales sont absentes des bibliothèques de références, ainsi les substances purifiées/s seront analysées par RMN afin d'élucider leurs structures

L'évaluation des activités biologiques des extraits et des fractions obtenues par chromatographies est un moyen de valorisation de la ressource végétale. Les tests biologiques ont été développés afin d'identifier des champs d'application pour les huiles essentielles étudiés. Ainsi, les huiles essentielles, les extraits et les molécules purifiées ont été soumises à des tests biologiques afin d'évaluer les activités antimicrobienne. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Microbiologie du Laboratoire LAMAABE de l'Université de Tlemcen. D'autre part nous avons réalisé une coopération entre l'université de Tlemcen et l'université de Perpignan, avec le laboratoire CRIOBE sous la direction du Pr Cédric BERTRAND afin de développer des produits naturels et des principes actifs naturel avec un pouvoir de biocontrol. Nous avons procédé à la réalisation de différentes activités sur les huiles essentielles et leurs composés majoritaires telles que les activités herbicides, pesticide, antifongique et antibactérienne contre les phytopathogènes et écotoxicologie. Nous avons aussi réalisé des activités insecticides en collaboration avec le laboratoire CSIC de l'université de Madrid sous la direction du Pr Azucena González-Coloma. Nous avons ouvert un volet sur l'activité molluscicide de nos huiles essentielles, cette activité a été réalisée en collaboration IHPE sous la direction de Pr David Duval.

Nous avons procédé à la synthèse de l'isochavicol isobutyrate qui est la molécule principale des huiles essentielles de l'espèce *D. crinitus*. Nous avons synthétisé cette molécule en raison de la difficulté de l'extraire de l'huile, la synthèse est faite en quatre étapes avec des réactions simple et classique. Pour les deux autres espèces nous avons pu extraire leurs molécules majoritaires avec succès. Nous avons l'intention à procéder à l'hémi synthèse afin d'augmenter le pouvoir de bio-control des molécules mais nous n'avion pas assez de temps.

PARTIE B
ETUDE CHIMIQUE

Le but premier de ce chapitre est de décrire les compositions chimiques des huiles essentielles des trois plantes *Apiacées* qui font l'objet de notre étude. En l'occurrence, après analyse, les huiles essentielles ont été fractionnées par chromatographie sur une colonne de gel de silice de façon à obtenir des mélanges moins complexes voire à des composés purs. Les composés reconnus par nos bibliothèques « maison » ont été considérés comme identifiés. Le second but est d'établir une composition chimique des extraits aux solvants obtenus par deux méthodes d'extractions différentes. Enfin, le troisième but est de présenter la synthèse du composé majoritaire de l'huile essentielle de *D. crinitus* partie aérienne qui est une molécule non commercialisée.

A - HUILES ESSENTIELLES D'*ERYNGIUM TRIQUETRUM* SOURCE NATURELLE DU FALCARINOL

Des échantillons d'huiles essentielles d'*E. triquetrum* de l'Algérie ont été étudiés récemment [40]. L'étude que nous avons menée sur des échantillons d'huile essentielle obtenus à partir d'*Eryngium triquetrum* récoltée dans l'Ouest Algérien (Tlemcen) a permis de mettre en évidence une composition chimique et des proportions de falcarinol dans les parties aériennes de la plante, nous pouvons dire que la plante peut constituer une source naturelle de ce polyacétyle aux propriétés biologiques intéressantes.

1-Analyse préliminaire de l'huile essentielle de *E. triquetrum* et fractionnement.

Le matériel végétal (partie aérienne) a été récolté dans 5 localités de la région de Tlemcen en (Mai, Juin) 2016-2017. La plante pousse de façon spontanée et en abondance. Le matériel végétal frais a été soumis à une hydrodistillation durant 4 heures dans un appareillage de type Clevenger avec un rendement variable de 0,01 à 0,11 % par rapport à la masse de végétal frais. Nous avons ainsi préparé 20 g d'huile essentielle de couleur rouge.

L'analyse préliminaire des huiles essentielles individuelles a permis d'obtenir des profils chromatographiques qualitativement similaires se différenciant toutefois par les proportions des composés majoritaires. Afin d'effectuer une analyse détaillée, les échantillons d'huile essentielle ont été rassemblés pour produire un échantillon collectif noté HEcoll (huile essentielle collective). Nous avons obtenu neuf huiles collectives avec différente proportion de Falcarinol (86%, 93%, 90%, 87%, 83%, 84%, 74%, 89%, 44%) L'huile collective est analysée par la GC-FID et la GC-SM. Le profil chromatographique est donné à la **figure 16**. Ces analyses ont permis l'identification de 24 composés représentant 95,6 % de la composition chimique de l'huile essentielle. L'huile collective est dominée par des composés linéaires oxygénés qui représentent 92,6 %. Les composés majoritaires dont les structures sont présentées à la **figure 15**, sont le **(1)** falcarinol (74,8 %), **(2)** l'octanal (5,6 %) et **(3)** le nonanal

(0,8 %). Vingt composés ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention et leurs spectres de masse avec ceux d'une bibliothèque spectrale de masse "maison".

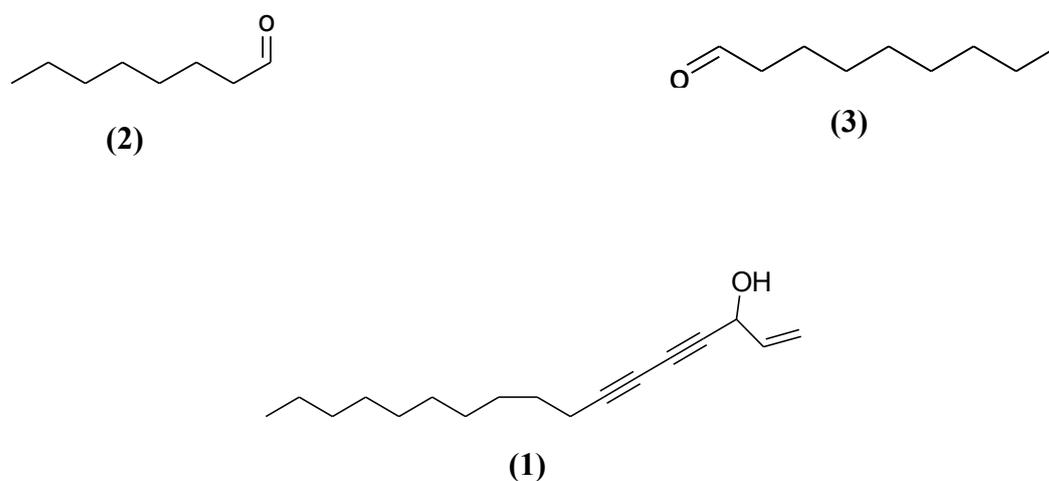


Figure 15 : Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle d'*E. triquetrum*

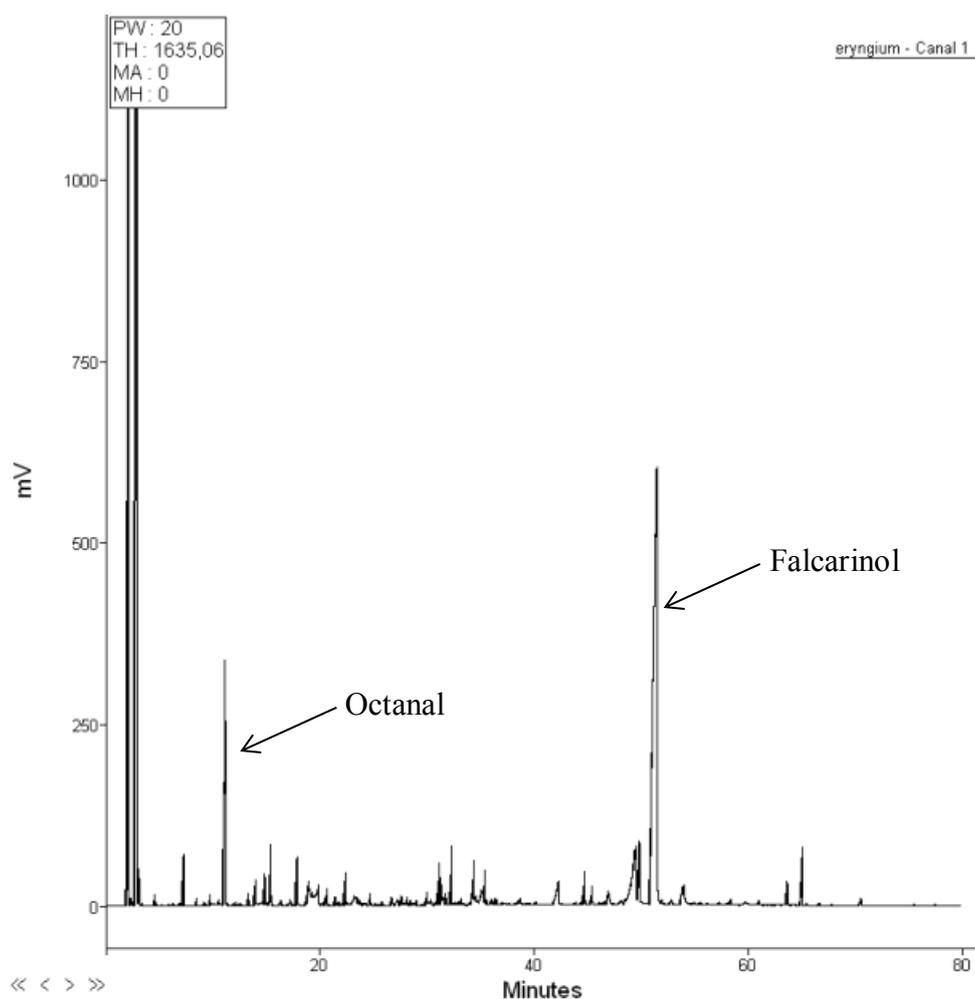


Figure 16 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'*E. triquetrum*

Tableau 1 : La composition chimique de L'huile collective des parties aériennes d'*E. triquetrum* (HEcoll).

No	Composés	IR ^b _a	HEcoll ^c	Identification ^d
1	Heptane	703	0.6	RI, MS
2	Hexanal	774	0.5	RI, MS
3	Heptanal	877	tr	RI, MS
4	Octanal	979	5.6	RI, MS
5	(E)-2-Octenal	1039	0.2	RI, MS
6	Octanol	1063	tr	RI, MS
7	Nonan-2-one	1077	tr	RI, MS
8	Nonanal	1081	0.8	RI, MS
9	(E)-2-Nonéнал	1133	0.5	RI, MS
10	(Z)-2-Nonén-1-ol	1155	0.2	RI, MS
11	Acide octanoïque	1174	tr	RI, MS
12	Décén-3-ol	1181	0.7	RI, MS
13	Décanal	1183	tr	RI, MS
14	3-Dodécén-1-yne	1214	0.5	RI, MS
15	Carvone	1225	0.5	RI, MS
16	(E)-2-Décanal	1251	tr	RI, MS
17	(E,E)-2,4-Décadiéнал	1289	tr	RI, MS
18	β-Ionone	1454	0.3	RI, MS
19	3,4-Diméthyl-5-pentyl-5H-Furan-2-one	1486	2.7	RI, MS, Ref
20	γ-Undécalactone	1524	tr	RI, MS, Ref
21	Acide dodécanoïque	1547	tr	RI, MS

22	Acide hexadécanoïque	1968	1.9	RI, MS
23	Falcarinol	2026	74.8	RI, MS
24	α -Kaurene	2049	0.3	RI, MS
Totale identification %			90.1	
Rendement (%) (w/w)			0.02	
Composés oxygénés			89.2	
Composés hydrocarbonés			0.9	

^a L'ordre d'élution est donné sur la colonne apolaire (DB5),

^b Les indices de rétention sur la colonne DB5 (RIa),

^c Les huiles collectives: l'huile essentielle des parties aérienne d'*E. triquetrum*. tr = trace (<0,05%)

^d RI: indices de rétention; MS: Spectrométrie de masse en mode impact électronique. Tous les composés ont été identifiés en comparant leurs indices EI-MS et de rétention avec les références compilées dans la bibliothèque interne.

2-Fractionnement de l'huile essentielle d'*Eryngium triquetrum* en fractions moins complexes :

Les huiles essentielles constituent un mélange complexe de molécule, nous avons procédé au fractionnement de cette essence sur une colonne ouverte de silice en utilisant le cyclohexane/ diéthylether comme éluant, en vue de purifier de nouvelles substances potentiellement intéressantes sur le plan biologique ou d'avoir des fractions moins complexe que l'huile essentielle. Ce fractionnement a été réalisé deux fois et les fractions ont été analysées selon la séquence habituelle CPG-FID.

Le premier fractionnement de l'huile d'*E. triquetrum* nous a donné 7 fractions. Le second nous a donné 5 fractions, les fractions étaient de couleur jaune claire et jaune foncé. Après avoir analysé toutes les fractions nous avons rassemblé les fractions qui ont la même composition chimique, par conséquent, nous avons obtenu quatre fractions BER, CER, DER, EER (ER : signifie *E. triquetrum*). Les masses des fractions obtenues sont 20 mg, 50 mg, 490 mg, 140 mg respectivement.

Les analyses CPG-FID et le calcul des indices de rétention nous ont permis d'identifier que la fraction BER est dominée par la carvone, la fraction CER est composé de carvone, γ -undécalactone, falcarinol et α -kaurene, ensuite la fraction DER est dominée par des traces de nonanal, l'acide dodécanoïque et le falcarinol en majorité, enfin la fraction EER est dominée par la présence de nonanal, des proportions mineurs de E-E-2,4-décadiénal, l'acide dodécanoïque en majorité et des proportions mineurs de falcarinol.

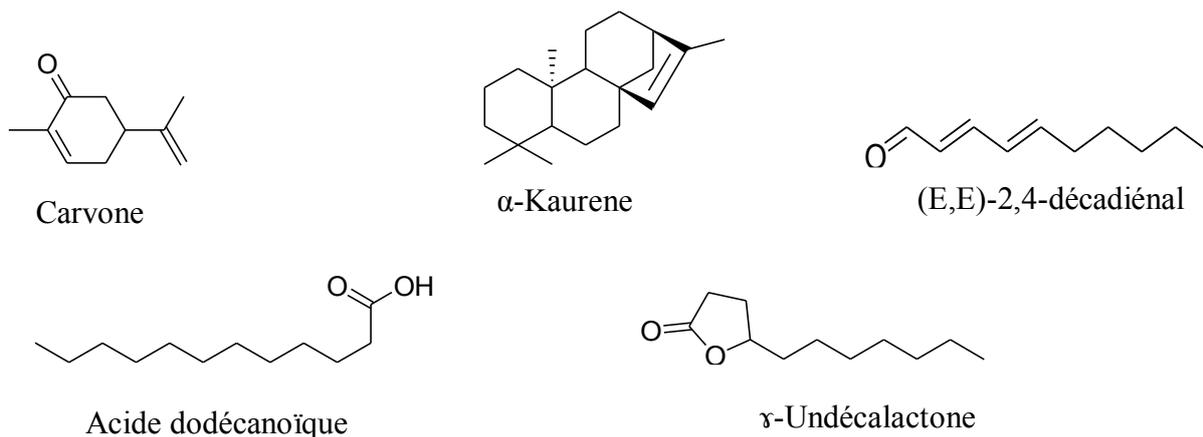


Figure 17 : Structure des composés des différentes fractions d'*E. triquetrum*

3-Purification du composé majoritaire de l'huile essentielle d'*Eryngium triquetrum* :

Il existe beaucoup de recherche sur la molécule de Falcarinol vis l'importance de ses propriétés biologiques. Cette molécule se trouve sous forme de deux configurations ; S-Falcarinol et R-Falcarinol et nous ignorons si le Falcarinol dominé dans nos huiles est de configuration S ou R ou un mélange d'énantiomère. Cette molécule est commercialisée mais son coût est très élevé ainsi sa synthèse n'est pas évidente avec les moyens disponibles au laboratoire. Donc nous sommes dirigés vers la purification de Falcarinol à partir de l'huile essentielle.

Nous avons procédé à la purification du Falcarinol à partir de l'huile essentielle sur une colonne ouverte de silice de forte granulométrie avec un mélange cyclohexane/ diéthylether comme éluant, ce qui nous a conduits à 6 fractions. Le schéma du fractionnement est donné à la **partie expérimentale**. L'analyse de ces fractions selon la séquence habituelle CPG-FID.

Afin de purifier le falcarinol nous avons utilisé en parallèle la chromatographie sur une couche mince et le KMnO_4 comme révélateur. Sur la base de ces deux méthodes de purification nous avons pu purifier le Falcarinol sous forme d'une huile jaunâtre à 99% avec une masse de 65.7 mg (le profil chromatographique est donné dans la **figure 18**). Dans le but de déterminer la stéréochimie du Falcarinol présent dans l'huile essentielle nous sommes dirigés vers la détermination du pouvoir rotatoire à l'aide d'un polarimètre et les résultats ont

été conclu en se basant sur la référence [54]. Donc à 5 mg/mL (0.5%) dans le chloroforme le pouvoir rotatoire de l'huile essentielle et le falcarinol est respectivement $\alpha_D = +30^\circ$, $\alpha_D = +46^\circ$. D'après les résultats obtenus et la référence nous avons conclu que le falcarinol présent dans les huiles essentielles est de configuration S (S-Falcarinol).

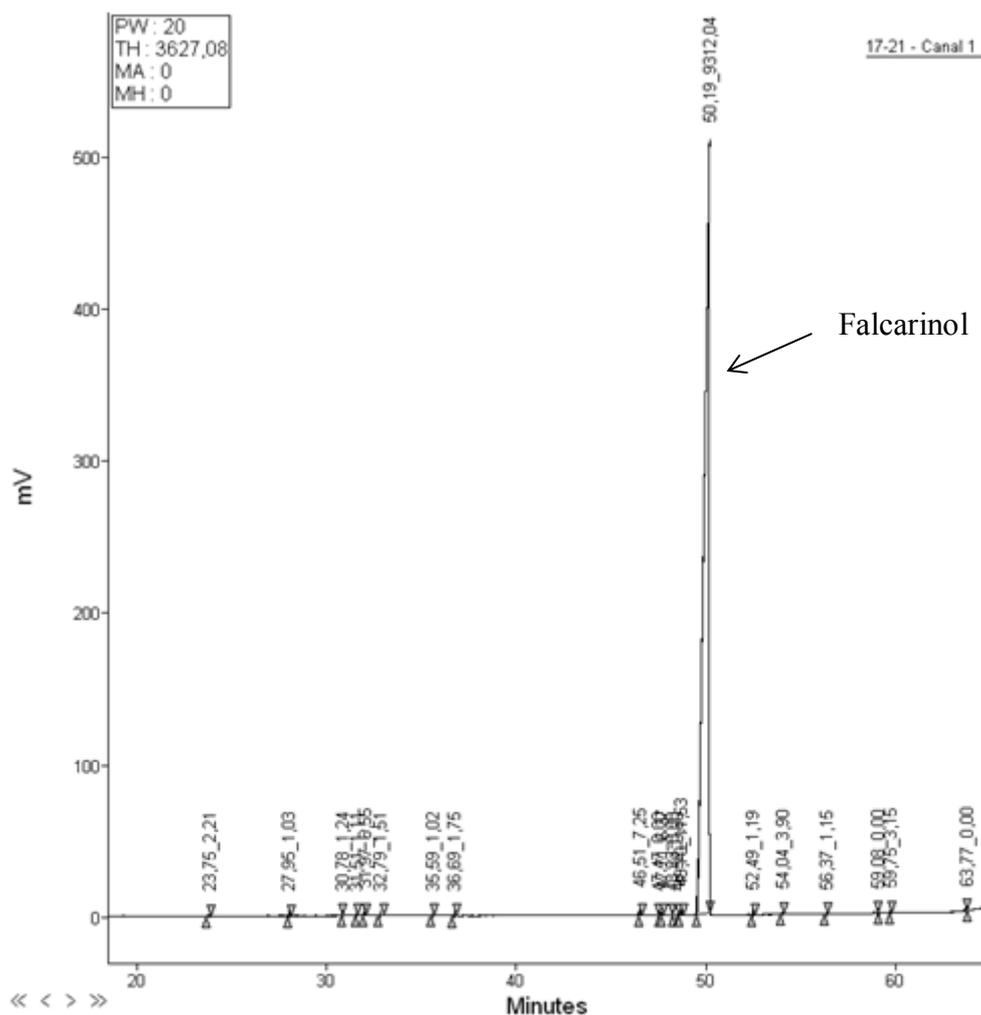


Figure 18 : Chromatogramme de Falcarinol pur

4-Etude de la composition chimique des différents extraits d'*E. triquetrum* :

Nous avons procédé à l'étude des extraits d'*E. triquetrum* obtenus par deux méthodes d'extraction différentes ; la première est la méthode d'extraction par macération et la deuxième est la méthode d'extraction par les ultrasons. Avec la méthode des ultrasons nous

avons préparé un seul extrait cyclohexanique, nous avons obtenu un extrait de couleur jaune verdâtre avec un rendement de 0.23%. En ce qui concerne la méthode d'extraction par macération, nous avons préparé trois extraits, un extrait cyclohexanique, un extrait dichlorométhane et extrait méthanolique avec des rendements de 1.1%, 0.89% et 5.07% respectivement, les extraits étaient de couleur vert foncé. Nous avons analysé les trois extraits par la LC-QFLEET (HPLC couplée à la masse et détecteur UV), nous avons remarqué que nos extraits sont peu soluble dans l'acétonitrile, pour une première analyse nous n'avons rien vu sur le chromatogramme. Par conséquent, nous avons augmenté la concentration et la quantité à injecter, mais nous n'avons pas obtenu un chromatogramme interprétable. Donc nous avons procédé à l'évaluation des activités de ces extraits. Car le but de notre étude est de valoriser les huiles essentielles et les extraits de plante dans des activités de bio-control. Nous avons pu passer uniquement deux extraits sur la CPG-FID l'extrait cyclohexanique obtenu par macération et ultrason car nous avons rencontré un problème de solubilité avec les autres extraits.

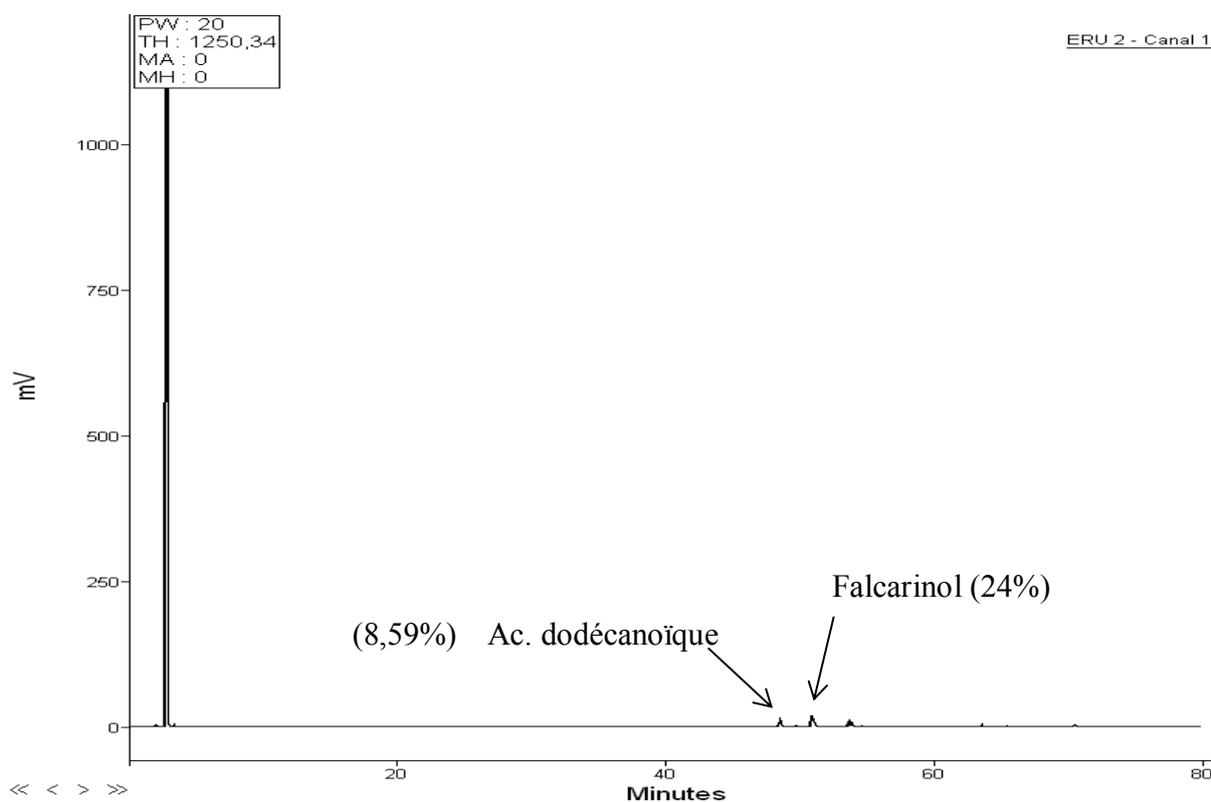


Figure 19 : Chromatogramme de l'extrait *E. triquetrum* par méthode des ultrasons

L'extrait d'*E. triquetrum* obtenu par la méthode des ultrasons est dominé par l'acide dodécanoïque (8,59%) et le falcarinol (24%) alors que l'extrait obtenu par la méthode de macération présente des traces de falcarinol (2.2%). Par conséquent, la composition chimique des extraits est moins complexe que l'huile essentielle. Nous avons aussi remarqué qu'avec la méthode des ultrasons la proportion du falcarinol est plus importante qu'avec la méthode de macération. Pour purifier le composé majoritaire à partir des extraits il faut augmenter sa proportion dans les extraits et donc il faut beaucoup du matériel végétal.

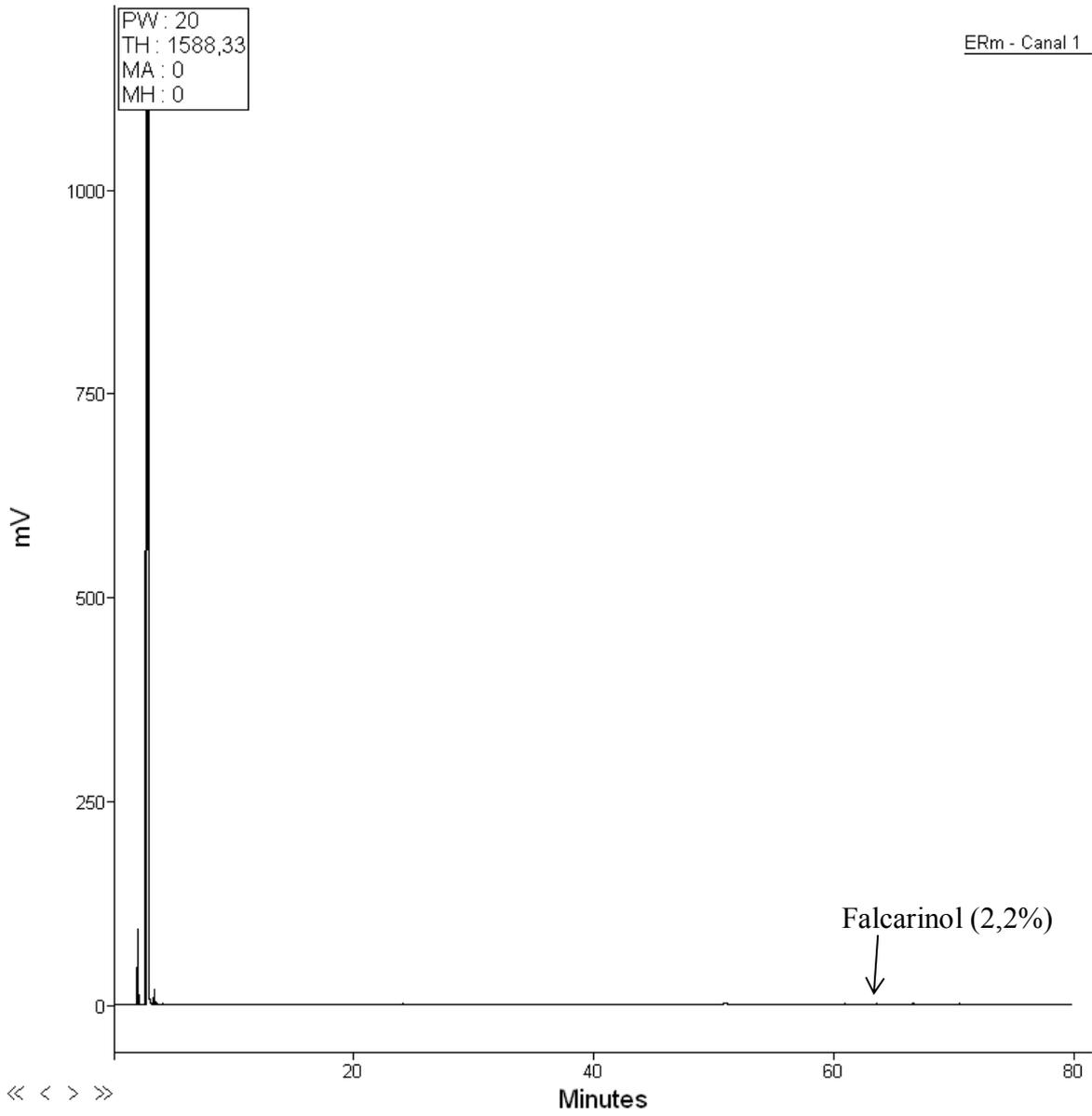


Figure 20 : Chromatogramme de l'extrait *E. triquetrum* par méthode de macération

B-HUILES ESSENTIELLES DE *SMYRNIUM OLUSATRUM* SOURCE NATURELLE DES SESQUITERPENES

A notre connaissance il existe plusieurs études qui ont été réalisées sur la composition chimique de l'huile essentielle de *S. olusatrum* surtout en Italie et en Grèce. Les chercheurs ont donné l'importance à cette plante grâce à la grande teneur de ces huiles essentielles en sesquiterpènes notamment l'isofuranodiène qui possède des propriétés thérapeutiques intéressantes

1-L'analyse préliminaire de L'huile essentielle de *S. olusatrum* :

L'étude des échantillons de *S. olusatrum* originaire d'Algérie, a été menée sur l'étude de la composition chimique des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir de matériel végétal (racines) récolté en deux stations en mois de Décembre 2015 et Janvier-Février 2016, le rendement moyen est faible (0,004 %). La plante se trouve dans des stations peu denses, elle pousse de façon éparse et généralement sur des zones sauvages. L'huile essentielle a été soumise à l'analyse par CPG-FID et CPG/SM. Cette analyse préliminaire met en évidence des analogies dans les profils chromatographiques des différents échantillons. Dans la perspective d'un fractionnement, toutes ces huiles essentielles ont été cumulées et nous avons ainsi obtenu 6 g d'une huile essentielle collective de couleur jaune orangé.

Les analyses par CPG-FID et CPG/SM de l'huile essentielle avant fractionnement ont permis d'identifier 43 composés représentant 84,4 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle. Les identifications ont été réalisées en comparant leurs indices de rétention et leurs spectres de masse avec ceux d'une bibliothèque spectrale de masse "maison" et des bibliothèques commerciales. Outre ces composés, figurent 3 composés : dont les abondances varient de 11 à 31% et qui représentent globalement 61.6 % de la composition chimique de l'huile essentielle.

Les composés majoritaires sont le E- β -caryophyllène (11 %), (1) le furanodiène (31.5 %)/ (2) curzurène, (3) le furanoérmophilone (19.1 %). Les autres constituants n'excédant pas 2,3 %.

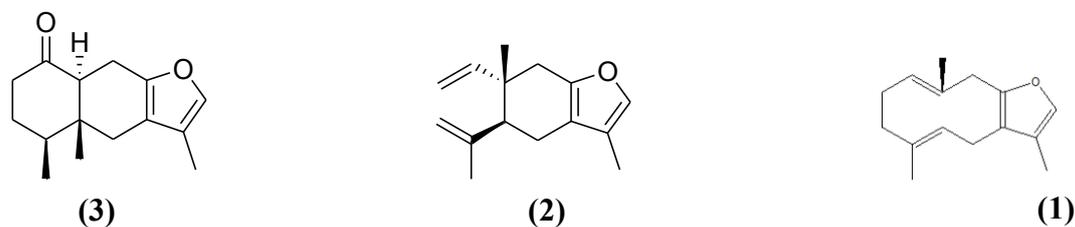


Figure 21 : Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de *S. olusatrum*

L'isofuranodiène est tout à fait disposé à l'oxydation donnant lieu à des lactones à cinq chaînons. De plus, il peut subir une photooxygénation après une exposition aux rayons ultraviolets et chaque fois dissous dans certaines solutions de solvant organique. Lorsqu'il est exposé à des températures élevées, l'isofuranodiène subit un traitement dit «Réarrangement de Cope» consistant en un réarrangement [3,3] sigmatropique donnant lieu au curzurène produit d'artefact. Cette dégradation se produit, bien que lentement, à température ambiante rendant ce composé assez instable. Par conséquent lorsque nous injectons l'huile essentielle en GC-FID et que la température de l'injecteur est élevée, il se produit le réarrangement de Cope et à certain temps nous ne pouvons identifier que le produit de réarrangement qui est le curzurène.



Schéma 5 : Réarrangement de Cope de l'isofuranodiène

Tableau 2 : La composition chimique de l'huile essentielle de *S. olusatrum*

No	Composés	IR ^b _a	HEcoll ^c	Identification ^d
1	Butanol	638	0.5	RI, MS
2	α -Thujène	925	0.1	RI, MS
3	α -Pinène	933	0.8	RI, MS
4	Sabinène	968	0.1	RI, MS
5	β -Pinène	974	3	RI, MS
6	Myrcène	983	0.1	RI, MS
7	α -Phellandrène	996	tr	RI, MS
8	Δ -3-Carène	1008	2.2	RI, MS
9	p-Cymène	1013	0.3	RI, MS
10	Limonène	1022	0.2	RI, MS
11	E- β -Ocimène	1037	0.1	RI, MS
12	α -Terpinéol	1079	0.1	RI, MS
13	p-Menth-8-én-1-ol	1139	0.1	RI, MS
14	Menthofurane	1156	0.1	RI, MS
15	p-Cymèn-8-ol	1160	0.1	RI, MS
16	α -Terpinéol	1172	tr	RI, MS
17	Citronellol	1209	0.3	RI, MS
18	Cuminaldéhyde	1212	0.2	RI, MS
19	Pipériténone	1286	tr	RI, MS
20	Citronellyl acétate	1333	0.1	RI, MS
21	α -Copaène	1379	0.1	RI, MS
22	β -Bourbonène	1382	0.2	RI, MS
23	β -Élémène	1387	1.1	RI, MS

24	E-β-Caryophyllène	1420	11	RI, MS
25	δ-Élémène	1427	0.3	RI, MS
26	α-Humulène	1450	0.9	RI, MS
27	Germacrène D	1475	0.1	RI, MS
28	Furanodiène	1480	31.5	RI, MS
29	Curzurène	1484	0.2	RI, MS
30	α-Bulnésène	1507	0.2	RI, MS
31	α-Cadinène	1510	0.3	RI, MS
32	δ-Cadinène	1515	0.5	RI, MS
33	Germacrène B	1552	1.5	RI, MS
34	Caryphyllénoxyde	1572	2.2	RI, MS
35	Isocaryophyllèn-14-ol	1629	0.7	RI, MS
36	4-β-4-Cadin-9-èn-15-al	1677	0.9	RI, MS
38	14-Hydroxy-δ-Cadinène	1776	0.5	RI, MS
39	Furanoéremophilone	1860	19.1	RI, MS
40	α-Kaurene	2049	1.4	RI, MS
41	E-phytol	2106	2.3	RI, MS
42	Tridécane	2303	0.5	RI, MS
43	Tétradécane	2403	0.4	RI, MS
44	Pentadécane	2503	0.1	RI, MS
Totale identification %			84.4	
Rendement (%) (w/w)			0.004	
Composés oxygénés			39.6	
Composés hydrocarbonés			44.8	

^a L'ordre d'élution est donné sur la colonne apolaire (DB5),

^b Les indices de rétention sur la colonne DB5 (RIa),

^c Les huiles collectives: l'huile essentielle des parties racines de *S. olusatrum*. tr = trace (<0,05%) ^d RI: indices de rétention; MS: Spectrométrie de masse en mode impact électronique. Tous les composés ont été identifiés en comparant leurs indices EI-MS et de rétention avec les références compilées dans la bibliothèque intern

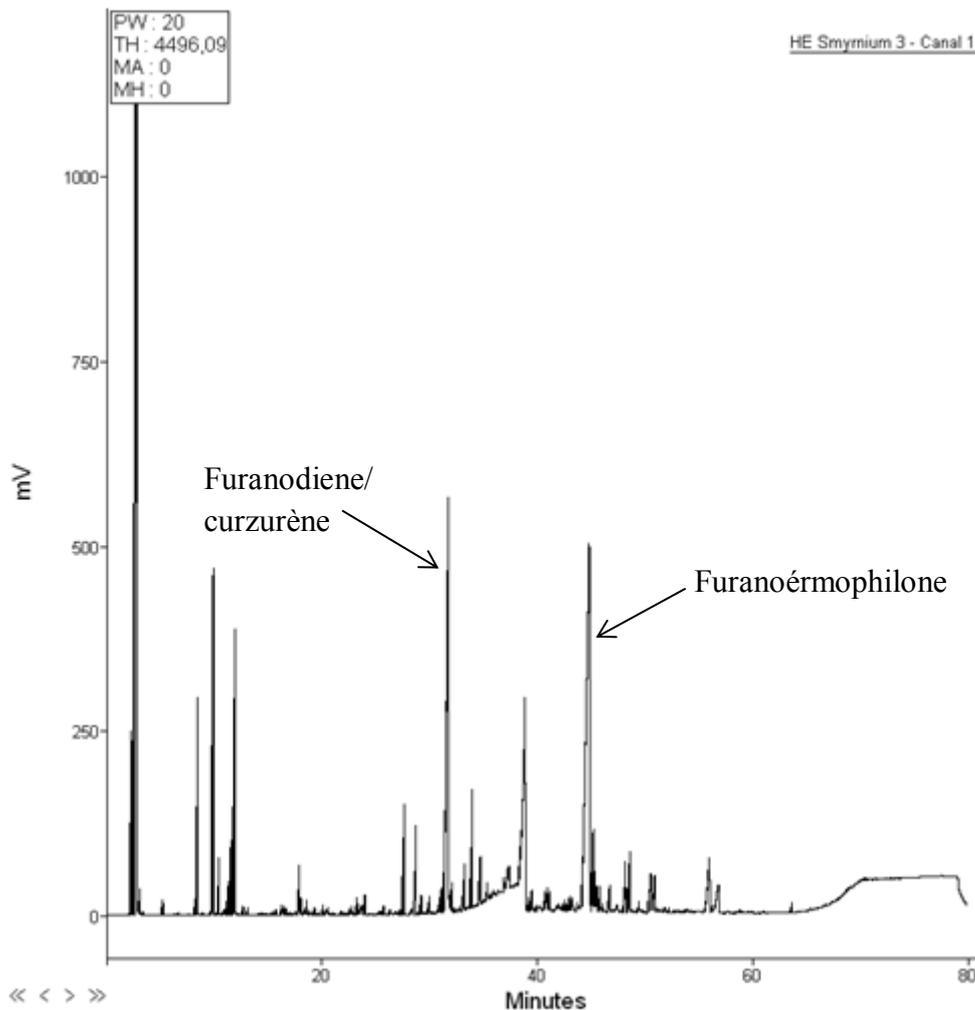


Figure 22 : Chromatogramme de l'huile de *Smyrniolusatum*

2-Fractionnement de l'huile essentielle de *Smyrniolusatum* en fractions moins complexes :

Nous avons procédé au fractionnement de l'huile essentielle dans le but d'avoir des fractions moins complexes, nous avons effectué trois fractionnements avec 500 mg, 1 g et 150 mg d'huile essentielle en utilisant le cyclohexane / acétate d'éthyle comme éluant. Le premier fractionnement nous a permis d'avoir cinq fractions. Le second nous a donné neuf fractions et le dernier nous a donné sept fractions

Toutes les fractions ont été analysées en CPG-FID en comparant leurs indices de rétention avec ceux de l'huile essentielle. Une fois les analyses ont été réalisées nous avons

rassemblé les fractions similaires et nous avons pris les fractions les plus intéressantes et les moins complexe. Donc nous avons obtenue trois fractions BSO1, BSO2, ESO avec des masses de 560 mg, 440 mg, 480 mg respectivement.

La fraction BSO1 est dominée par le curzurène majoritairement, α -thujène, α -pinène, sabinène, E- β -caryophyllène, α -cadinène, isocaryophyllèn-14-ol, furanoérmophilone. La fraction BSO2 est dominée par le furanoérmophilone en majorité, gemacrène-D-, isocaryophyllèn-14-ol et E-phytol. La dernière fraction ESO comprend trois molécules le curzurène, le furanoérmophilone et isocaryophyllèn-14-ol.

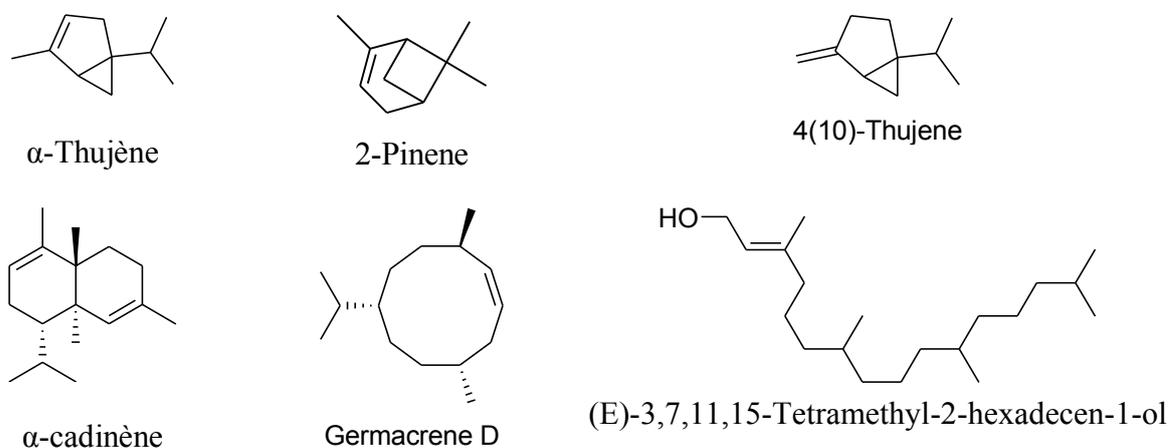


Figure 23 : Structure des composés des différentes fractions de *S. olusatrum*

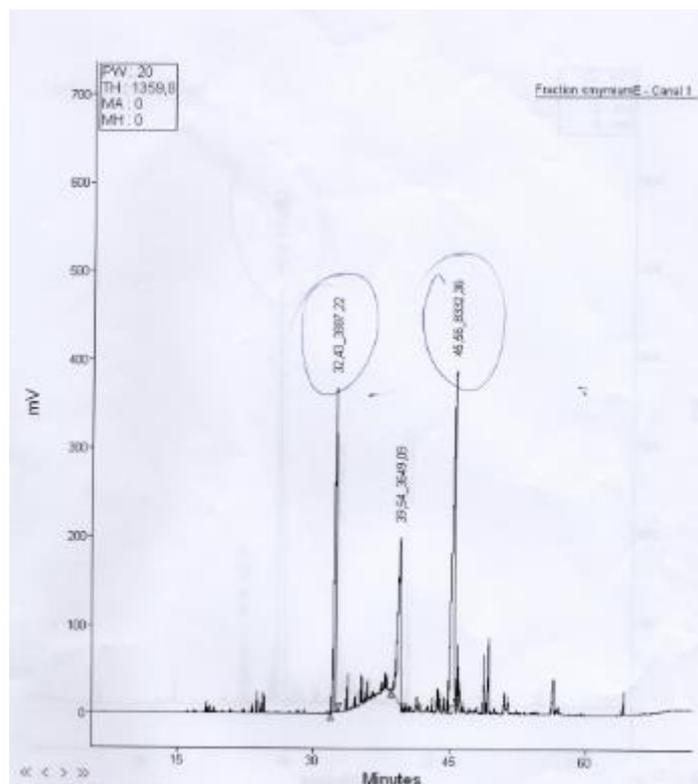


Figure 26 : Chromatogramme de la fraction E de *S. olusatrum*

3-Purification des composés majoritaires de l'huile de *S. olusatrum* :

Les molécules furanodiène et le furanoérmophilone ne sont pas commercialisés mais le curzurène est une molécule commercialisée mais il est un peu coûteux son coût est élevé. Donc nous avons procédé à la purification des composés majoritaires de l'huile essentielle de *S. olusatrum*. L'huile essentielle a été fractionnée sur une colonne ouverte, avec un mélange n-hexane (A)/acétate d'éthyle (B) comme éluant, selon le schéma donné à la **partie expérimentale**. Les fractions ont été analysées en CPG-FID.

Nous avons pu purifier les deux composés furanodiène avec une masse de 4.6 mg et une pureté de 60% et le furanoérmophilone avec une masse de 29 mg sous aspect d'une huile jaune avec une pureté de 97%. Malheureusement nous avons perdu le furanodiène au cours de l'évaporation du solvant, du fait que le furanodiène est une molécule sensible à la chaleur et à l'oxydation, nous pensons qu'il y avait une dégradation de cette molécule. Nous avons vérifié

à l'aide des CCM et les analyses CPG-FID qu'il y avait un changement radical entre les résultats après purification et les résultats après deux jours.

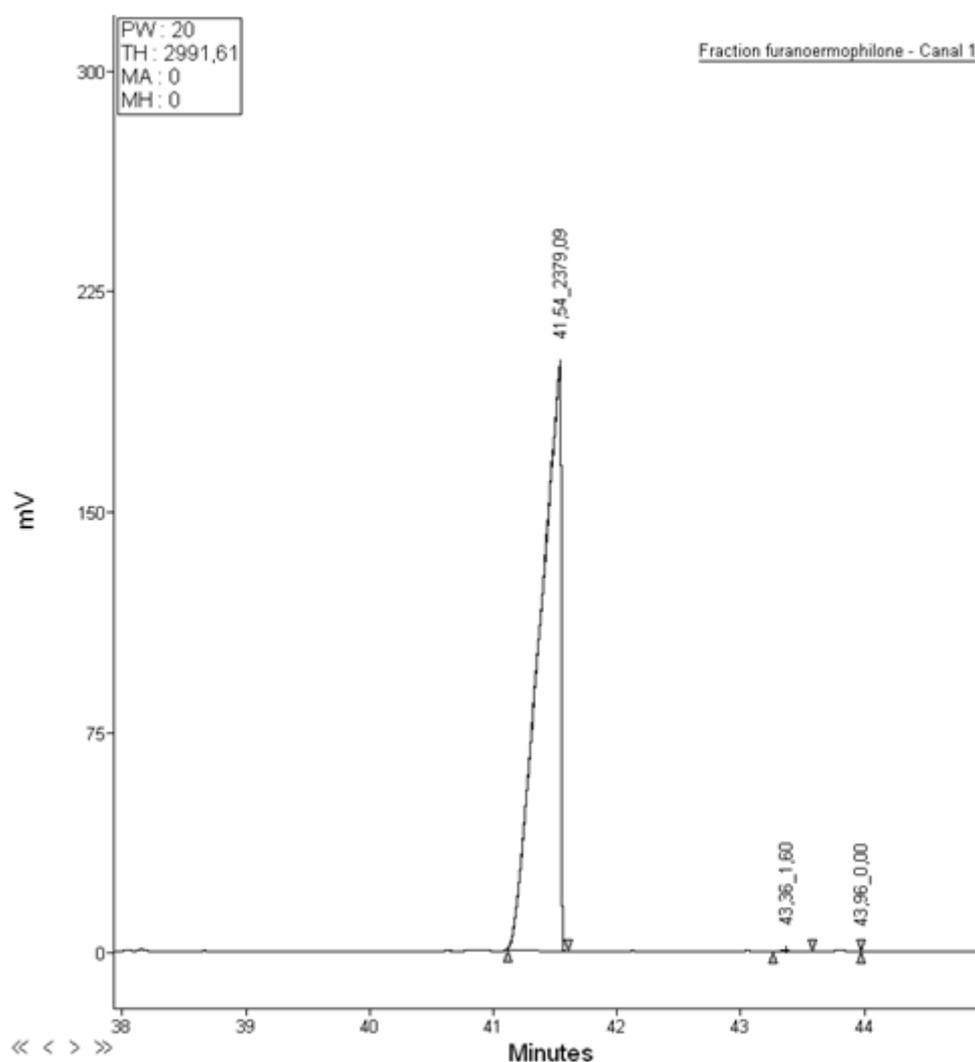


Figure 27 : Chromatogramme de furanoérmophilone pur

4-Etude des extraits cyclohexaniques de *Smyrniium olusatrum* :

Nous avons procédé à l'étude des extraits cyclohexaniques de *S. olusatrum* obtenu par la méthode de macération et par les ultrasons. Nous avons obtenu des extraits de couleur jaune et de composition moins complexe que l'huile avec des rendements de 1.8 % et 0.8 % respectivement, ainsi nous avons pu extraire par les deux méthodes les deux composés majoritaires furanodiène et furanoérmophilone avec des proportions moyennes. Ces extraits

peuvent présenter des alternatives de purification des deux composés majoritaires. Mais pour notre projet la purification des composés majoritaires à partir des extraits était difficile car il faut beaucoup de quantité de matériel végétal et nous n'avons pas la quantité adéquate pour faire une quantité des extraits suffisante pour la purification.

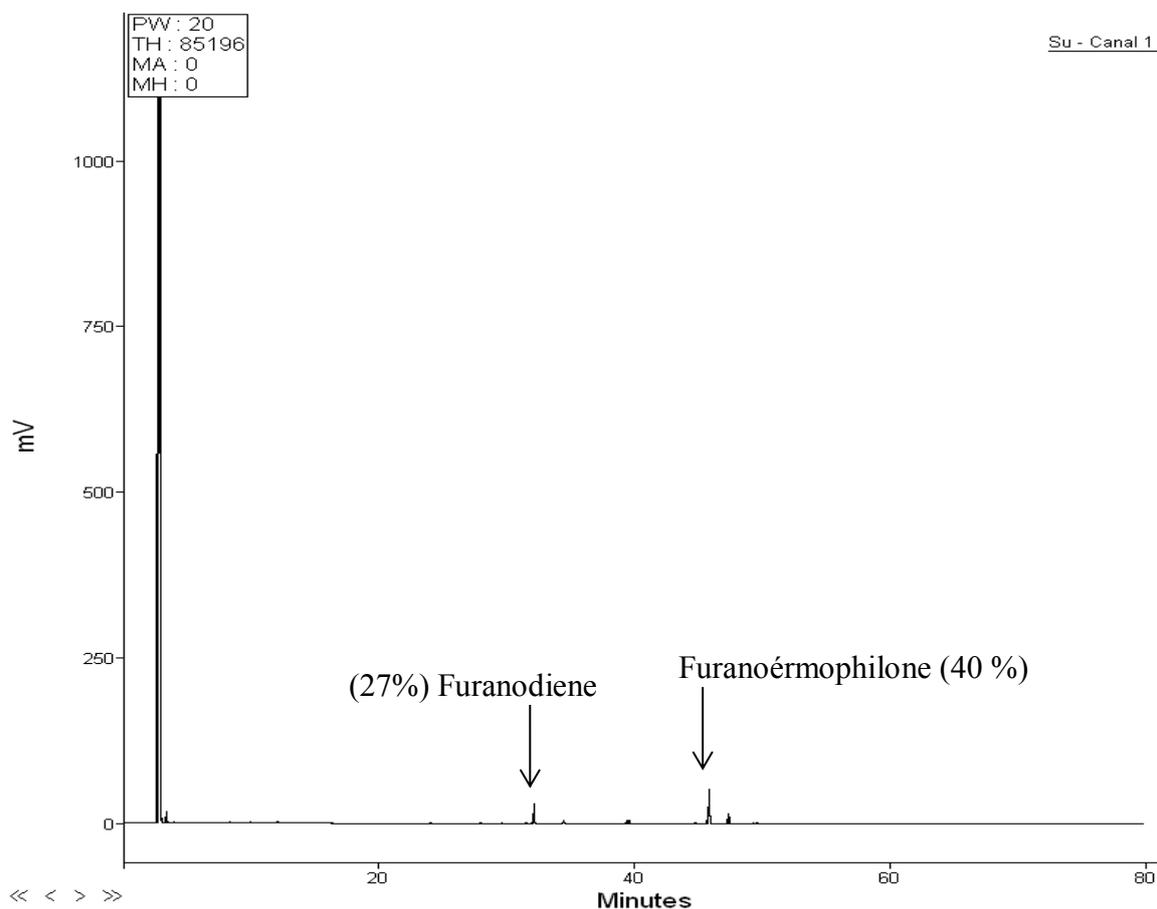


Figure 28 : Chromatogramme de l'extrait *S. olusatrum* par ultrason

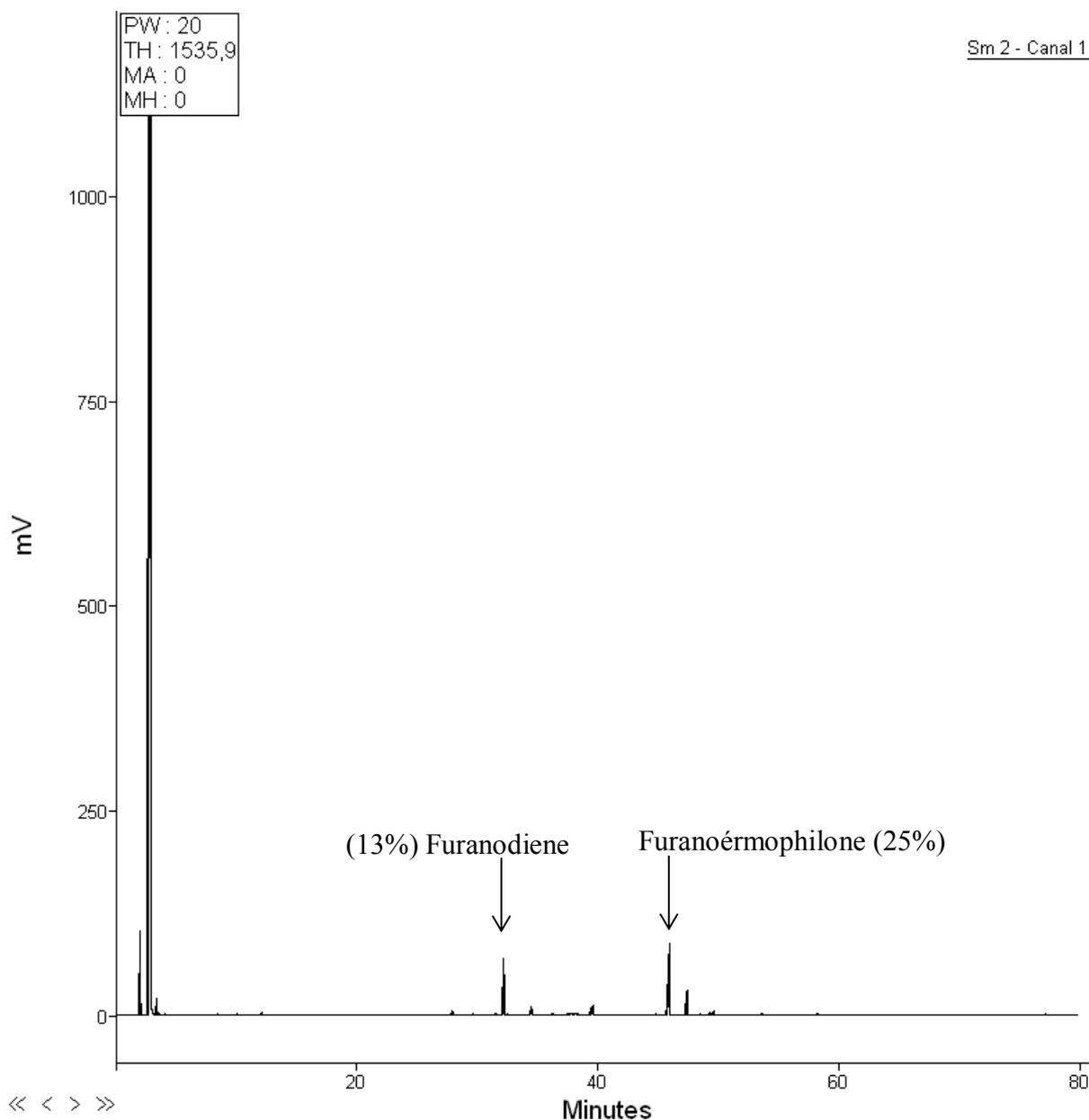


Figure 29 : Chromatogramme de l'extrait *S. olusatrum* par macération

5-L'oxydation de l'huile d'*Smyrniium olusatrum* :

Lorsque l'huile essentielle de *S. olusatrum* est déposée à l'air libre et à la température ambiante nous avons remarqué qu'après quelques jours la couleur de l'huile vire vers le rouge et son aspect devient très visqueux. Ce phénomène est du à l'oxydation de cette huile à l'air libre. Nous avons fait l'analyse de cette huile en GC-FID, nous avons obtenu le même profil chromatographique mais il y a une diminution considérable des proportions des composés

d'huile. En comparant les deux chromatogrammes, nous observons que l'intensité des composés majoritaires de l'huile normale qui dépasse les 500 mv alors que dans l'huile oxydée l'intensité de ces composés est moins de 500 mv. Ce changement de couleur et d'aspect indiquent qu'il y a un changement des propriétés physico-chimiques de l'huile.

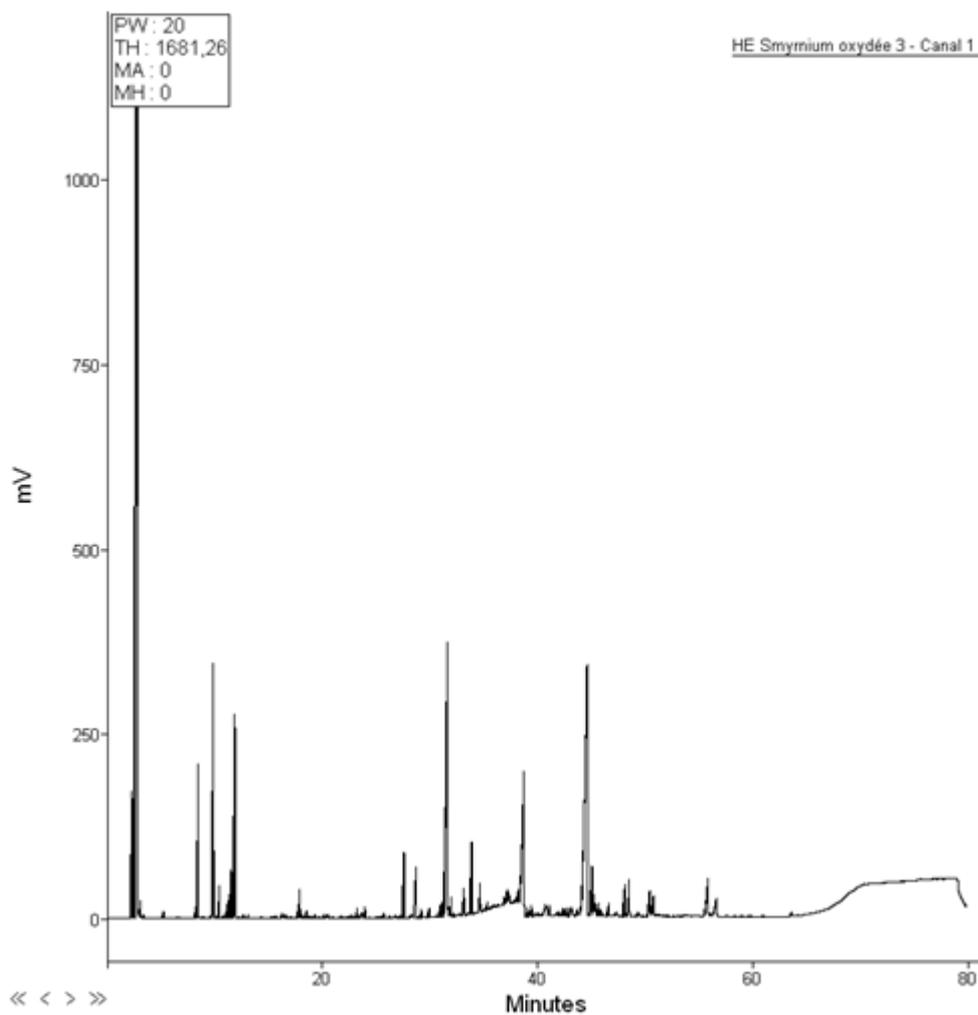


Figure 30 : Chromatogramme de l'huile de *S. olusatrum* oxydée

C – LES HUILE ESSENTIELLE DE *DAUCUS CRINITUS* DESCRIPTION DE NOUVEAUX PHENYLPROPANOÏDES.

D'après les informations dont nous disposons, l'huile essentielle de *Daucus crinitus* a été largement étudiée en Algérie parce que la plante a été utilisée en médecine traditionnelle grâce à ces propriétés thérapeutiques telle que des propriétés anti-inflammatoires. Cependant les études menées sur les huiles de *D. crinitus* ont montré que la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes est complètement différente de celles des parties racines.

1-L'analyse préliminaire de L'huile essentielle de *D. crinitus* :

Le matériel végétal (partie racine et partie aérienne) a été récolté sur une station de Tlemcen (Bensekrane) en mois Mai-Juin 2016-2017-2018. Il a été hydrodistillé durant 4 heures dans un appareillage de type Clevenger avec un rendement de 0,08 % pour les parties racines et 0.004 % pour les parties aériennes par rapport à la masse de végétal frais. Nous avons ainsi préparé 10 g d'huile essentielle provenant des parties racines de couleur blanche et 2 g d'huile essentielle provenant des parties aériennes de couleur jaune. L'huile de *D. crinitus* partie racine est une huile très aromatique, elle possède une odeur forte et caractéristique qui dure sur les surfaces des jours.

Les huiles essentielles ont été analysées par CPG-FID et CPG/SM. Le profil chromatographique est donné à la **figure 31**. Ces analyses ont permis d'identifier avec certitude 50 composés représentant 93.2 % de la composition totale de l'huile essentielle des parties aériennes et 92.4 % de la composition chimique de l'huile essentielle des parties racines. Les identifications ont été réalisées à partir des bibliothèques « maison » d'indices de rétention et de spectres de masse.

Les composés aliphatiques oxygénés étaient bien représentés dans les racines, des composés aliphatiques hydrocarbonés et des phénylpropanoïdes étaient présents dans les parties aériennes. En particulier, les principaux composés volatils des racines étaient des

composés aliphatiques (88,1% -96,3%) tels que le dodécanal (26.3%), l'undécane (15.3%), l'acétate de dodécyle (44.3%).

En ce qui concerne les parties aériennes, étaient dominées par des composés hydrocarbonés aliphatiques, en particulier, les alcanes tels que le pentadécane (5.1%) et l'heptadécane (3.4%). En plus, des monoterpènes d'hydrocarbures ont été identifiés (5.5%), par exemple, le limonène et le myrcène, et les composés phénylpropanoïdes tel que l'isobutyrate d'isochavicol et Isochavicol-2-methylbutyrate

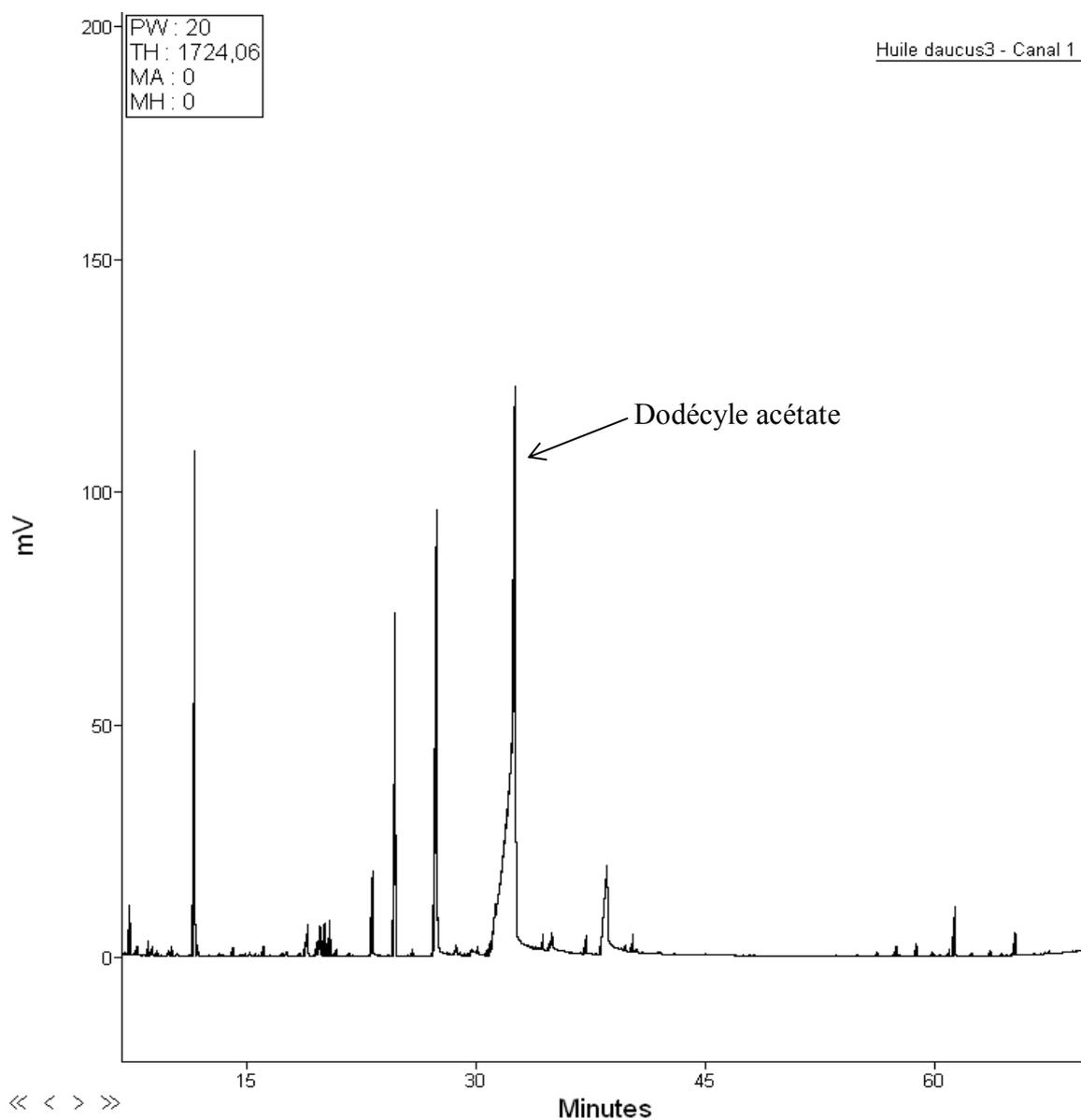


Figure 31 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *D. crinitus* partie racine

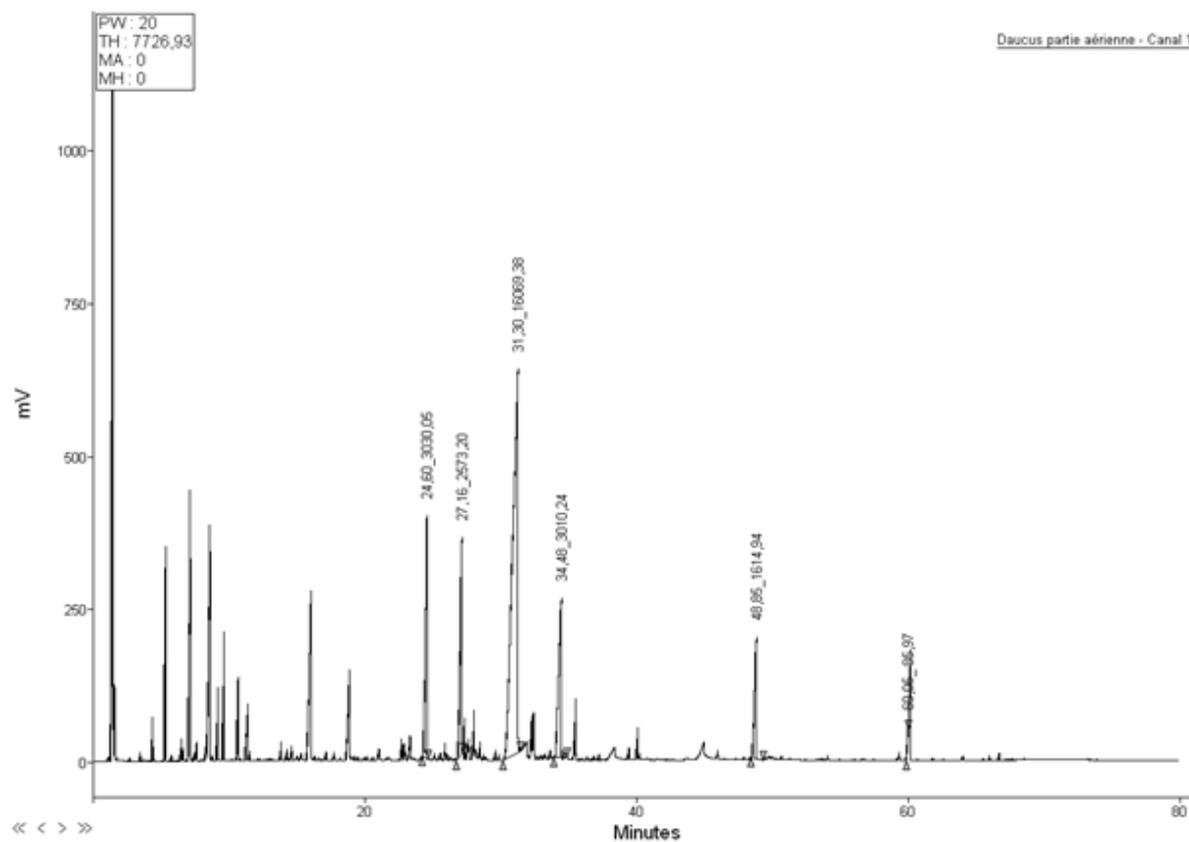


Figure 32 : Chromatogramme de l'huile de *D. crinitus* partie aérienne

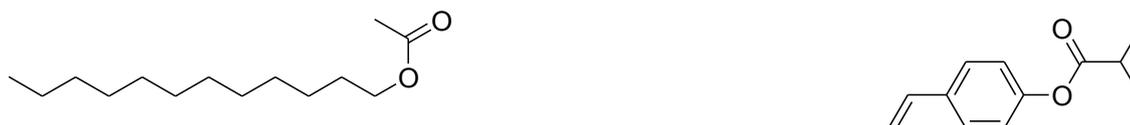


Figure 33 : Structure des composés majoritaires des huiles essentielles de *D. crinitus* partie racine et aérienne

Tableau 3 : La composition chimique des huiles essentielles de *D. crinitus* partie racine et aérienne

No	composés	IR ^b _a	HEcoll ^c		Identification ^d
			P.A	P.R	
1	Nonane	902	0,6	-	RI, MS
2	α - Pinène	931	0,5	-	RI, MS
3	Sabinène	966	0,6	-	RI, MS
4	β -Pinène	971	0,1	-	RI, MS
5	Myrcène	981	0,6	-	RI, MS
6	Décane	998	tr	-	RI, MS
7	p-Cymène	1012	0,2	-	RI, MS
8	1,8-Cinéole	1020	0,1	-	RI, MS
9	Limonène	1026	0,9	-	RI, MS
10	(E)- β -Ocinène	1037	0,6	-	RI, MS
11	γ -Terpinène	1049	1,6	-	RI, MS
12	2-Méthyl décane	1065	tr	-	RI, MS
13	α -Terpinolène	1079	0,4	-	RI, MS
14	Linalool	1087	0,2	-	RI, MS
15	Undécane	1098	4,1	15,3	RI, MS
16	Terpinèn-4-ol	1161	0,1	-	RI, MS
17	Octyl acétate	1187	2,3	-	RI, MS
18	Décanal	1187	1,4	-	RI, MS
19	Dodécane	1198	tr	0,1	RI, MS
20	Décanol	1259	0,1	0,1	RI, MS
21	Undécanal	1280		-	RI, MS

22	Tridécane	1292	0,1	0,4	RI, MS
23	n-Octylisobutyrate	1325	tr	-	RI, MS
24	Acide décanoïque	1348		tr	RI, MS
25	Benzyl-2-méthylbutyrate	1352	tr	-	RI, MS
26	Undécanol	1367	0,1	-	RI, MS
27	α -Copaène	1372	tr	-	RI, MS
28	Dodécanal	1390	3,1	26,3	RI, MS
29	β -Caryophyllène	1424	0,6	-	RI, MS
30	Trans- α -berganotène	1432	0,1	-	RI, MS
31	α -Humulène	1451	0,7	-	RI, MS
32	Zizaène	1463	tr	2,7	RI, MS
33	Dodécanol	1470	tr	-	RI, MS
34	Pentadécane	1497	5,1	-	RI, MS
35	Géranyl butyrate	1530	-	0,1	RI, MS
36	Isochavicol isobutyrate	1541	44,9	-	RI, MS
37	(z)-3-Héxényl benzoate	1557	0,1	0,1	RI, MS
38	Acide dodécanoïque	1560	1,1	-	RI, MS
39	Dodécyl acétate	1580	2,5	44,3	RI, MS
40	Héxadécane	1599	0,1	-	RI, MS
41	Isochavicol-2-méthylbutyrate	1648	9,7	2,3	RI, MS
42	Héptadécane	1703	3,4	-	RI, MS
43	Benzyl benzoat	1723	0,1	tr	RI, MS
44	Acide tétradécanoïque	1756	3,1	2	RI, MS
45	Lactarazulène	1792	0,7	0,4	RI, MS
46	Héxadécanal	1787	0,1	0,3	RI, MS

47	Néophytadiène	1807	0,4	-	RI, MS
48	Dodécyl pentanoate	1840	-	-	RI, MS
49	Acide hexadécanoïque	1949	1,1	-	RI, MS
50	(E)-Phytol	2102	1,7	-	RI, MS
Total			93,2	92,4	
	Composés hydrocarbonés		21,4	18,9	
	Composés oxygénés		71,8	73,5	
	Composés aliphatiques		28,4	87	
	Composés Phenylpropanoid		54,7	2,3	
	Composés hydrocarboné non- terpenique		13,8	15,8	
	monoterpenes hydrocarbonés		5,5	-	
	Sesquiterpenes hydrocarbonés		2,1	3,1	
	Diterpenes hydrocarboné non-terpenic oxydé		0,4	-	
	Monoterpenes oxygénés		0,4	-	
	Diterpenes oxygénés		1,7	-	

^a L'ordre d'élution est donné sur la colonne apolaire (DB5),

^b Les indices de rétention sur la colonne DB5 (RIa),

^c Les huiles collectives: l'huile essentielle des parties racines de *D. crinitus*. tr = trace (<0,05%)

^d RI: indices de rétention; MS: Spectrométrie de masse en mode impact électronique. Tous les composés ont été identifiés en comparant leurs indices EI-MS et de rétention avec les références compilées dans la bibliothèque interne.

P.A : Partie Aérienne ; P.R : Partie Racine

2-Fractionnement de l'huile essentielle de *Daucus crinitus* en fractions moins complexes :

Nous avons procédé au fractionnement de l'huile essentielle de *D. crinitus* partie racine par la flash chromatographie en prenant 1g d'huile essentielle en utilisant le cyclohexane / acétate d'éthyle comme éluant. Cet fractionnement nous a donné cinq fractions. Toutes les fractions ont été analysées par CPG-FID. Nous avons obtenue quatre fractions qui sont FDC1, FDC2, FDC3, FDC4. Les masses sont : 10, 260, 210, 40 mg respectivement.

La fraction FDC1 est dominée par undécane, tridécane, dodécyle acétate, l'héxadécanal. La seconde fraction FDC2, le tridécane, dodécanal, (Z)-(3)-hénényl-benzoate et isochavicol-2-méthyl butyrate ont été identifié. La troisième fraction FDC3 est dominée par undécane, dodécane, dodécanal et (Z)-(3)hénénylbenzoate. La dernière fraction FDC4 est dominé par dodécane, zizaène, (Z)-(3)-hénényl benzoate, isochavicol-2-méthylbutyrate et acide tétradécanoïque.

D'après nos recherches, le composé majoritaire de l'huile de *D. crinitus* partie racine est le dodécyle acétate est une molécule commercialisé et son cout est moins cher, nous avons envisagé d'acheté la molécule afin de gagner le temps au lieu de le purifier par la chromatographie.

A notre connaissance, le composé majoritaire de l'huiles de *D.crinitus* partie aériene n'est pas commercialisé et pour purifier cette molécule à partir de l'huile essentielle nous ne disposons pas de la quantité d'huiles essentielles suffisante, pour cette raison nous avons opté à la synthèse de cette molécule.

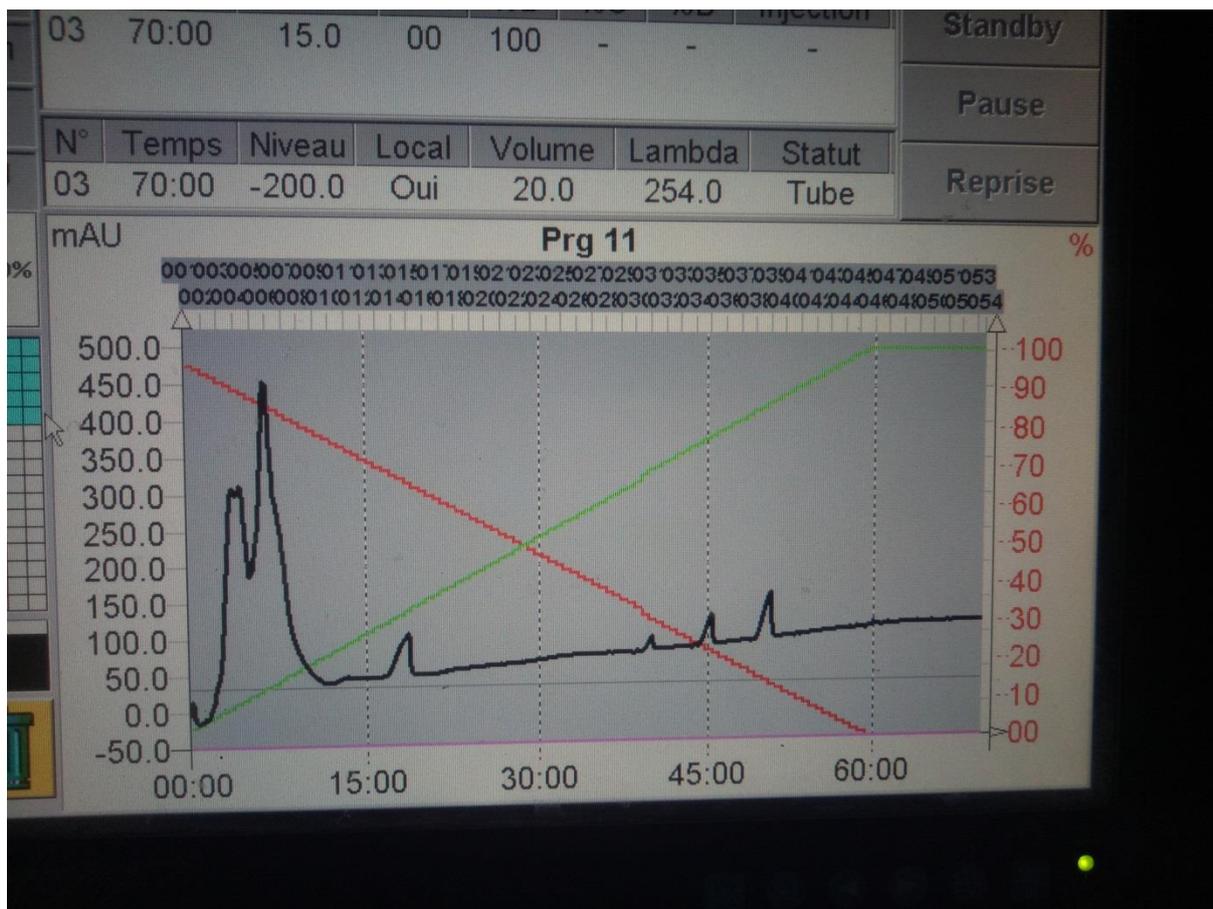


Figure 34 : Chromatogramme de fractionnement de l'huile *D. crinitus* par la flash chromatographie

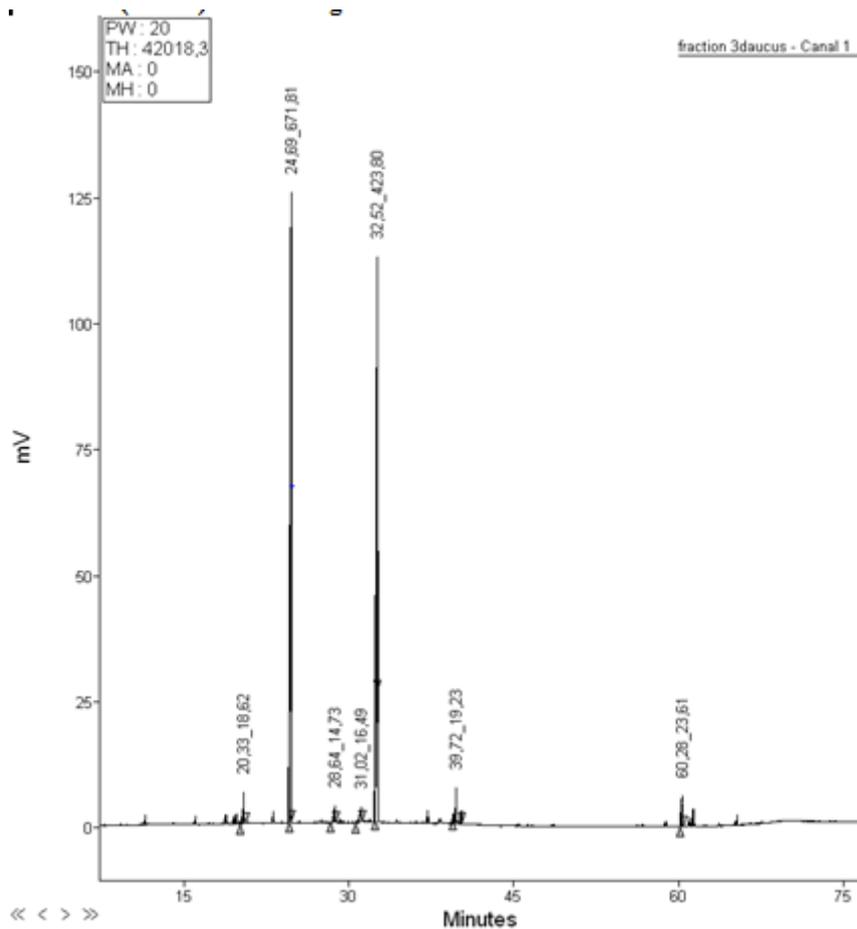


Figure 35 : Chromatogramme de la fraction 1 de *D. crinitus* partie racine

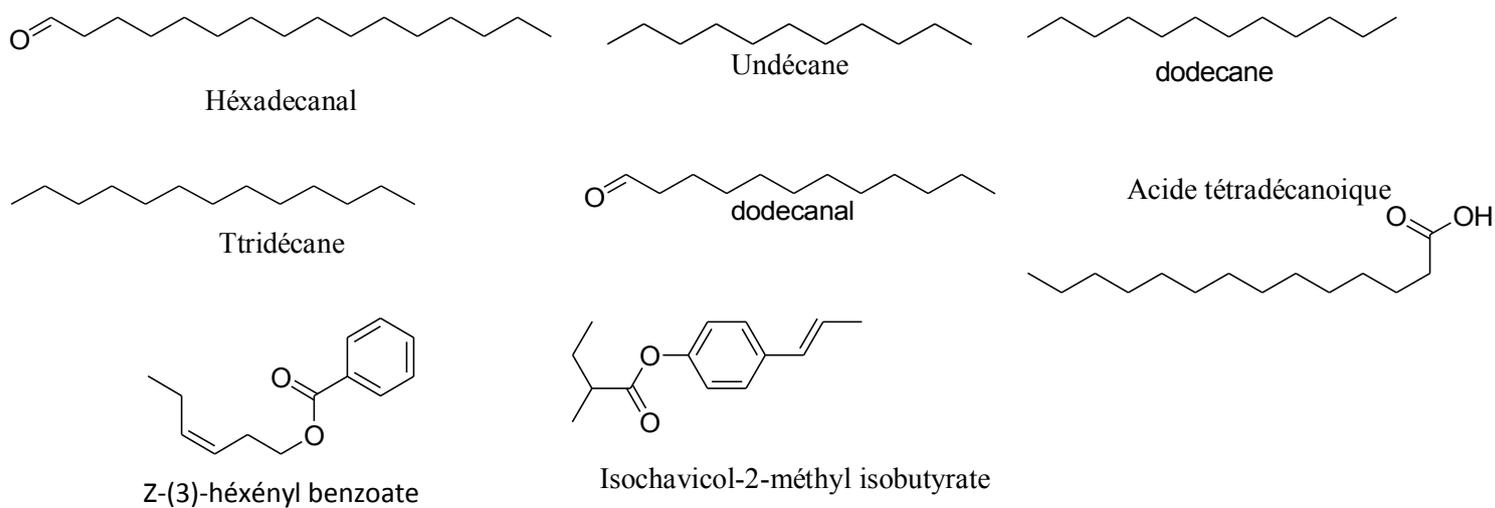


Figure 36 : Les composés des différentes fractions de *D. crinitus*

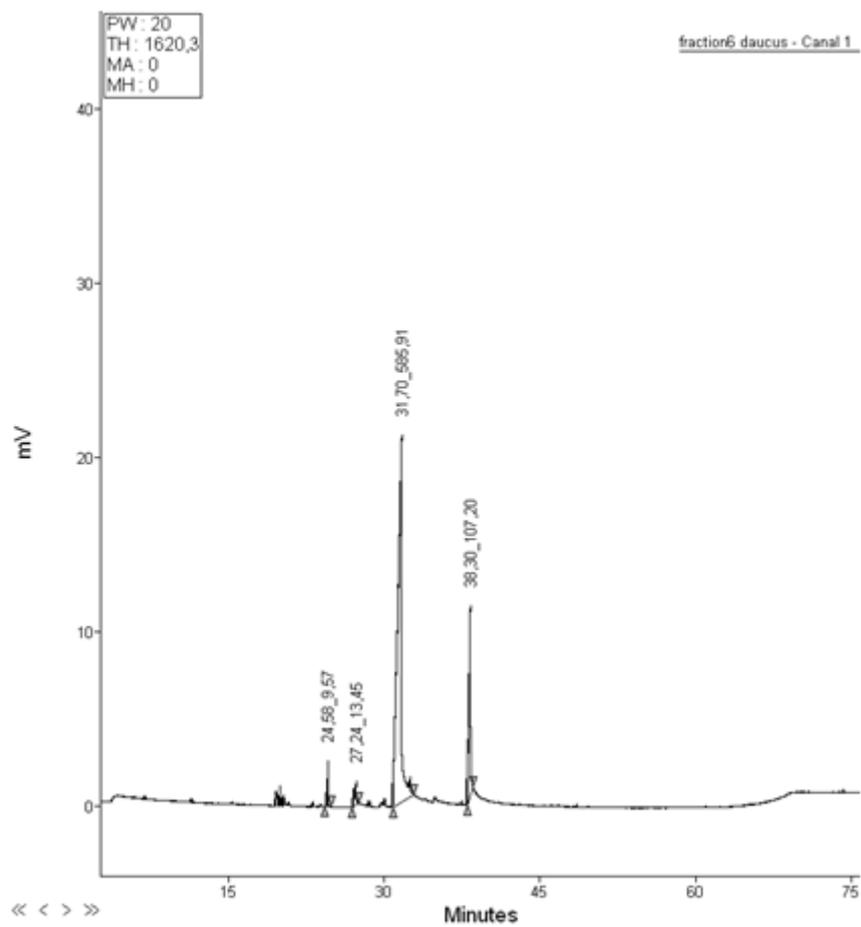


Figure 37 : Chromatogramme de la fraction 2 de *D. crinitus* partie racine

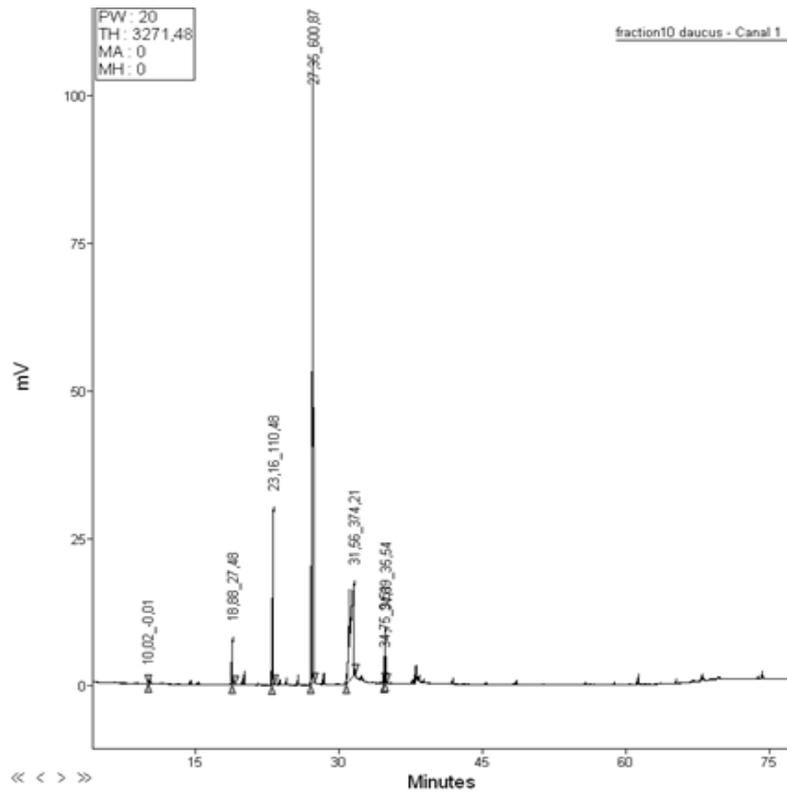


Figure 38 : Chromatogramme de la fraction 3 de *D. crinitus* partie racine

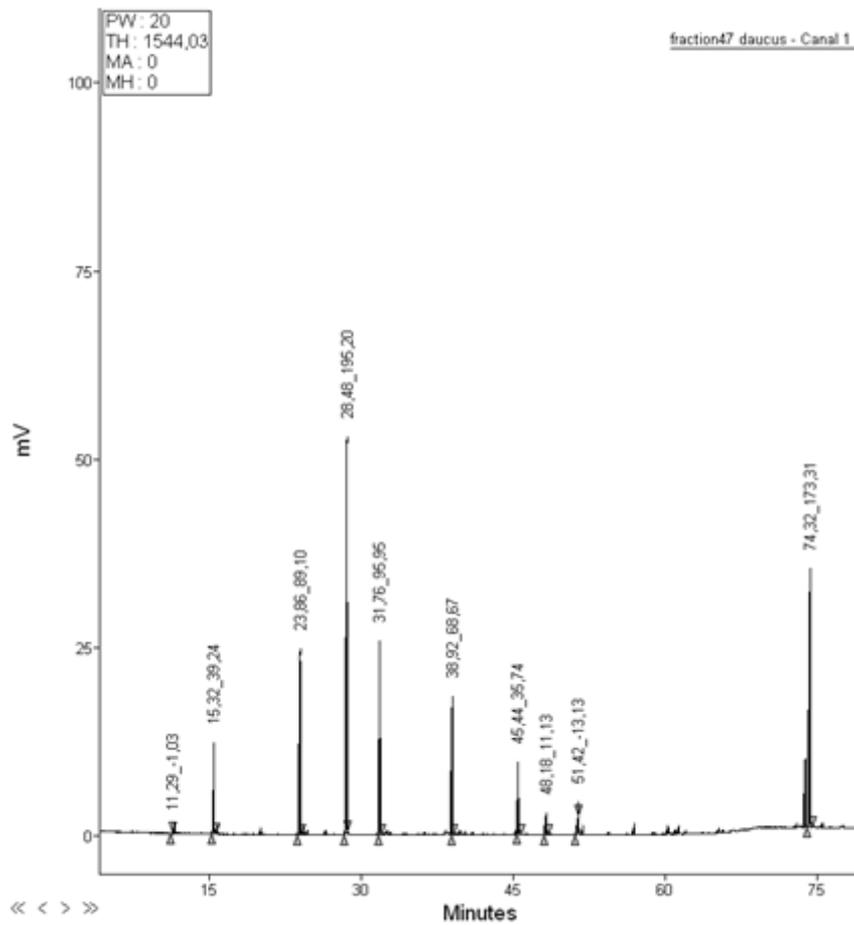


Figure 39 : Chromatogramme de la fraction 4 de *D. crinitus* partie racine

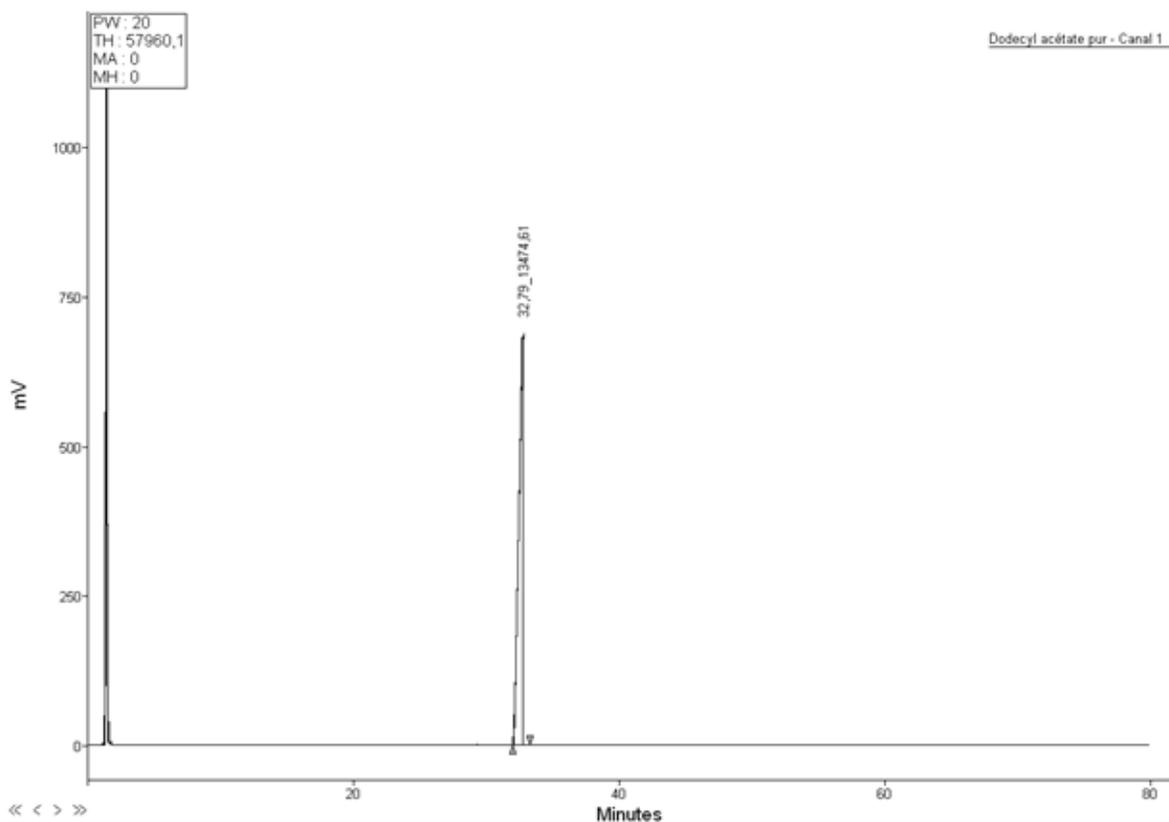


Figure 40 : Chromatogramme de dodécyle acétate pur

3-Etude des extraits cyclohexaniques de *Daucus crinitus* partie racine :

Nous avons procédé à l'étude des extraits cyclohexaniques de *D. crinitus* partie racine obtenu par macération et par les ultrasons. Nous avons obtenu des extraits de couleur marron claire avec des rendements de 0.2 % et 0.4 % respectivement. Les extraits ont été analysés par la CPG-FID. Les analyses ont montré que les deux extraits avaient des compositions totalement différentes que celle des huiles essentielles et l'identification des composés est en cours

4-La synthèse de l'isochavicol isobutyrate :

Nous avons procédé à la synthèse de l'isochavicol isobutyrate. L'isochavicol isobutyrate est un ester aromatique de l'isobutyrate substitué en para par un groupement méthylvinyl. Nous avons envisagé une suite rétrosynthétique dans laquelle le composé souhaité sera formé en quatre étapes majeures en utilisant des réactions classiques de synthèse organique ne

nécessitant pas de conditions réactionnelles et/ou des matériels sophistiqués. Dans notre stratégie, l'isochavicol isobutyrate **11** sera obtenu *via* une réaction d'esterification à du chlorure d'isobutyryl **12** et phenol **10** lui-même issu d'un couplage de Suzuki-Miyaura entre l'halogeno-aryle **14** et l'ester boronique **13**. Le schéma de rétrosynthèse est décrit ci-dessous :

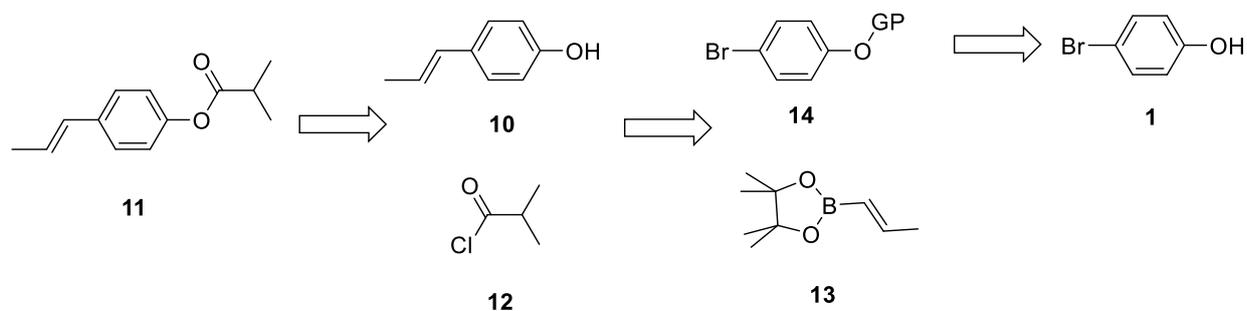


Schéma 6 : Schéma de la rétrosynthèse de l'isochavicol isobutyrate

La synthèse de l'isochavicol isobutyrate passe par quatre réactions classiques (schéma7).

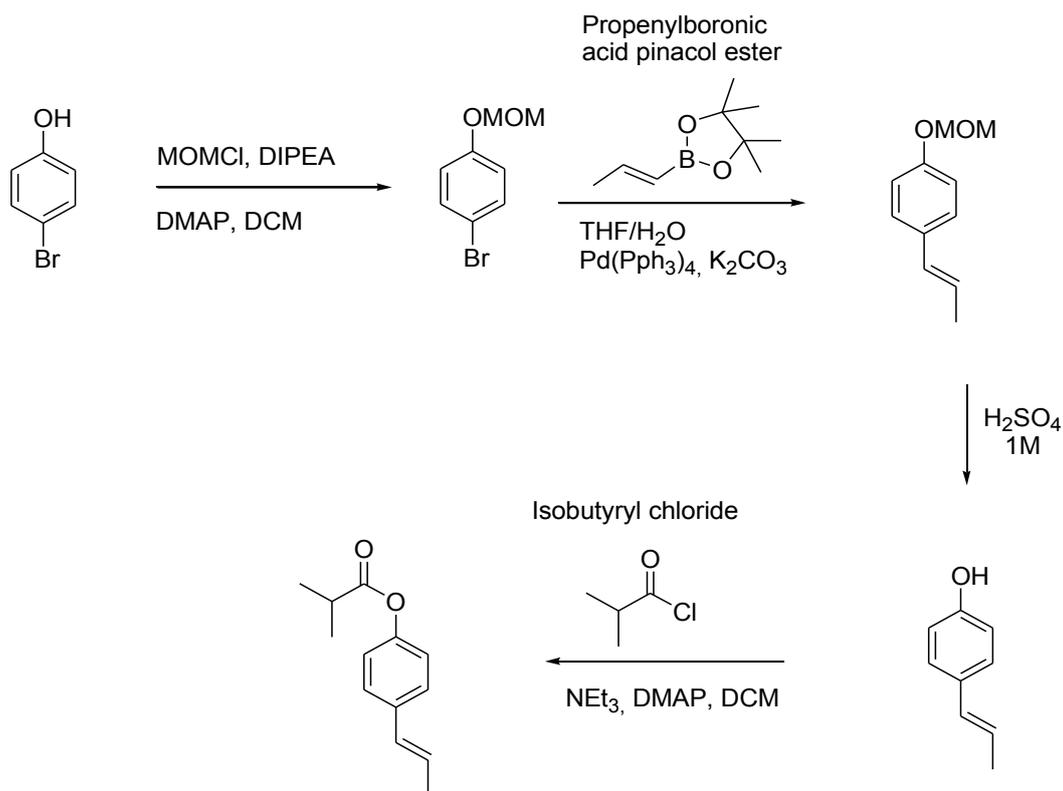
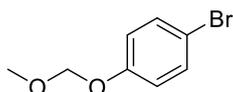


Schéma 7 : Schéma réactionnel de la synthèse de l'isochavicol isobutyrate

4.1. Protection du 4-bromophenol par le groupement methoxymethoxy ether :



1-bromo-4-(methoxymethoxy)benzene (2)



Afin de limiter les réactions secondaires et optimiser le rendement de la réaction de couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura, nous avons commencé la synthèse du produit par une étape de protection de la fonction phénol du réactif 4-bromophenol **1**. Nous avons choisi le groupement protecteur méthoxyméthyle éther (MOM) en raison de sa résistance aux conditions basiques dans lesquelles doivent se réaliser la réaction de couplage.

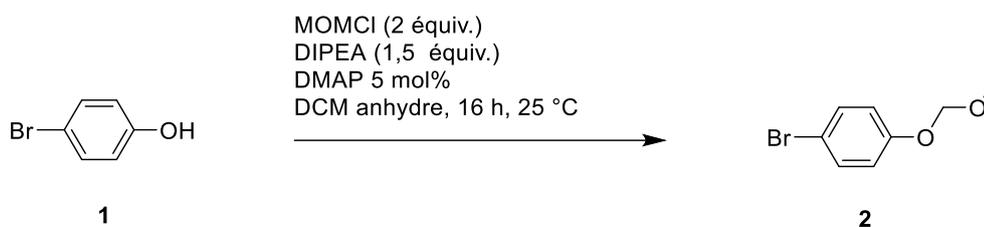


Schéma 8 : Schéma réactionnel de la protection du 4-bromophenol par le groupement methoxymethoxy ether

La formation du composé protégé **2** a été effectuée à température ambiante dans le dichlorométhane anhydre (DCM) en présence d'un excès de méthyle chlorométhyle éther (MOMCl), du diisopropyl ethyl amine (DIPEA) et de la 4-diméthylamino-pyridine (DMAP).

Dans le mécanisme réactionnel de formation du produit, la base de Hünig **3** (DIPEA) déprotone d'abord le 4-bromophénol. Le phénolate **6a** obtenu réalise ensuite une substitution nucléophile sur le méthyle chlorométhyle éther **5** pour conduire au produit souhaité **6**. Lors de la réaction, un équivalent d'acide chlorhydrique est produit dans le milieu réactionnel. La base (DIPEA) est ajoutée en excès (2 équiv.) afin de neutraliser cet acide fort (HCl). Le mécanisme de la réaction est détaillé dans le **Schéma 9** ci-dessous.

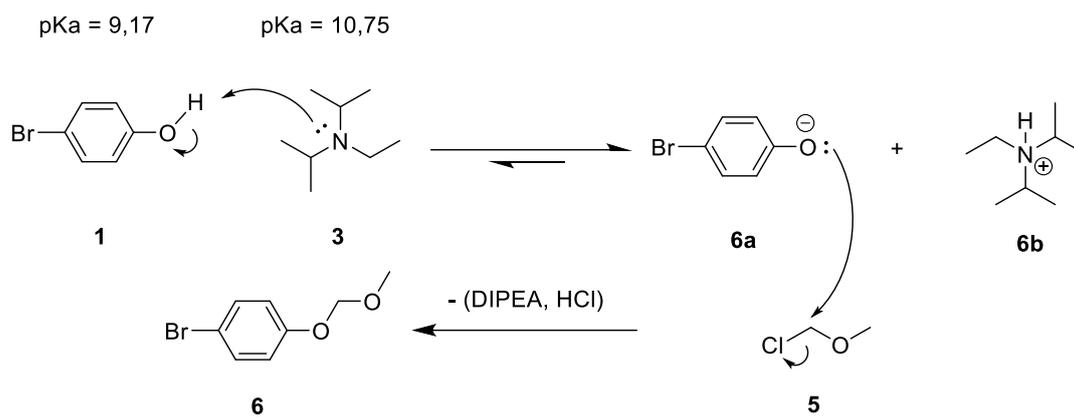


Schéma 9 : Mécanisme de protection du 4-bromophenol par le groupement méthoxy-methylether

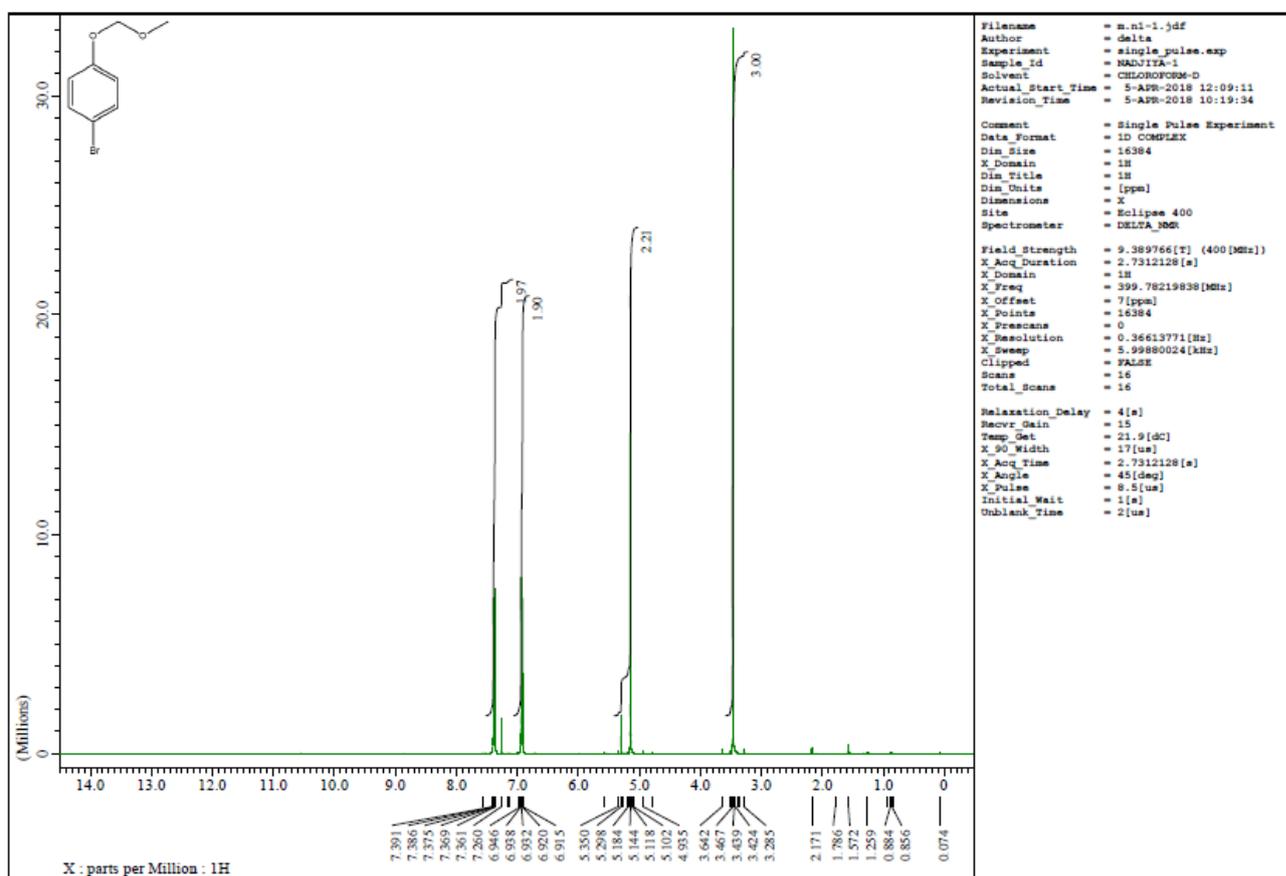


Figure 41 : Spectre RMN 1H de produit 2 protection

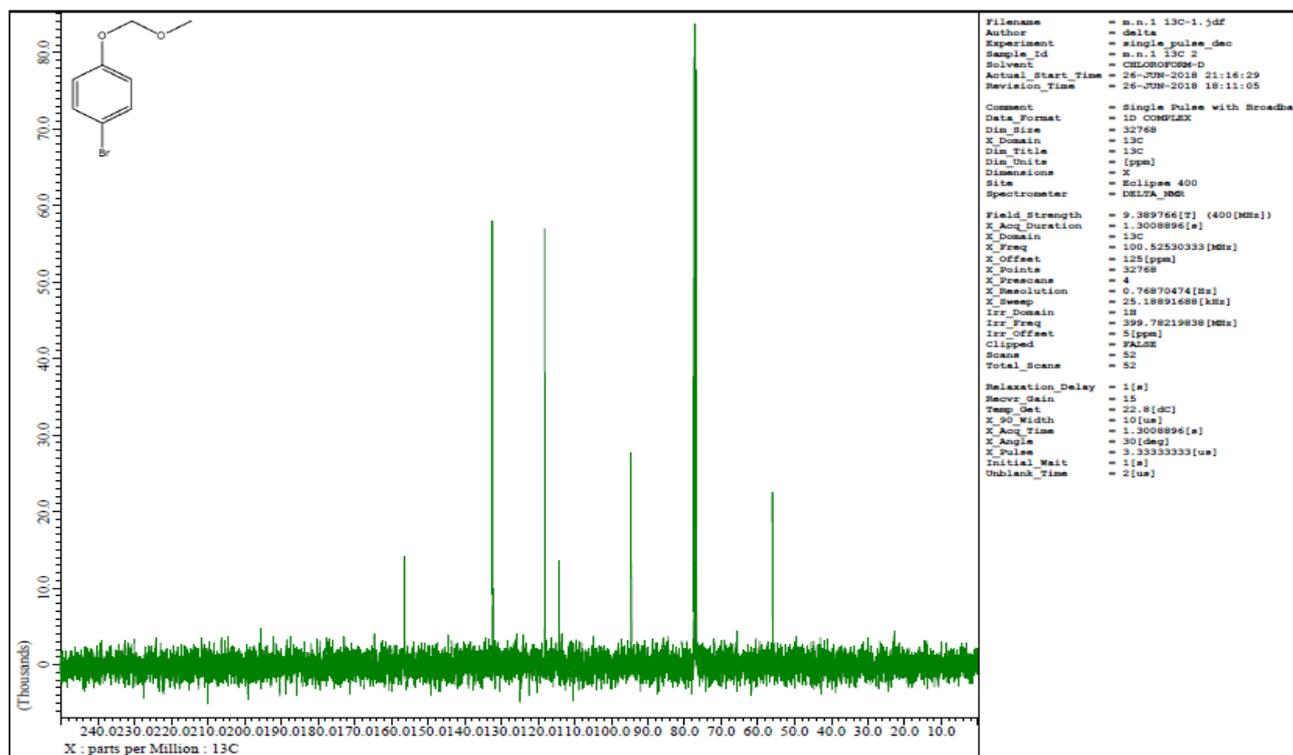
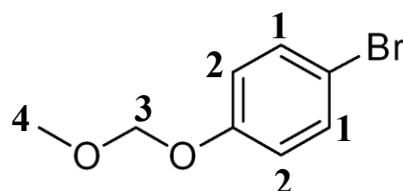
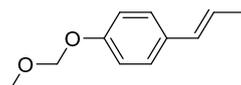


Figure 42 : Spectre RMN 13C de produit 2 protection

Le produit **2** a été obtenu sous forme d'huile incolore (5.98 g, 95% yield) ⁶ ; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H : **(1)** 7.41 (dd, 2 H, ArH), **(2)** 6.93 (dd, 2 H, ArH), **(3)** 5.15 (s, 2H, OCH₂O), **(4)** 3.45 (s, 3 H, OCH₃). ¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) δ_C : 156.67, 132.63 (x2), 118.4 (x2), 114.52, 94.81, 56.35. CCM : R_f (cyclohexane/AcOEt 90:10) = 0.76



4.2. Couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura :



(E)-1-(methoxymethoxy)-4-(prop-1-en-1-yl)benzene (3)

$$C_{11}H_{14}O_2 \text{ MW} = 178.10 \text{ g.mol}^{-1}$$

La prochaine étape dans la suite réactionnelle de formation de l'isochavicol isobutyrate **11** est le couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura. Cette réaction a lieu en milieu basique en présence d'un excès de K_2CO_3 , dans un mélange THF/ H_2O et en utilisant le $[Pd^0]$ comme catalyseur. Nous avons obtenu à la fin de réaction un mélange entre le produit et le réactif ainsi un faible rendement de réaction. Nous avons désiré à augmenter le rendement de la réaction, donc nous avons fait trois réactions pour aboutir à un bon rendement.

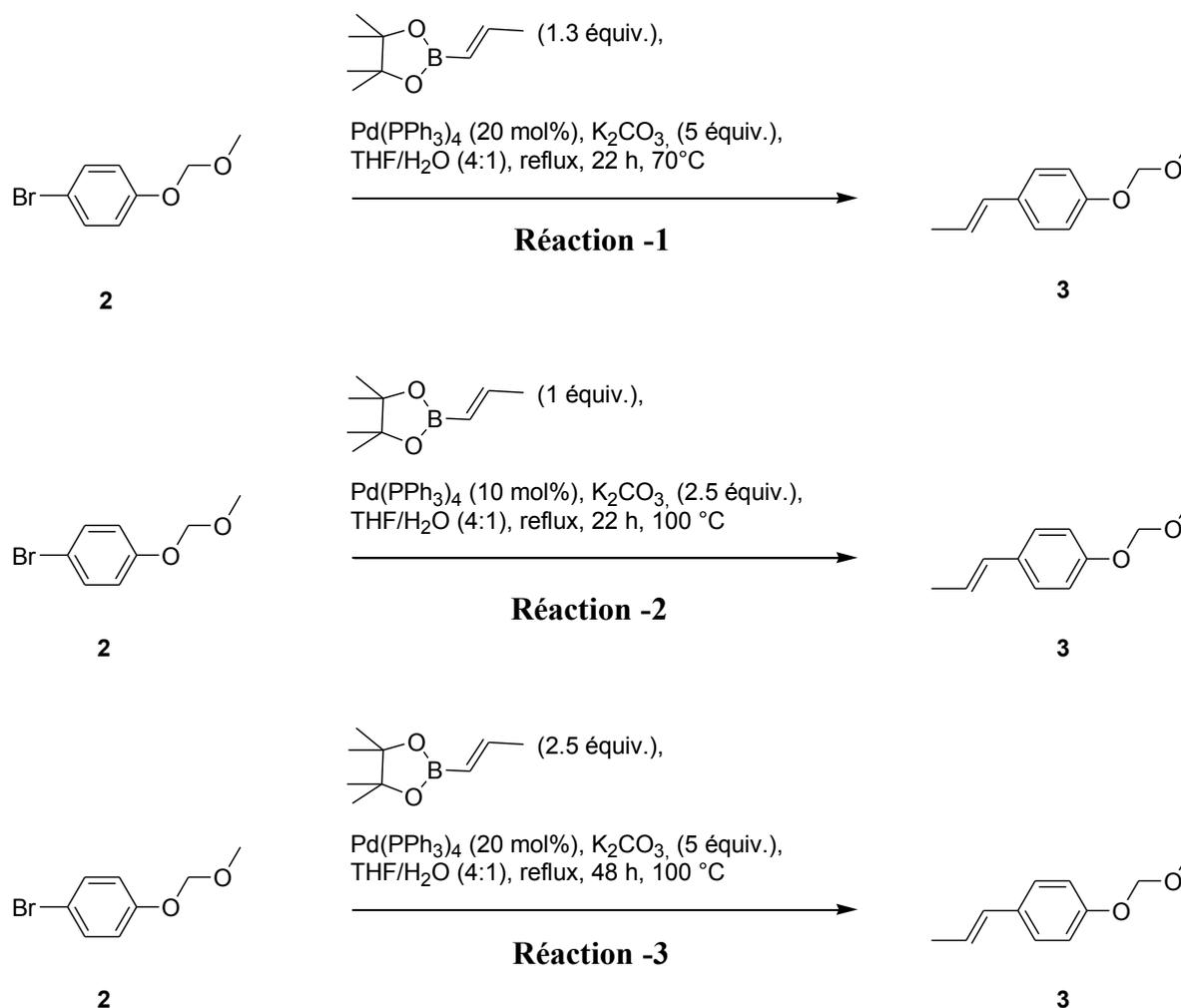


Schéma 10 : Schéma réactionnel de couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura avec différents conditions opératoires

La première réaction a été réalisée à 70 °C, 22 h, cette réaction nous a conduits à un rendement de 57 % et le produit est un mélange de 79 % de produit et 21 % de réactif, le

problème c'est que les Rf des produits et des réactifs sont superposables. La seconde réaction a été réalisée à 100 °C, 22 h et nous avons diminué la quantité des réactifs à moitié, nous avons obtenu un rendement de 70 % et le produit est un mélange de 76 % de produit et 24% de réactif. La dernière réaction a été réalisée à 100 °C, 48 h et nous avons doublé la quantité des réactifs et nous avons obtenu un rendement de 93 % et un produit pur. D'après cette expérience nous sommes tenus compte que pour réaliser cette réaction avec des bons rendements, il faut augmenter le facteur temps et température car ils jouent un rôle très important dans la formation du produit ainsi il faut que le catalyseur soit en excès afin d'amortir la réaction

Lors du couplage de Suzuki-Miyaura, le palladium [Pd⁽⁰⁾], utilisé comme catalyseur, réalise une addition oxydante sur le 4-bromo-aryle **2** suivie de l'échange de ligand du brome par l'ion hydroxyde présent dans le milieu (condition basique). Ce groupement hydroxyde lie le bore et facilite la transmétallation de l'alcène sur le palladium via la formation de l'intermédiaire réactionnelle **3c**. La prochaine étape est une cis-isomérisation. Elle est également assistée par l'ion hydroxyde. La cis-isomérisation permet le rapprochement des groupements aryle et alcène favorisant de ce fait la dernière étape d'élimination réductrice. On obtient ainsi le produit de couplage et la régénération du catalyseur. Le mécanisme réactionnel de couplage de Suzuki-Miyaura est détaillé dans le **Schéma 11** ci-dessous :

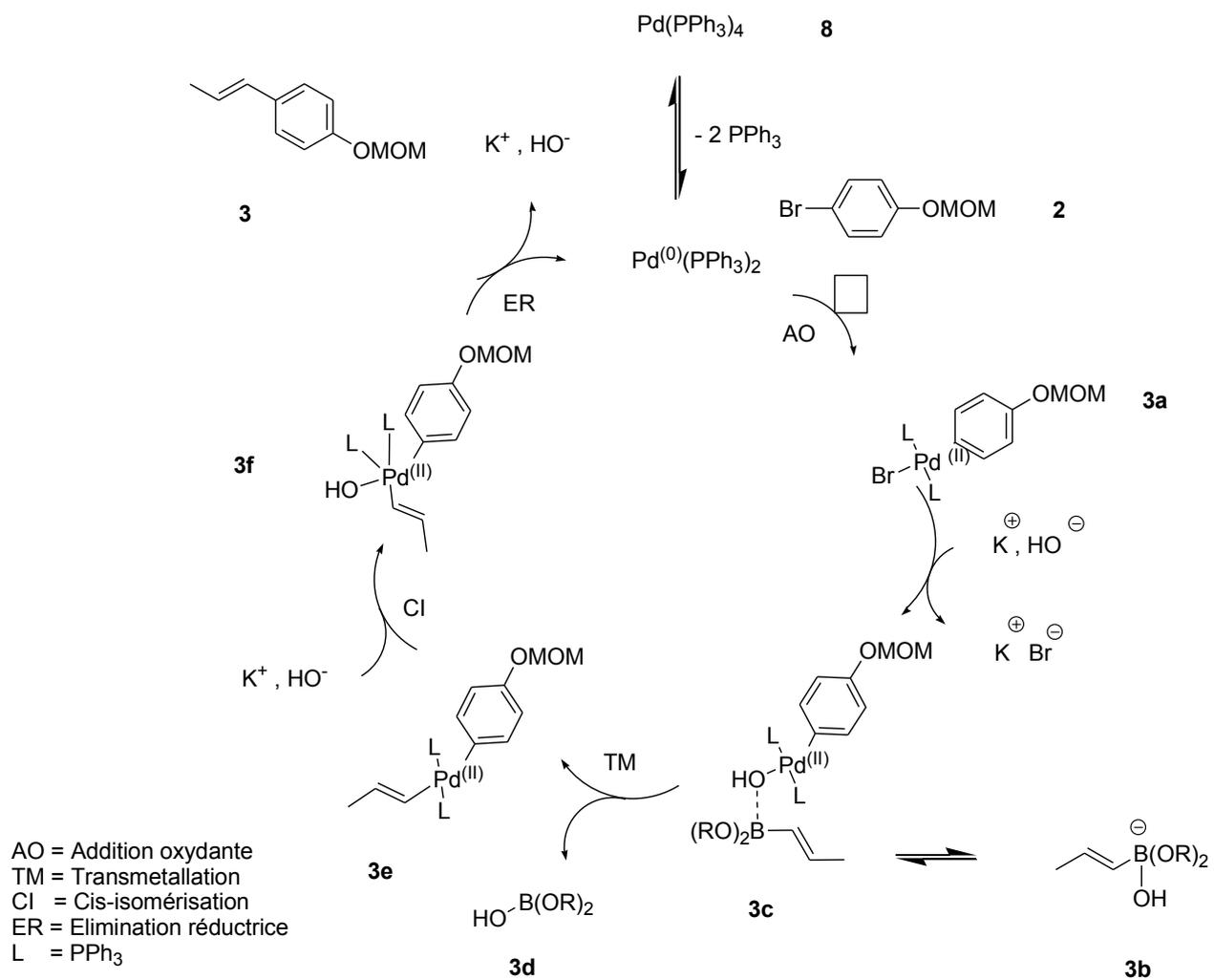


Schéma 11 : Mécanisme de la réaction de couplage de Suzuki-Miyaura

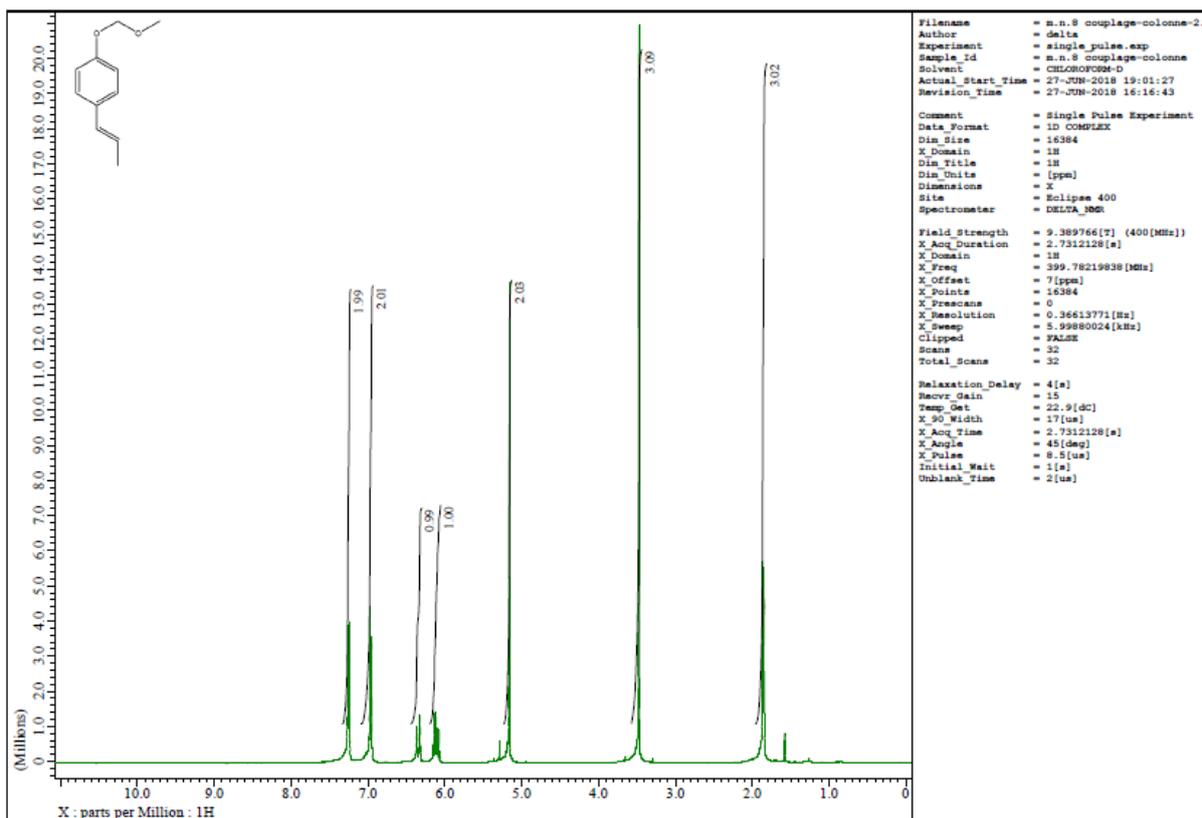


Figure 43 : Spectre RMN 1H de produit 9 couplage

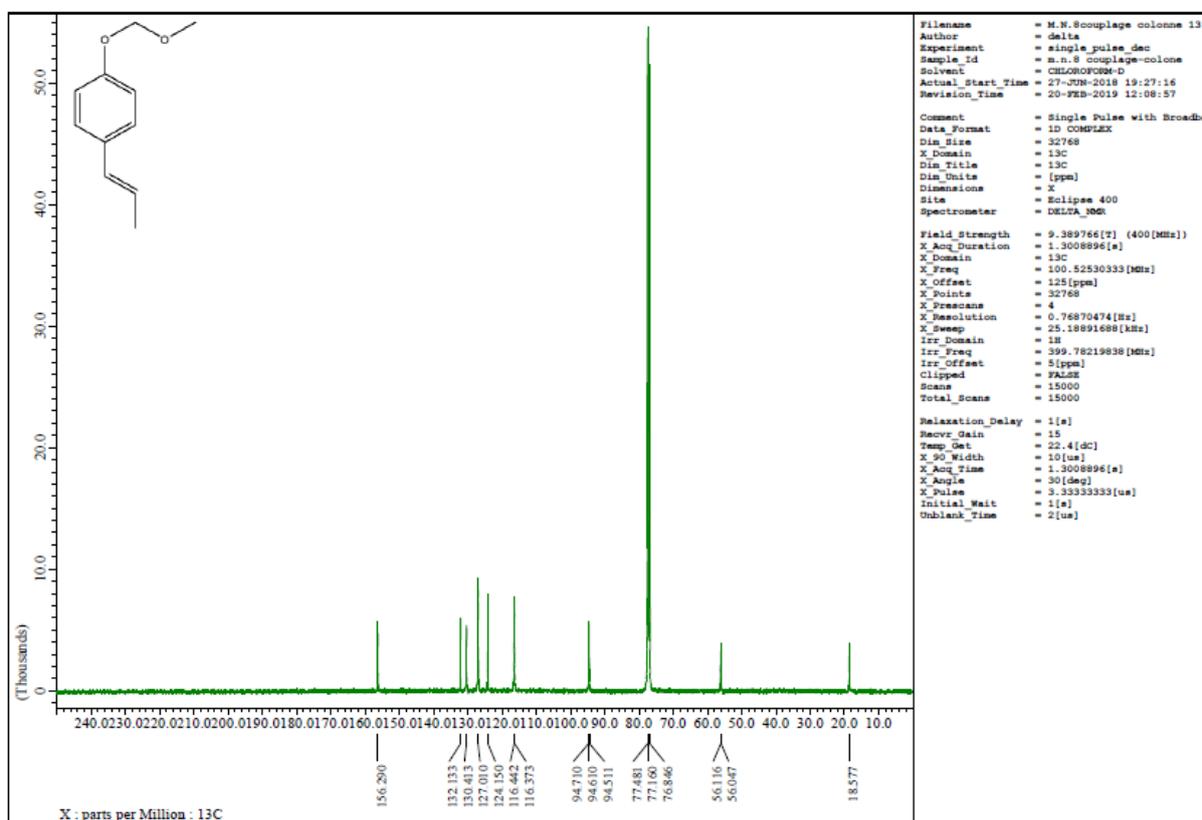
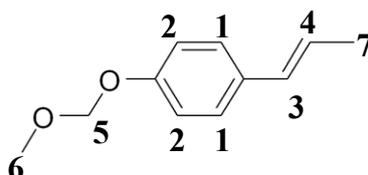
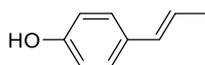


Figure 44 : Spectre RMN 13C de produit 9 couplage

Le produit pur **3** a été obtenu comme une huile d'ambre (224 mg, 93% yield) ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_H : **(1)** 7.24 (dd, 2 H, $J = 32$, $J = 2$, ArH), **(2)** 6.96 (dd, 2 H, $J = 32$, $J = 2$, ArH), **(3)** 6.35 (dd, 1 H, $\text{HC}=\text{C}$), **(4)** 6.1 (dq, 1 H, $\text{C}=\text{CH}$), **(5)** 5.15 (s, 2 H, OCH $\underline{\text{O}}$), **(6)** 3.45 (s, 3 H, OCH $\underline{\text{3}}$), **(7)** 1.85 (dd, 3 H, CH $\underline{\text{3}}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100.5 MHz, CDCl_3) δ_C 156, 132, 131, 127, 124, 116, 95, 56, 18.. CCM : Rf (cyclohexane/AcOEt 90:10) = 0.67



4.3. Déprotection du groupement méthylmethoxy ether :



(E)-4-(prop-1-en-1-yl)phenol (4)

$$C_9H_{10}O \text{ MW} = 134.07 \text{ g.mol}^{-1}$$

Le produit de couplage ainsi obtenu est engagé dans la prochaine étape de déprotection du groupement méthylmethoxy ether. Cette réaction a lieu en milieu acide et à température réduite (10 °C) dans un mélange THF/ H_2O . Les conditions d'hydrolyse ont été changées deux fois et la réaction a été réalisée trois fois dans le but d'obtenir le produit souhaité :

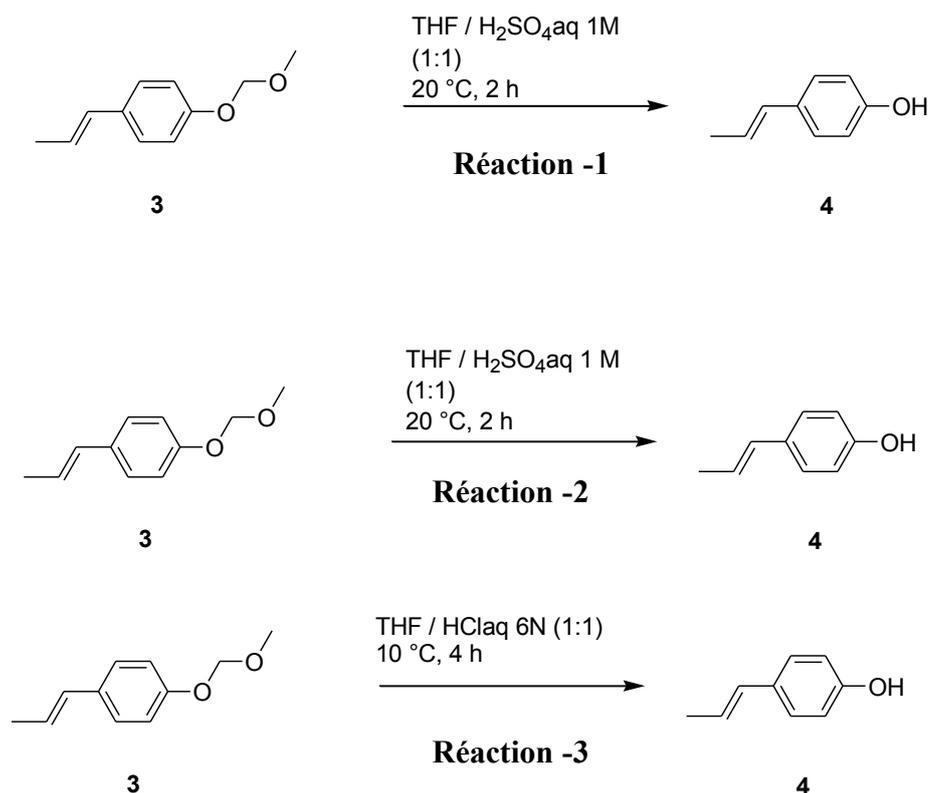


Schéma 12 : Schéma réactionnel de la déprotection du groupement méthymethoxy ether avec différent conditions opératoires

La première et la seconde réaction ont été réalisées avec le H₂SO₄, nous avons remarqué que la réaction d'hydrolyse n'a pas marché avec le H₂SO₄. Sur le spectre RMN nous avons observé les pics du groupement du MOM, ce qui explique que la réaction n'a pas marché. D'après des recherches bibliographiques, nous avons trouvé que la déprotection du groupement MOM se fait pratiquement avec HCl. Nous avons réalisé cette réaction avec HCl et nous avons effectivement obtenu le produit souhaité.

La déprotection du groupement méthoxyméthyle éther commence par un équilibre acido-basique via la protonation de l'oxygène suivie de l'attaque nucleophile de l'eau conduisant à la libération du produit souhaité **4**. Le mécanisme réactionnel est décrit dans le **Schéma 13** ci-dessous :

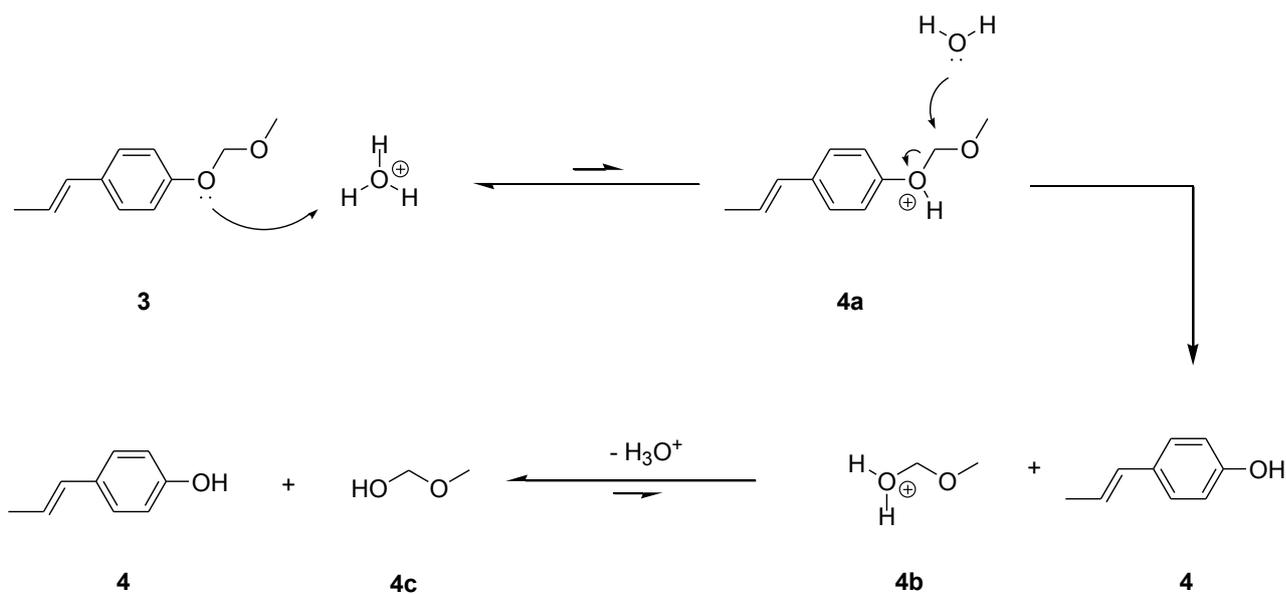


Schéma 13 : Mécanisme de déprotection du groupement méthoxyméthyle éther

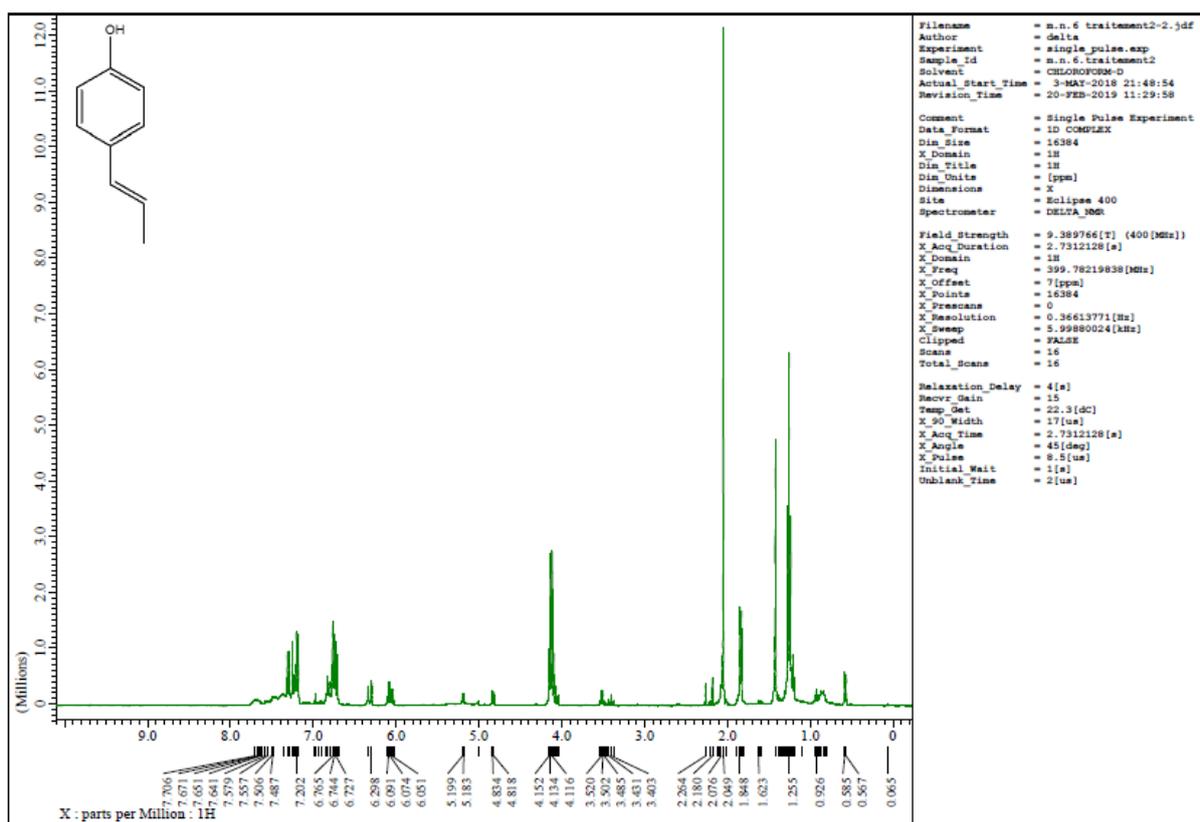


Figure 45 : Spectre RMN 1H de produit 4 déprotection

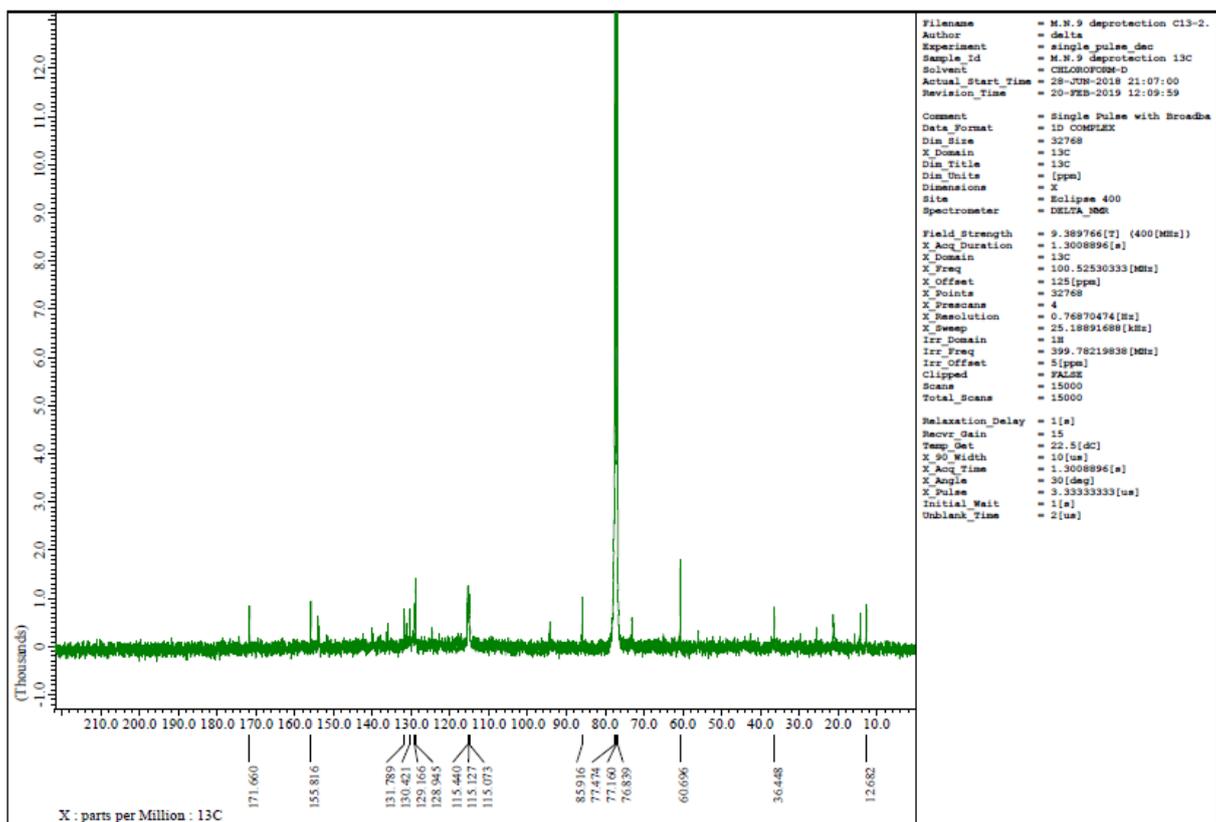


Figure 46 : Spectre RMN 13C de produit 4 déprotection

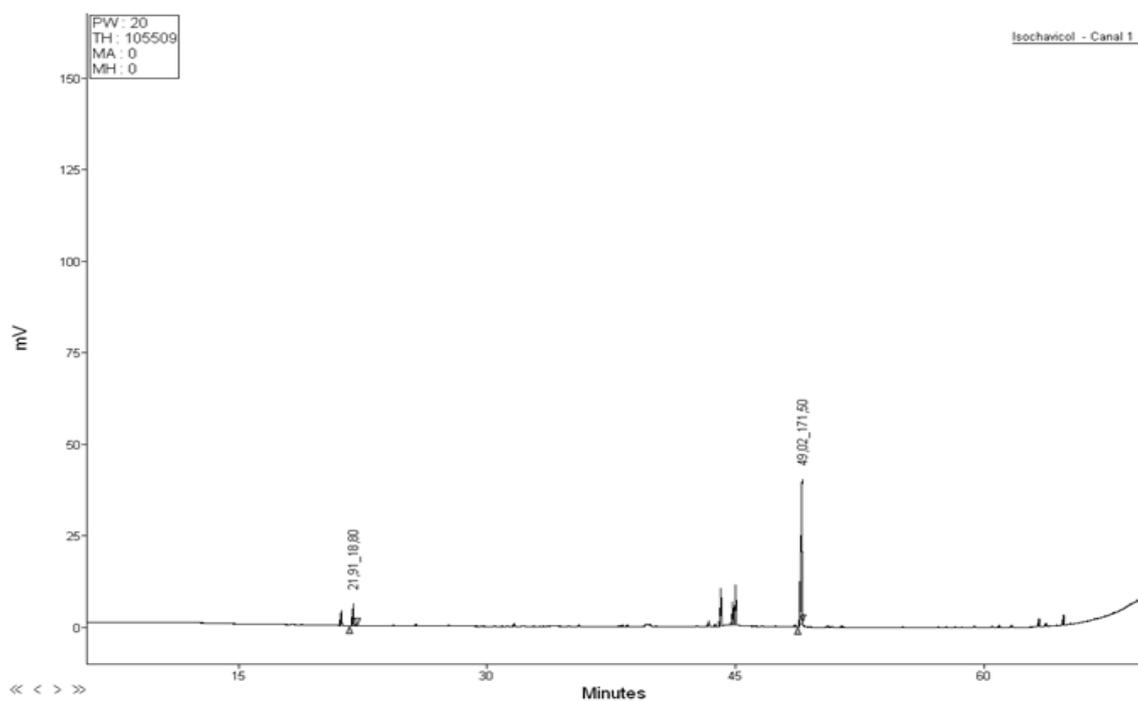
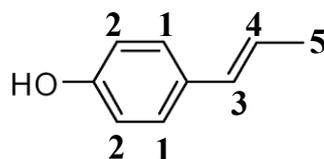
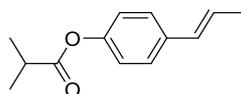


Figure 47 : Chromatogramme de l'isochavicol

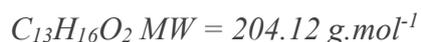
Le produit pur **4** a été obtenu sous forme d'huile chamois (19 mg, 75% yield)^{7,8} ; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H : **(1)** 7.34 (dd, 2 H, ArH), **(2)** 7.01 (dd, 2 H, ArH), **(3)** 6.38 (dd, 1 H, C=CH), **(4)** 6.18 (dq, 1 H, HC=C), **(5)** 1.89 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR (62.9 MHz, CDCl₃) δ_C : 164.0, 162.7, 160.6, 157.4, 151.2, 148.8, 136.2, 135.6, 133.3 (×2), 127.7, 124.3 (×2), 118.5, 112.3, 106.3. HR-MS (ESI, m/z) [M+H]⁺ : calcd. for [C₁₆H₉BrN₂O₅Na]⁺, 410.9587, found 410.9589. LC-MS : Tr = 3 min. GC-FID : Tr = 49,02 min. CCM : Rf (cyclohexane/AcOEt 90:10) = 0.24



4.4. Réaction d'estérification :



(E)-4-(prop-1-en-1-yl)phenyl isobutyrate (5)



La dernière étape de la suite réactionnelle pour la formation de l'Isochavicol isobutyrate **5** est une estérification du phénol **4**. La réaction a lieu dans le THF anhydre en présence d'un excès de chlorure d'isobutyryle, de la base forte DIPEA, et d'une quantité catalytique de DMAP. Le **Schéma 14** ci-dessous décrit les conditions réactionnelles.

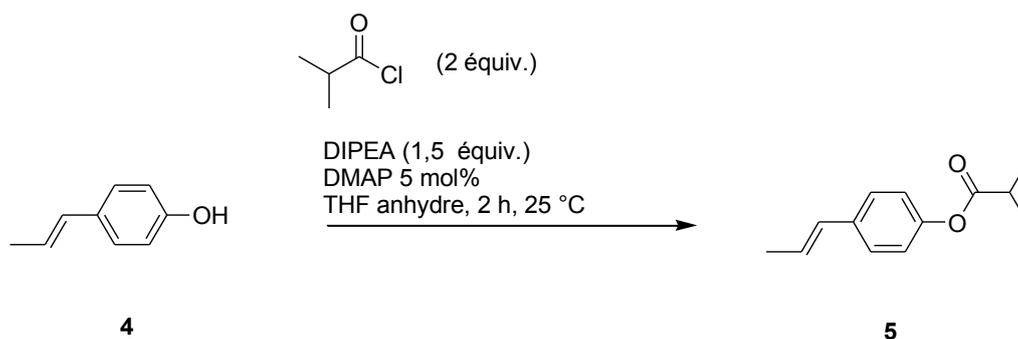


Schéma 14 : Schéma réactionnel de l'estérification de l'isochavicol

La réaction d'estérification se fait avec un rendement très faible de **2 %**. Le rendement faible de cette étape d'estérification est dû à la purification délicate sur chromatographie éclairée en phase inverse C18 (flash chromatography). La pureté du produit, évalué par GC-FID, est supérieure à **98%**.

Dans le mécanisme de formation du produit, la base forte **2** (DIPEA) déprotone d'abord le phénol **4** pour former l'intermédiaire **5b**. En parallèle, le DMAP **3** réagit par attaque nucléophile sur le carbone électrophile du chlorure d'isobutyryle **6** pour former l'intermédiaire tétraédrique **5c** qui conduit ensuite à l'intermédiaire activé **5d** par élimination de l'ion chlorure. Enfin, le nucléophile **5b** réagit sur l'intermédiaire activé **5d** par addition-élimination pour former l'isochavicol isobutyrate **5** souhaité. Le DMAP **3** ajouté en quantité catalytique, et nécessaire à l'optimisation de la cinétique de la réaction *via* l'activation du chlorure d'isobutyryle, est régénéré à la fin de la réaction. Le mécanisme est détaillé dans le **Schéma 15** ci-dessous :

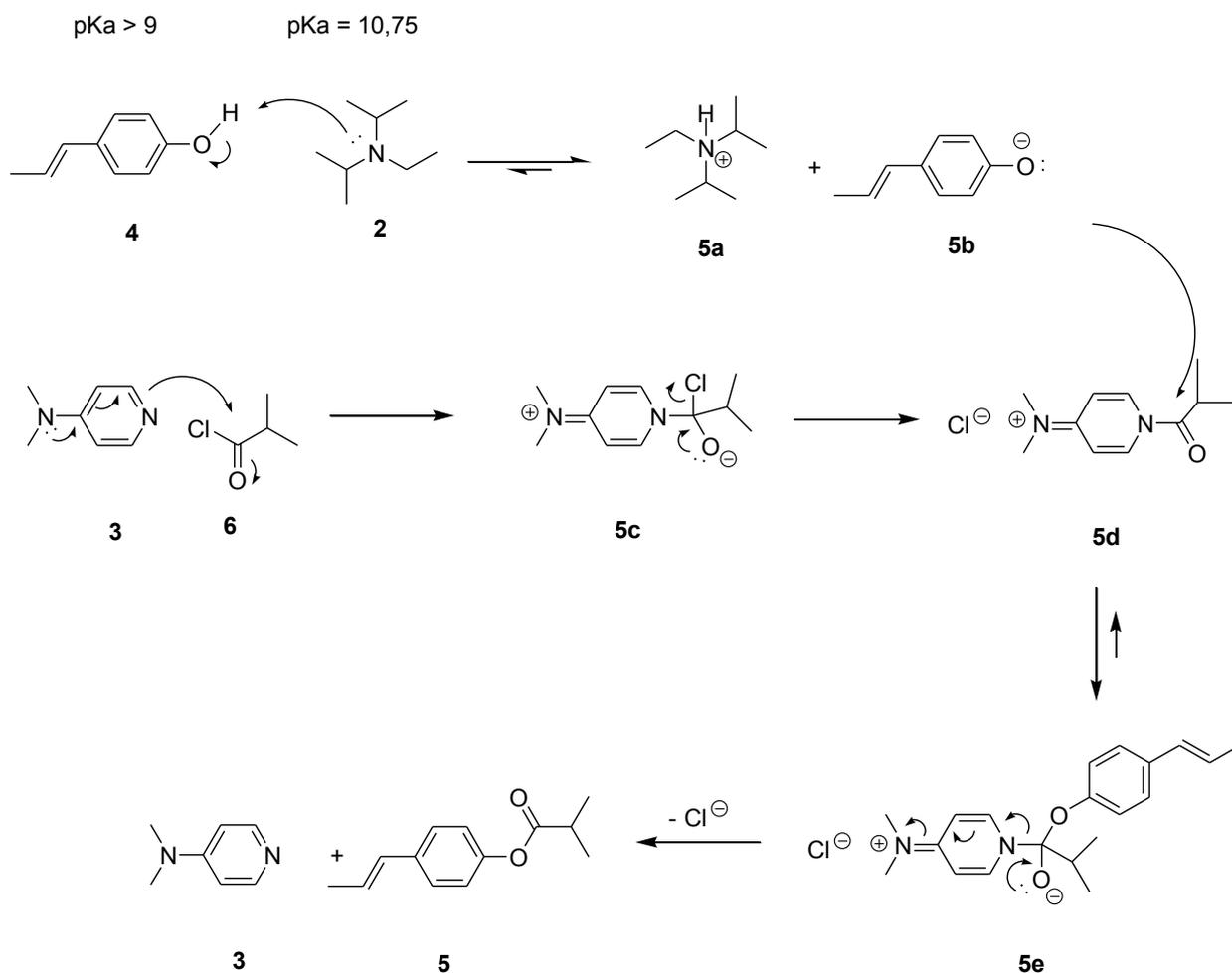


Schéma 15 : Mécanisme réactionnel de formation de l’Isochavicol 2-methylbutyrate

Nous avons fait trois purification à l’aide de la flash chromatographie en phase inverse en utilisant (acétonitril + 0,1 % acide fourmique) / (eau milli-Q + 0,1 % acide fourmique) comme éluant. Le programme d’élution est le meme utilisé en LC-MS.

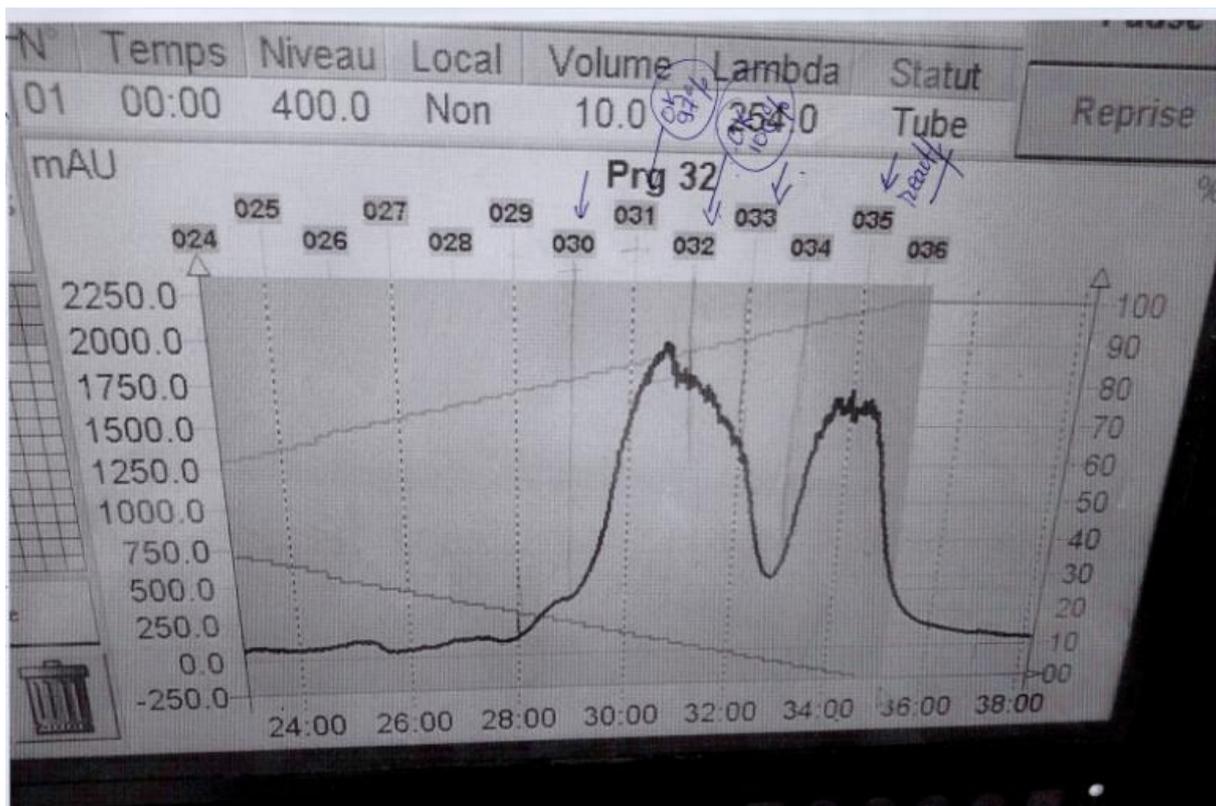


Figure 48 : Chromatogramme de la flash chromatographie

D'après la courbe obtenue les analyses RMN et LC-MS , nous avons obtenu le produit dans les tubes 31, 32. Le tube 35 contient le réactif. Ensuite nous avons entamé une deuxième séparation du produit. En ce qui concerne la deuxième courbe, nous avons prolongé la pente et le temps pour une meilleur séparation. Nous avons obtenu le produit dans les tubes 47-48-49 et d'après les analyse RMN 47 et 48 sont purs. Ensuite nous avons procédé à la troisième purification où le produit est sorti dans les tubes 47-48-49. Les résultats on été confirmé par RMN, LC-MS, CPG-FID. Nous avons rassemblé les fractions où il y avait le produit pur.

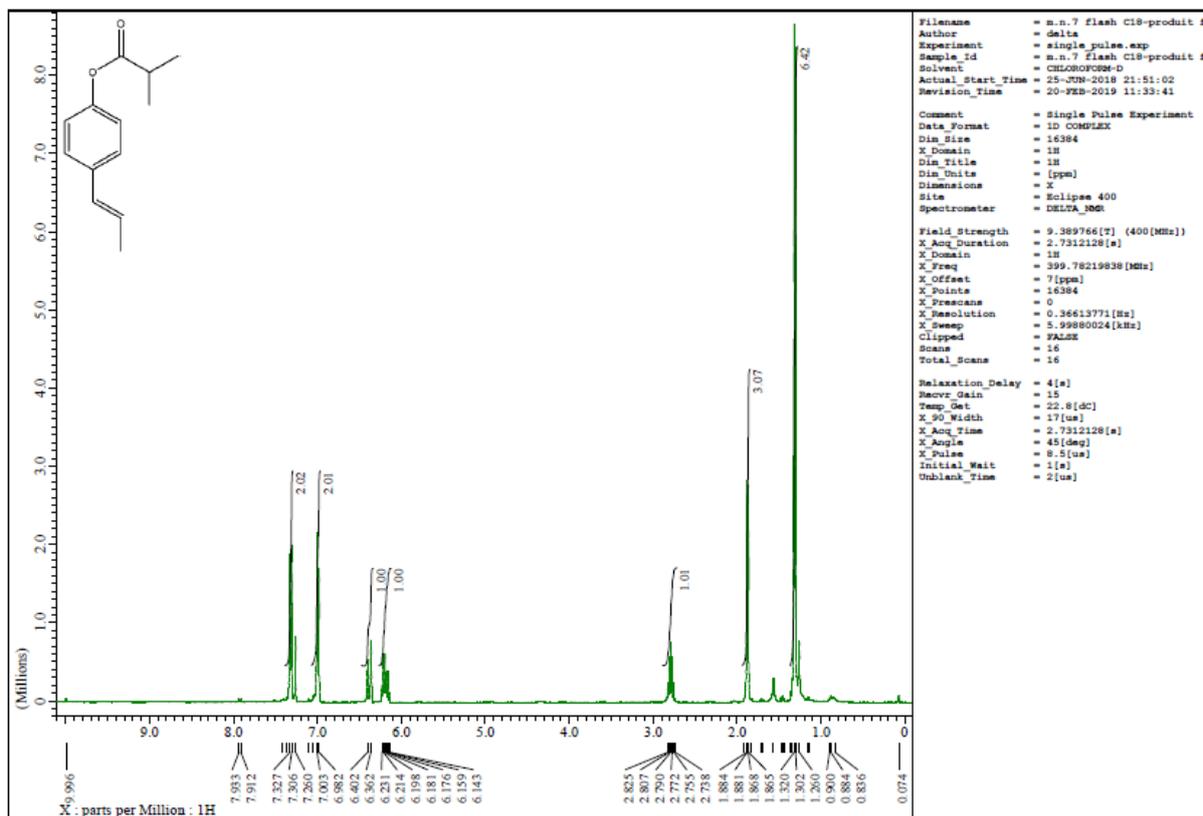


Figure 49 : Spectre RMN 1H du produit final

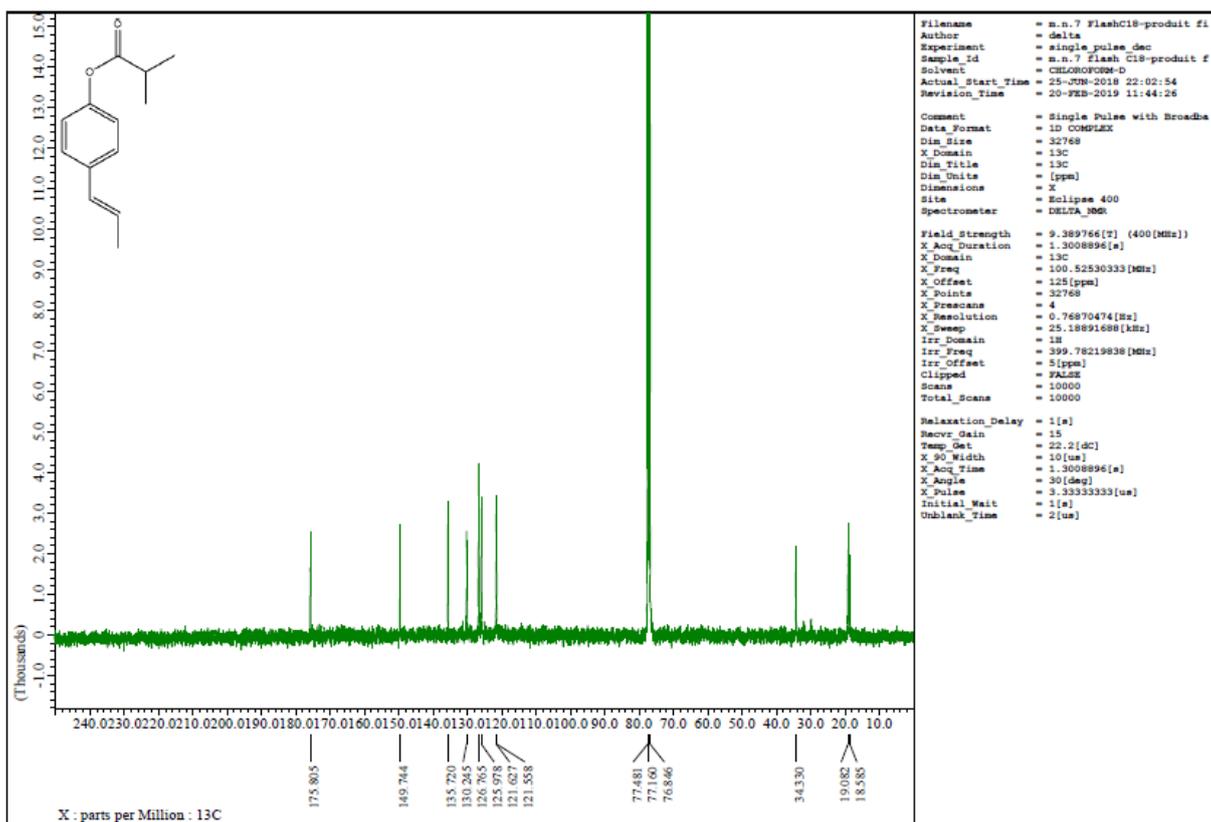
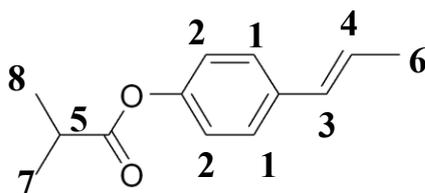


Figure 50: Spectre RMN 13C de produit final

Le produit pur **5** a été obtenu sous forme d'huile de *banane mania* (11 mg, 2 % yield)^{9,10} ; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H : (**1**) 7.34 (dd, 2 H, $J = 36, J = 2$, ArH), (**2**) 7.01 (dd, 2 H, $J = 28, J = 2$, ArH), (**3**) 6.38 (dd, 1 H, C=CH), (**4**) 6.18 (dq, 1 H, HC=C), (**5**) 2.78 (q, 1 H, CH), (**6**) 1.89 (dd, 3 H, CH₃), (**7**) 1.3 (d, 6 H, CH₃), (**8**) 1.29 (d, 6 H, CH₃). ¹³C NMR (100.5 MHz, CDCl₃) δ_C : 176, 150, 135 (x2), 130, 127 (x2), 126, 122 (x2), 32, 19, 18. LC-MS Tr : 22,32 min, GC Tr : 33.62 min, CCM : R_f(cyclohexane/AcOEt 90:10) = 0.76



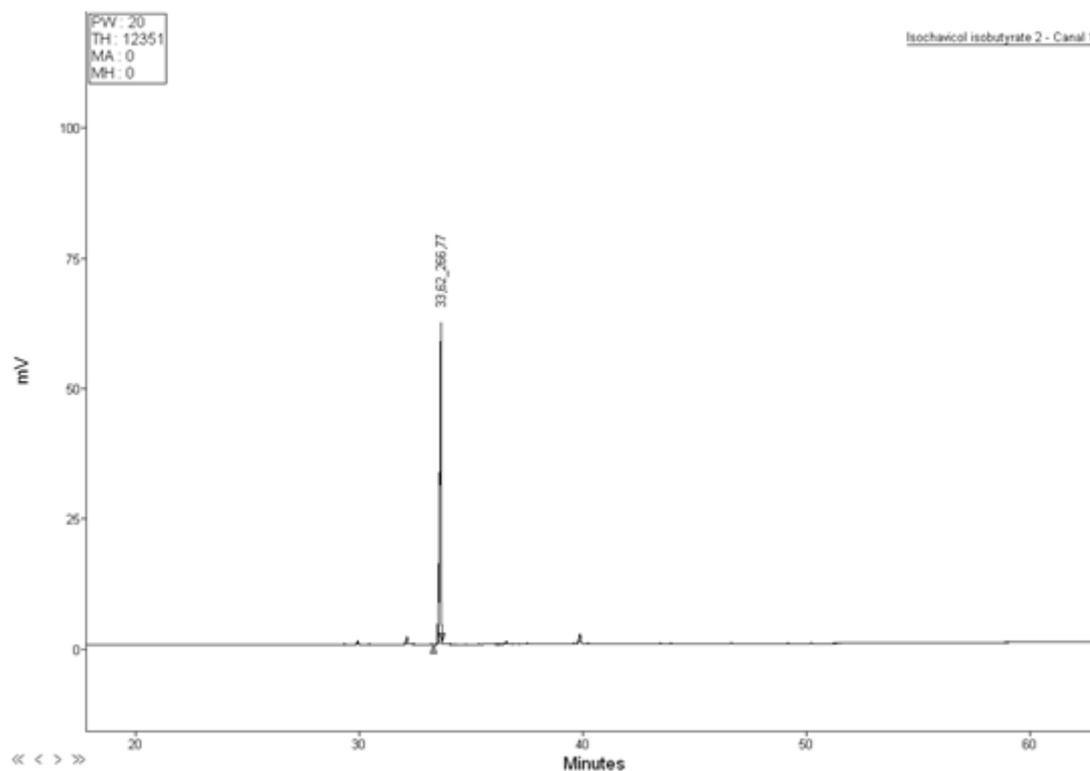


Figure 51 : Chromatogramme de composé synthétisé isochavicol isobutyrate

D-La densité des huiles essentielles :

Tableau 4 : Les valeurs de la densité des quatre huiles essentielle

Densité g/cm ₃	Les huiles essentielles			
	<i>E. triquetrum</i>	<i>S. olusatrum</i>	<i>D. crinitus. PA</i>	<i>D. crinitus. PR</i>
	0.963	0.955	0.855	0.831

A température ambiante, les huiles essentielles sont liquides, rarement visqueuses. Elles sont volatiles, ce qui explique leur caractère odorant et permet leur entraînement à la vapeur d'eau. Elles sont presque toujours plus légères que l'eau (densité < 1), ce qui montre les densités de nos huiles essentielles. Ainsi, elles sont non miscibles à l'eau, ce qui permet leur séparation aisée dans l'essencier de manière totalement naturelle et spontanée. Les huiles essentielles sont aussi actives sur la lumière polarisée et ont souvent un indice de réfraction élevé.

PARTIE C

ETUDE BIOLOGIQUE

Pour une vision du végétal aussi étendue que possible, nous rapportons, dans cette partie, les travaux réalisés sur la mise en évidence des activités biologiques des huiles essentielles des trois plantes étudiées et les composés majoritaires. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec plusieurs laboratoires de recherche. Les activités antibactériennes ont été réalisées en collaboration avec les collègues microbiologistes du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAAMABE) de l'Université de Tlemcen, les activités de bio-control ont été réalisées en collaboration avec le Centre de Recherche Insulaires et Observation de l'Environnement (CRIOBE) de l'université de Perpignan, France. Les activités molluscicides ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire d'Interaction Hôte-Pathogènes-Environnements (IHPE) de l'université de Perpignan, France. Enfin, les activités insecticides ont été réalisées en collaboration avec l'Institut des Sciences Agricole et le Conseil Supérieur des Recherches Scientifiques (ICA-CSIC) de Madrid, Espagne.

1-L'activité antioxydante :

1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

L'activité antioxydante de l'HE évaluée par le test DPPH est exprimée en IC₅₀. L'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé ou d'un échantillon, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité antioxydante est grande. Nous avons utilisés pour ce test l'acide ascorbique entant que control positif. Les résultats ont été présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Activités anti-radicalaires des huiles essentielles étudiées sur DPPH.

Echantillons	<i>E.triquetrum</i>	<i>S. olusatrum</i>	<i>D. crinitus</i>	Acide ascorbique
IC ₅₀ (µg/ml)	32	153	163	29.3

Les résultats de l'activité anti-radicalaire sur DPPH ont montré que l'huile essentielle d'*E. triquetrum* possède l'activité antioxydante la plus intéressante avec une IC₅₀ de 32 µg/ml très proche de celle de l'acide ascorbique (IC₅₀ de 29.3 µg/ml), cette activité est liée à la présence du falcarinol en forte proportion (90%). Par contre les deux autres huiles ont montré une très faible activité antioxydante. La faible activité antioxydante observée pourrait être due à une capacité réduite des composés terpéniques à donner un atome d'hydrogène comme décrit précédemment par Mata et coll [39]. En effet, les deux huiles contenaient des concentrations élevées d'hydrocarbures sesquiterpéniques et de sesquiterpènes oxygénés et ceci pourrait être responsable de la faible réactivité au DPPH observée.

1.2. Réduction du fer : FRAP (Pouvoir antioxydant réducteur ferrique)

Le test de la réduction du fer FRAP : L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et

dans les extraits organiques et aqueux. La présence des réducteurs dans les huiles essentielles provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm. En d'autre terme, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox. Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose dépendante (concentration dépendante). A la concentration de $5\mu\text{g/ml}$, le pouvoir réducteur de l'huile essentielle d'*E. triquetrum* est largement supérieur ($\text{DO}=0,742$) par rapport aux autres huiles essentielles mais nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique

2-L'activité antibactérienne :

Les activités des huiles essentielles ont été testées sur 8 souches : cinq bactéries Gram + (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778), trois bactéries Gram – (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603), représentant un panel varié de micro-organismes impliqués dans des infections nosocomiales et alimentaires. L'activité a été réalisée par deux méthodes ; la méthode de diffusion sur gel et les concentrations minimales d'inhibition obtenues par dilution en milieu gélosé, de chaque matrice sur chaque micro-organisme. (Tableau 6 et 7)

Méthode par les disques : (zones d'inhibitions en mm)

Tableau 6 : Résultats l'activité microbienne des huiles essentielles par la méthode de disque

		Huiles essentielles				ABT
		Er	SO	SO'	DC.PR	GENT
Souches bactériennes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18	6	6	6	10
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	17	6	6	6	20
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	14	6	6	6	19
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13	6	6	6	21
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	17	10	6	15	20
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	15	18	6	24	20
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	22	20	17	30	21
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	06	6	6	6	18

Er : l'huile d'*Eryngium triquetrum*, **SO** : l'huile de *Smyrniolum olusatrum*, **SO'** : l'huile de *Smyrniolum olusatrum* oxydée **DC.PR** : l'huile de *Daucus crinitus* (partie racine), **ABT** : antibiotique,

Gent : gentamicine (15µg)

Méthode par les CMI : (Concentrations Minimales Inhibitrices des HE et Gentamicine en µg/ml)

Tableau 7 : Résultats de l'activité microbienne des huiles essentielles par la méthode des CMI

		Huiles essentielles				ABT
		Er	SO	SO'	DC.PR	GENT
Souches bactériennes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	250	-	-	-	4
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	250	-	-	-	4
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	125	-	-	-	4
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	125	2000	-	250	2
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	125	125	-	62.5	4
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	125	125	125	62.5	2
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	250	-	-	-	4

L'huile essentielle d'*E. triquetrum* manifeste une activité forte contre *Pseudomonas aeruginosa* avec une inhibition de 18 mm et une bonne activité à moyenne contre la plupart des micro-organismes testés ; *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, avec des inhibitions de 17, 17, 14, 13, 15 mm respectivement. Cette activité peut être attribuée à la présence du falcarinol car la littérature indique que ce composé possède une activité antibactérienne intéressante.

Les trois huiles essentielles d'*E. triquetrum*, *S. olusatrum* et *D. crinitus* ont montré une très bonne activité contre *Staphylococcus aureus* par contre elles ont montré une très faible activité contre *Bacillus cereus*. Cependant l'huile essentielle de *D. crinitus* manifeste l'activité la plus intéressante contre *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* et une activité modérée contre *Listeria monocytogenes* et une activité faible contre les autres souches. Tandis que l'huile de *S. olusatrum* a présenté une bonne activité contre *Enterococcus faecalis* et une

activité modérée contre *Listeria monocytogenes* et une activité très faible contre les autres souches ce qui a été confirmé par la littérature.

L'huile de *S. olusatrum* oxydée a montré de faible activité contre la majorité des souches en comparant avec l'huile normale, malgré que la composition chimique est la même mais les proportions des composés dans l'huile oxydée est moins importantes que dans l'huile normal, ce qui a baissé le pouvoir antibactérien de l'huile.

Les résultats obtenus par la méthode des CMI montrent que parmi les 8 microorganismes testés, seuls deux souches gram + : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été fortement sensibles aux trois huiles essentielles de *E. triquetrum*, *S. olusatrum* plus particulièrement le *D. crinitus* (125, 125, 62.5 µg/ml respectivement)

D'après les résultats nous avons remarqué que les trois huiles *E. triquetrum*, *S. olusatrum* et *D. crinitus* possèdent un pouvoir antibactérien contre la majorité des microorganismes grace à la composition de ces huiles en composé bio-actifs et par conséquent ces huiles peuvent être considérer comme des agents antibactériens naturels et ils peuvent remplacer les antibiotiques de synthèse.

3- L'activité herbicide :

Actuellement le phénomène de la résistance de plus en plus fréquent chez les pesticides conventionnels et dans un contexte réglementaire pour une utilisation des pesticides plus en phase avec le développement durable, les huiles essentielles et les extraits naturels de plantes peuvent représenter des candidats idéaux dans la recherche de nouveaux produits de bio contrôle. Nous avons procédé à la valorisation des activités ayant relation avec le bio contrôle au sein de laboratoire CRIOBE. Nous avons rencontré un problème de solubilité des extraits avec le DMSO sauf l'extrait *E. triquetrum* dichlorométhane, l'extrait cyclohexanique d'*E. triquetrum* et *D. crinitus* obtenus par les ultrasons qui ont été soluble.

3.1. Test anti-germinatif :

Le test anti-germinatif est un test herbicide préliminaire réalisé *in vitro* permettant de valoriser l'effet inhibiteur de nos échantillons sur la germination et la croissance des racines et des tiges sur un modèle de grains de Cresson (*Lepidium sativum*) pendant une semaine. Le témoin positif utilisé dans ce test est l'oxadiazon un herbicide chimique. (Les résultats sont présentés dans les tableaux 8 et 9).



Figure 52 : Test anti-germinatif des huiles essentielles

Les trois huiles essentielles *D. crinitus* (partie racine), *E. triquetrum* et *S. olusatrum* ont présenté une inhibition moyenne à faible sur le taux de germination des graines de Cresson (*Lepidium sativum*) et sur la croissance des tiges et racines à une concentration de 1 mg/ml, par contre à 0.1 mg/ml les huiles essentielles ont montré des faibles inhibitions en comparant avec le témoin positif oxadiazon. Tandis qu'à 0.01 mg/ml les trois huiles essentielles n'ont montré aucune inhibition. Le falcarinol et le furanoérmophilone ont montré une activité anti-germinative faible similaire aux huiles essentielles.

Tableau 8: Résultats de test anti-germinatif des huiles essentielles *D. crinitus* (partie aérienne et partie racine), *E. triquetrum*, *S. olusatrum* et le composé majoritaire Dodécyle acétate après 8 jours

Les huiles essentielles /composés majoritaires																	
		DC.P.A			DC.P.R			Dodécyle acétate			Er			Falcarinol			
		concentrati on	Taux	Tiges	Racine s	Taux	Tiges	Racine s	Taux	Tige s	Racine s	Taux	Tiges	Racine s	Taux	Tiges	Racines
Inhibition %	1 mg/ml	-	-	-	32	24	20	4	0	0	23	45	45	-	-	-	
	0.1 mg/ml	0	0	0	0	3	6	0	0	0	3	12	0	5	15	10	
	0.01 mg/ml	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-	

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, **DC.P.R :** *Daucus cinitus* partie racine, **Er :** *Eryngium triquetrum*, **SO :** *Smyrniium olusatrum*

Les huiles essentielles /composés majoritaires								
		SO			Furanoérmophilone			
		concentration	Taux	Tiges	Racines	Taux	Tiges	Racines
Inhibition %	1 mg/ml	23	32	29	-	-	-	
	0.1 mg/ml	0	18	11	0	10	5	
	0.01 mg/ml	0	0	0	-	-	-	

Tableau 9 : Résultats de test anti-germinatif des hydrolats des trois espèces et l'extrait de dichlorométhane d'*E. triquetrum* et le témoin positif après 8 jour.

Les hydrolats / Extrait / Témoin positif

Inhibition %	DC.P.A			DC.P.R			Er			Concentration	Er DCM			Oxadiazon		
	Taux	Tiges	Racines	Taux	Tiges	Racines	Taux	Tiges	Racines		Taux	Tiges	Racine	Taux	Tiges	Racines
	0	0	0	7	44	58	59	15	46	1 mg /ml	45	47	31	-	-	-
										0.33 mg/ml	27	27	20	-	-	-
										0.01 mg /ml	-	-	-	41	25	10

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, **DC.P.R** : *Daucus cinitus* partie racine, **Er** : *Eryngium triquetrum*, **SO** : *Smyrniium olusatrum*, **Er DCM** : extrait dichlorométhane d'*Eryngium triquetrum*

L'huile essentielle de *D. crinitus* (partie aérienne) et le Dodécyle acétate qui est le composé majoritaire de *D. crinitus* (partie racine) n'ont présenté aucune inhibition avec les trois concentrations. Nous pouvons dire que la molécule pure n'a aucune activité en comparant avec l'huile essentielle et nous pouvons attribuer l'activité de l'huile soit aux autres composés soit à la synergie entre les composés de l'huile essentielle.

Les hydrolats de *D. crinitus* (partie racine) et *E. triquetrum* ont montré des bonnes inhibitions plus intéressantes que les huiles essentielles mais l'hydrolat de *D. crinitus* (partie aérienne) n'a montré aucune inhibition. L'extrait dichlorométhane d'*E. triquetrum* a montré des inhibitions moyennes à faibles sur le taux de germination et la croissance des tiges et racines à des concentrations de 1 mg/ml et à 0.33 mg/ml.

D'après les résultats ; les quatre huiles essentielles n'ont pas montré un pouvoir anti-germinatif intéressant. Par contre l'hydrolat d'*Eryngium triquetrum* a une inhibition intéressante sur le taux de germination et la croissance des racines et l'hydrolat de *Daucus crinitus* partie racine a montré des inhibitions intéressantes sur la croissance des racines.

3.2. Test thylakoïdes :

Le test des thylakoïdes est un test bio-herbicide qui consiste à valoriser l'effet inhibiteur de nos échantillons sur la photosynthèse. Nous avons utilisé un contrôle positif Atrazine; une molécule chimique la plus utilisée comme herbicide dans l'agriculture en Europe ayant un effet inhibiteur sur le système de photosynthèse, mais il a des effets néfastes sur la santé de l'homme qui se présente dans certains cancers ainsi que la toxicité de l'environnement. Les résultats sont présentés dans les tableaux 10 et 11.

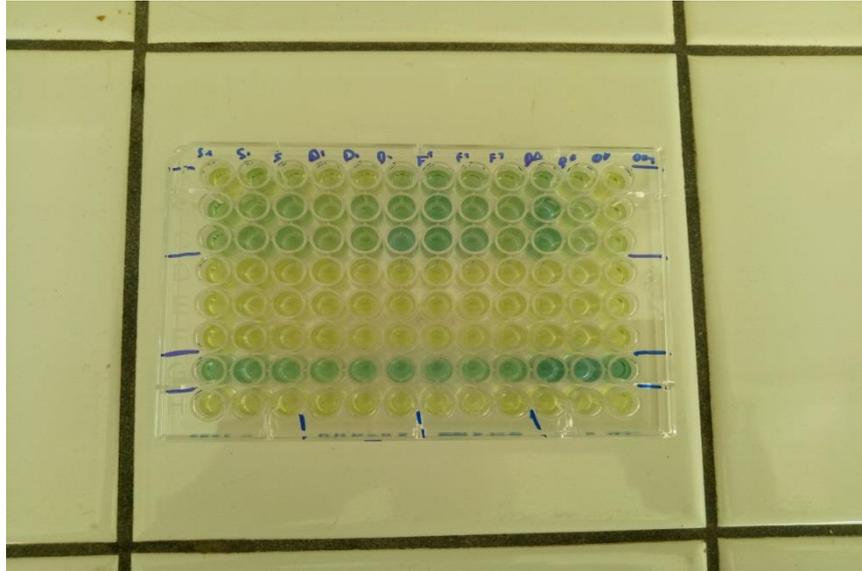


Figure 53 : Test des thylakoïdes des huiles essentielles

Les trois huiles essentielles *D. crinitus* (partie racine), *E. triquetrum* et *S. olusatrum* ont montré de forte inhibition à des concentrations de 0.5, 0.25, 0.1 mg/ml et de moyenne inhibition à 0.01 mg/ml sauf l'huile essentielle de *S. olusatrum* qui a présenté une intéressante inhibition de 74% à 0.01 mg/ml en comparant avec le témoin positive qui a une inhibition de 48% à 0.01 mg/ml alors que les trois autres huiles *D. crinitus* (partie aérienne), *D. crinitus* (partie racine), *E. triquetrum* ont montré une activité modérée de 42%, 62%, 44% respectivement. Tandis que les composés majoritaires le dodécyle acétate et le Furanoérmophilone et le falcarinol ont présenté des inhibitions faibles à modérée par rapport à leurs huiles essentielles (17% et 25% 51% à 0.01 mg/ml respectivement). Ces composés majoritaires sont moins actifs sur l'inhibition de la photosynthèse que les huiles essentielles sauf le falcarinol qui possède une activité similaire à l'huile essentielle car cette dernière possède 93% de falcarinol. L'activité peut être attribuer à la présence du falcarinol en forte proportion.

Tableau 10 : Résultats de test thylakoïdes des huiles essentielles *D. crinitus* (partie racine et partie aérienne), *S. olusatrum*, *E. triquetrum* et les composés majoritaires Dodécyle acétate, Furanoérmophilone et le témoin positive atrazine

Les huiles essentielles / Composés majoritaires / Témoin positif									
	Concentration	DC.PA	DC.PR	Dodécyle acétate	Er	Falcarinol	SO	Furanoérmophilone	Atrazine 0.01 mg/ml
Inhibition %	0.5	-	87	-	100		100	-	48
	0.25	-	83	-	74	100	100	-	
	0.1	57	70	25	66	70	85	35	
	0.05	50	64	18	53	67	75	27	
	0.01	42	62	17	44	51	74	25	

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, DC.P.R : *Daucus cinitus* partie racine, Er : *Eryngium triquetrum*, SO : *Smyrniium olusatrum*

Tableau 11 : Résultats de test thylakoïdes des fractions d'huiles de *D. crinitus* (partie racine) et *S. olusatrum* et l'extrait dichlorométhane de *E. triquetrum*

Les fractions des huiles essentielles / extrait au solvant									
	Concentration	FDC1	FDC2	FDC3	FDC4	SOB1	SOB2	SOE	Extrait Er DCM
Inhibition %	0.5	-	-	-	-	-	-	-	24
	0.25	-	79	88	89	77	86	80	0
	0.1	56	77	82	80	74	85	79	-
	0.05	50	72	79	66	65	82	78	-
	0.01	49	71	72	64	62	59	66	-

FDC1, FDC2, FDC3, FDC4 : les fractions de *D. crinitus* partie racine ; SOB1, SOB2, SOE : les fractions de *S. olusatrum*

L'extrait dichlorométhane d'*Eryngium triquetrum* n'a montré aucune activité intéressante sur l'inhibition de la photosynthèse. Les fractions des huiles essentielles de *Daucus crinitus* partie racine et *Smyrniium olusatrum* ont manifesté des inhibitions très intéressantes que les molécules pures. Deux fractions de l'huile de *D. crinitus* sont plus actives que l'huile essentielle (FDC2 et FDC3), cette activité est due soit à l'un des composés présents dans ces fractions ou à la synergie entre les molécules. La fraction (FDC4) possède la même activité que l'huile donc, nous pouvons dire que le mélange de ces molécules confère à l'huile essentielle cette activité. La fraction (FDC1) est moins active que l'huile. Tandis que la fraction de *S. olusatrum* (SOE) possède presque la même activité que l'huile essentielle, cette activité peut être attribuée au furanodiène comme nous avons déjà testé le furanoérmophilone pur ou bien due à la synergie entre les composés de cette fraction. Les fractions (SOB1, SOB2) sont moins actives que l'huile essentielle, mais elles sont très actives que la molécule pure. Ces activités sont dues soit à l'un des composés soit à la synergie entre les molécules. En effet nous n'avons pas testé tous les composés qui sont présents dans les fractions nous ne pouvons pas déduire exactement l'origine de cette activité.

En conclusion, les huiles essentielles de *S. olusatrum*, *D. crinitus* partie racine, *E. triquetrum*, falcarinol et les fractions (FDC2, FDC3, SOB1, SOE) ont une activité inhibitrice de la photosynthèse intéressante. Ils peuvent être suggérés comme substitut de l'atrazine chimique dans la protection des cultures pour inhiber la photosynthèse des mauvaises herbes.

3.3. Essai de croissance sur les grains de Cresson (test d'allélopathique) :

Le test de croissance sur le modèle de cresson est un test in-vivo est similaire à la réalité et il montre l'inhibition des huiles essentielles sur le stade végétatif de développement de la plante. L'allélopathie est définie comme tout effet direct ou indirect, positif ou négatif, d'une plante sur une autre, par le biais de composés biochimiques libérés dans l'environnement. Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Les huiles essentielles d'*E. triquetrum*, *S. olusatrum*, faltarinol, furanoérmophilone ont montré d'intéressante inhibition après 7 jours de traitement (52%, 62%, 68%, 50% respectivement) et des inhibitions remarquables après 14 jours de traitement (70%, 80%, 88%, 67% respectivement) et nous avons remarqué qu'avec les quatre traitements il y a une inhibition de croissance des plantes. Par contre les huiles essentielles de *D. crinitus* partie racine et aérienne ainsi que le dodécyle acétate ont montré de faible inhibition après 7 jours de traitement et 14 jours de traitement ainsi absence d'inhibition de croissance.

D'après les résultats des trois tests (anti-germinatif, thylakoïde, essai de croissance) nous pouvons déduire que les huiles essentielles *S. olusatrum*, *E. triquetrum*, faltarinol et le furanoérmophilone peuvent être considérer comme des agents herbicides naturels qui pouvant remplacer les herbicides et les pesticides de synthèse dans la protection de l'agriculture



Figure 54 : Traitement des plantes avec l'huile de *D. crinitus* partie racine et aérienne

Tableau 12 : Résultats d'Essai de croissance sur les grains de *Cresson* des huiles essentielles et le dodécyle acétate

	Les huiles essentielles / composé majoritaire						
	DC.PA	DC.PR	Dodécyle acétate	ER	Falcarinol	SO	Furanoérmophilone
Inhibition % Après 7 jours	30	10	0	52	68	62	50
Inhibition % Après 14 jours	40	12	0	70	88	80	67
Remarques	Pas d'inhibition de croissance	Pas d'inhibition de croissance	Pas d'inhibition de croissance	Inhibition de croissance	Inhibition de croissance	Inhibition de croissance	Inhibition de croissance

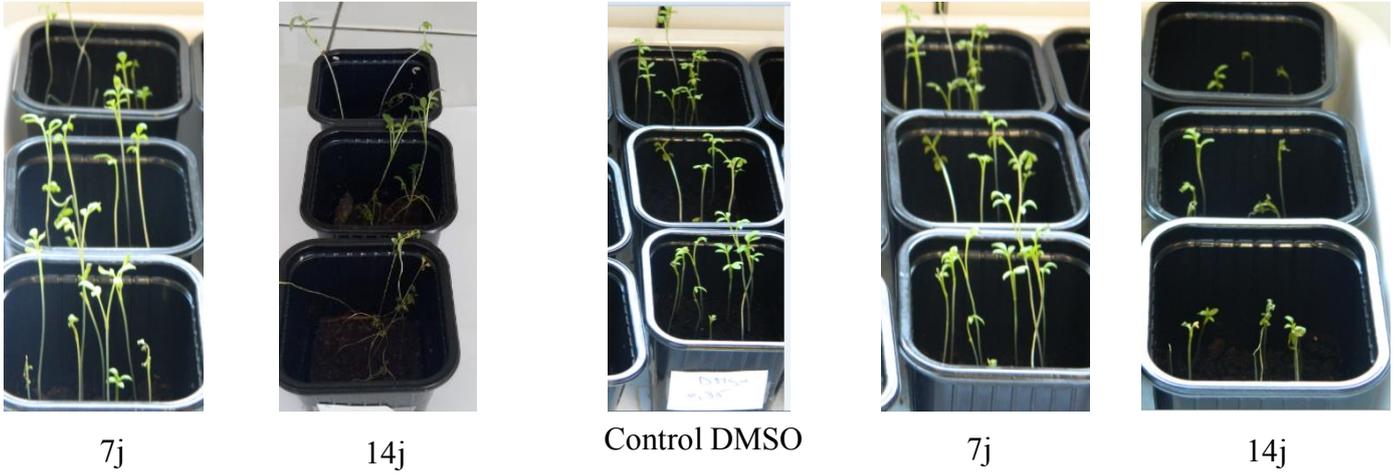
DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, **DC.P.R** : *Daucus cinitus* partie racine, **Er** : *Eryngium triquetrum*, **SO** : *Smyrniolum olusatrum*



Traitement avec *E. triquetrum* après 7j et 14j

Traitement avec *S. olusatrum* après 7j et 14j

Figure 55 : Traitement des plantes avec l'huile de *S. olusatrum* et *E. triquetrum* après 7 et 14 jour



Traitement avec falcarinol après 7 et 14 jours

Traitement avec furanoérmophilone après 7 et 14 jours

Figure 56 : Traitement des plantes avec le falcarinol et le furanoérmophilone après 7 et 14 jours

2. Test d'écotoxicologie sur larves d'Artémies (*Artemia salina*) :

Le test d'écotoxicologie permet d'évaluer la toxicité des huiles essentielles sur la faune aquatique. *A. salina* a un métabolisme des purines similaire à celui des cellules de mammifères. Les résultats sont présentés dans les tableaux 13 et 14.

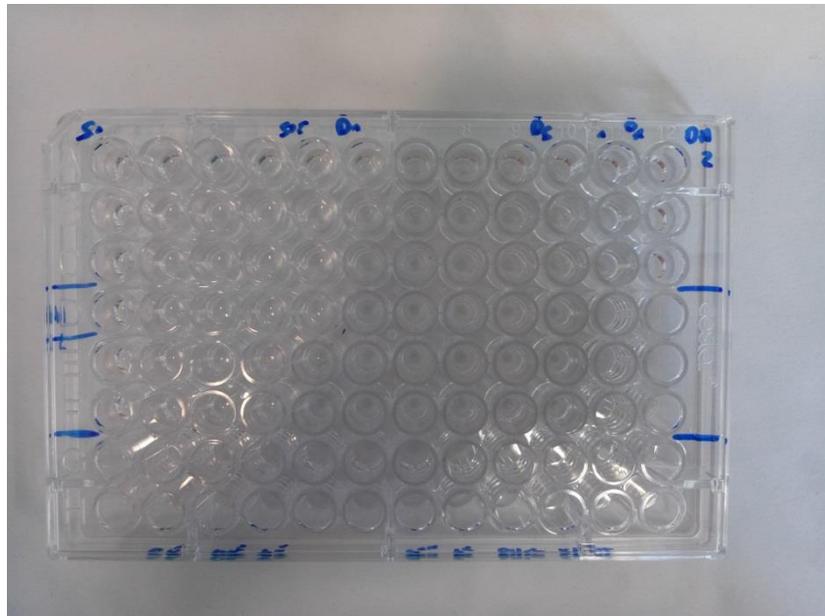


Figure 57: Test d'écotoxicologie des huiles essentielles

Les huiles essentielles d'*E. triquetrum* à différentes proportions de falcarinol ont montré des IC₅₀ très intéressantes et différentes, l'huile à 93% de falcarinol a une IC₅₀ de 0.7 µg/ml alors que l'huile à 44 % de falcarinol a une IC₅₀ de 2.1 µg/ml. Cet écart est dû à la différence de proportion du falcarinol dans les deux huiles essentielles, plus le falcarinol est en grande proportion dans l'huile plus IC₅₀ est intéressante. Le falcarinol pur a montré une IC₅₀ significative de 0.35 µg/ml.

Les huiles de *D. crinitus* partie racine est plus active que l'huile *D. crinitus* partie aérienne et plus active que son composé majoritaire dodécyle acétate avec des IC₅₀ de 28.7, 67, 58 µg/ml respectivement. Les trois fractions (FDC1, FDC2, FDC4) de *D. crinitus* sont moins actives que l'huile essentielle sauf FDC3 est plus active que l'huile et le composé majoritaire, cette activité est due soit à l'un des composés présent dans la fraction soit à la synergie entre ces molécules.

Le furanoérmophilone est plus actif que l'huile essentielle avec des IC₅₀ de 13.4, 62.5 µg/ml respectivement. Les fractions d'huile SOB2, SOE sont moins actives que l'huile et que le furanoérmophilone. Cependant la fraction SOB1 présente une activité similaire à l'huile mais moins active que le composé majoritaire. Par conséquent l'activité de *S. olusatrum* provient de la synergie entre les molécules qui sont présentes dans la fraction SOB1.

L'huile d'*E. triquetrum*, le falcarinol présentent une activité écotoxicologique très intéressante par rapport aux quatre huiles essentielles étudiées. Elle possède l'IC₅₀ la plus faible. Ces résultats peuvent être suggérés pour soutenir les stratégies de contrôle liées aux maladies environnements limniques

Tableau 13 : Résultats de test écotoxicologie sur les larves d'Artémie des huiles essentielles *D. crinitus* (partie racine et partie aérienne), *S. olusatrum*, *E. triquetrum* et les composés majoritaires dodécyle acétate et le furanoérmophilone

		Les huiles essentielles / composés majoritaires							
	Concentration mg/ml	DC.PA	DC.PR	Dodécyle acétate	ER 93%	Falcarinol	ER 44%	SO	Furanoérmophilone
Mortalité %	0.1	74	-	-	-	100	-	80	-
	0.05	37	97	43	100	100	100	40	100
	0.025	13	73	33	100	100	100	20	93
	0.0125	3	33	11	100	100	100	13	43
	0.005	7	7	10	100	100	100	10	17
	0.001	0	0	7	73	-	37	0	10
	0.0005	-	0	-	7	75	10	0	0
	0.00025	-	-	-	0	5	10	-	-
	0.000125	-	-	-	0	1	-	-	-
		IC₅₀ (µg/ml)	67	28.7	58	0.7	0.35	2.1	62.5

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, DC.P.R : *Daucus cinitus* partie racine, Er : *Eryngium triquetrum*, SO : *Smyrniium olusatrum*

Tableau 14 : Résultats de test écotoxicologie sur les larves d'Artémie des fractions d'huile essentielle de *D. crinitus* et *S. olusatrum*

		Les huiles essentielles / composés majoritaires						
	Concentration mg/ml	FDC1	FDC2	FDC3	FDC4	SOB1	SOB2	SOE
Mortalité %	0.1	74	-	-	-	-	-	-
	0.05	20	57	100	10	43	10	17
	0.025	13	7	100	7	3	7	7
	0.0125	7	7	53	7	3	3	3
	0.005	7	7	13	7	0	3	0
	0.001	7	7	10	0	0	3	0
		IC₅₀ (µg/ml)	125	43	12	357	58	250

FDC1, FDC2, FDC3, FDC4 : les fractions de *D. crinitus* partie racine, SOB1, SOB2, SO E : les fractions de *S. olusatrum*

5-L'activité antibactérienne contre les phytopathogènes :

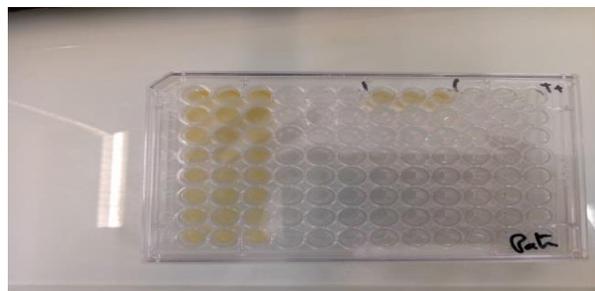
Les agents phytopathogènes sont des bioagresseurs des cultures qui infectent les végétaux et d'y déclencher des maladies en provoquant la pourriture molle et des lésions des tissus ligneux externe de la plante. Nous avons effectué le test contre deux souches bactériennes *pseudomonas cichorii* et *pectobactérium atrosepticum*. Les résultats sont présentés dans le tableau 15, 16, 17.



Feuilles infectées par PC



Jambe noir causée par Patre



Test antibactérien des huiles essentielles

Figure 58: Les maladies causées par les phytopathogènes

Tableau 15 : Résultat de test antibactériens des extraits *E. triquetrum* et *D. crinitus* partie racine par la méthode des ultrasons

Extraits / témoin positif							
		<i>Pectobactérium</i>			<i>Pseudomonas</i>		
Inhibition %	Concentrations mg/ml	DU	ERU	Chloramphénicol 10 µg/ml	DU	ERU	Chloramphénicol 10 µg/ml
		40	62	68		25	27
	20	60	56		21	22	
	10	59	56		15	21	
	5	56	53	91	13	17	100
	2.5	55	54		11	17	
	1.25	52	55		11	14	
	0.625	52	55		10	13	
	0.313	52	48		8	0	

DU : Extrait ultrason *Daucus crinitus* partie racine, ERU : Extrait ultrason *Eryngium triquetrum*

Les huiles d'*E. triquetrum*, *D. crinitus* partie aérienne ont montré une activité antiabctérienne très intéressante contre les phytopathogène *pectobactérium* et *pseudomonas* avec des inhibitions de (85, 100%) et (88, 100%) respectivement. Ainsi les deux souches ont été fortement sensibles au falcarinol (100, 100%). La fraction DER d'*E. triquetrum* a montré une forte activité antibactérienne contre *pectobactérium* forte que l'huile essentielle, alors qu'elle a montré une activité similaire a celle de l'huile contre *pseudomonas*, cette activité peut être attribué à la présence du falcarinol dans cette fraction en majorité, ce qui explique que cette molécule est responsable de l'activité antibactérienne. La fraction EER a manifesté une bonne activité contre *pectobacterium* et faible activité contre *pseudomonas*

Cependant l'huile de *S. olusatrum* a été moyennement sensible au deux souches. Les fractions de *S. olusatrum* étaient plus actives que l'huile contre *Pectobactérium*, cette activité est due à l'un des composés de ces fractions ou à la synergie entre les molécules.

Tableau 16 : Résultats de test antibactérien des huiles essentielles contre les phytopathogènes *pectobactérium* et *pseudomonas*

Les huiles essentielles											
	<i>Pectobacterium</i>						<i>Pseudomonas</i>				
	Concentration mg/ml	DC.PR	DC.PA	ER	Falcarinol	SO'	DC.PR	DC.PA	ER	Falcarinol	SO'
Inhibition %	40	25	100	85	100	2	33	100	88	100	25
	20	21	100	83	100	0	32	87	85	70	24
	10	8	78	23	60	0	27	60	36	52	23
	5	6	73	11	42	0	21	59	25	20	21
	2.5	5	50	8	10	0	20	18	20	10	20
	1.25	4	10	7	8	0	15	12	18	5	19
	0.625	0	9	1	5	0	13	9	15	0	18
	0.313	0	9	0	0	0	1	6	13	0	0

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, **DC.P.R :** *Daucus cinitus* partie racine, **Er :** *Eryngium triquetrum*, **SO :** *Smyrniium olusatru*, **SO' :** *Smyrniium olusatrum* oxydée

Les huiles essentielles					
	<i>Pectobacterium</i>			<i>Pseudomonas</i>	
	Concentration mg/ml	SO	Furanoér mophilone	SO	Furanoérm ophilone
Inhibition %	40	63	70	58	70
	20	18	65	57	50
	10	3	55	17	30
	5	0	35	10	10
	2.5	0	20	8	1
	1.25	0	8	5	0
	0.625	0	2	0	0
	0.313	0	0	0	0

Tableau 17 : Résultats de test anti-bactérien des fractions d'huiles essentielles de *E.triquetrum* et *S. olusatrum* contre les phytopathogène

		Les fractions d'huile essentielles									
		<i>Pectobacterium</i>					<i>Pseudomonas</i>				
	Concentration	SOB1	SOB2	SOE	DER	EER	SOB1	SOB2	SOE	DER	EER
Inhibition %	5%	78	88	100	100	77	46	70	52	87	16
	2.5	70	66	99	94	70	40	56	36	47	15
	1.25	64	61	91	94	67	13	22	33	31	15
	0.625	64	60	66	93	68	10	19	19	23	13
	0.313	63	57	65	92	65	9	17	18	22	12
	0.156	62	57	64	90	63	8	14	17	21	11
	0.078	60	54	63	88	62	1	7	14	20	10
	0.039	52	52	62	80	61	0	0	8	19	0

FDC1, FDC2, FDC3, FDC4 : les fractions de *D. crinitus* partie racine, **SOB1, SOB2,SO E** : les fractions de *S. olusatrum*, **DER , EER** : les fractions d'*Eryngium triquetrum*

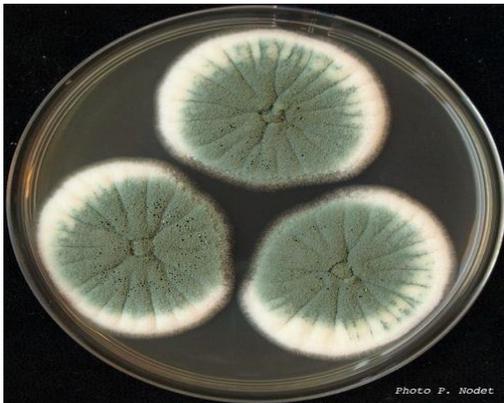
Alors que les deux fractions (SOB1, SOE) étaient moyennement active contre *pseudomonas*, la troisième fraction (SOB2) était plus active que l'huile essentielle, cette activité peut être attribuer à la présence du germacrène D qui est un antibactérien puissant. Le furanoérmophilone pur possède une bonne activité contre les deux souches et plus active que l'huile essentielle. L'huile de *S. olusatrum* oxydée a montré une faible activité contre les deux souches contrairement à l'huile normal ce qui nous confirme les résultats de test de l'activité antimicrobienne (tableau 5).

L'huile de *D. crinitus* partie racine a montré une activité faible contre les deux souches. Les extraits DU et ERU ont montré une bonne activité contre *pectobactérium* mais une faible activité contre *pseudomonas*.

Les huiles essentielles de *D. crinitus* partie aérienne, *E. triquetrum*, *S. olusatrum* *falcarinol*, *furanoérmophilone* ont montré un pouvoir antibactérien intéressant contre les phytopathogènes

6-L'activité antifongique :

Les champignons phytopathogènes sont des espèces de champignons parasites qui provoquent des maladies cryptogamiques chez les plantes. Les champignons phytopathogènes sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de la plante. Nous avons évalué l'activité antifongique contre quatre souches : *Botrytis cinerea* (F1): pourriture grise de nombreuses cultures (vignes, tomate, fraise...), *Penicillium expansum* (F2): pourriture fruits (pommes/poires), *Fusarium graminearum* (F3): fusariose des céréales, *Zymoseptoria tritici* (F5): septoriose du blé, avec deux méthodes différentes. Les résultats sont présentés dans les tableaux 18 et 19



F2



F3



Fraise infectée par F1



Test antifongique des huiles essentielles

Figure 59 : Test antifongique des huiles essentielles

Par la méthode de contact les huiles essentielles ont montré une faible activité contre les souches F1, F2, F5 sauf l'huile de *S. olusatrum* qui a montré une grande sensibilité à la souche F5 avec une inhibition de 83%. Cependant les quatre huiles essentielles ont montré une croissance de la souche F3 qui est un résultat intéressant aussi, c'est-à-dire les huiles peuvent contribuer à la culture de la souche F3 dans le laboratoire parce que constamment il y a un problème de culture des souches et c'est une solution idéale pour ce problème. Le dodécyle acétate a montré une faible inhibition contre les trois souches identique à l'huile essentielle. Le falcarinol a montré une activité moyenne contre F1 et des activités faible contre les autres souches. Le furanoérmophilone a montré une activité moyenne contre F1 et une activité faible contre F2 et F3 mais une bonne activité contre F5 similaire à l'huile essentielle.

Afin d'augmenter l'activité antifongique nous avons procédé à des mélanges d'huiles mais toutes les mélanges ont montré des faibles inhibitions, donc il y a un effet antagonisme, nous avons remarqué cet effet lorsque nous avons mélangé les huiles de *E. triquetrum* et *S. olusatrum*, nous avons eu une inhibition moins importante que l'huile de *S. olusatrum* seule avec la souche F2.

Par la méthode de fumigation les quatre huiles essentielles ont montré une activité antifongique faible sauf l'huile d'*E. triquetrum* et *S. olusatrum* ont une activité moyenne contre la souche F1.

L'huile de *S. olusatrum* et le furanoérmophilone ont présenté un pouvoir antifongique intéressant contre la souche F5 et qui peut être un antifongique naturel.

Tableau 18 : Résultats de tests antifongique des huiles essentielles de *D.crinirus* (parie racine et aérien), *S.olusatrum*, *E. triquetrum*, le dodécyle acétate et les mélanges des huiles essentielles par la méthode de contact après 72h d'incubation.

		Les huiles essentielles (142*10 ⁻³ µl/ml air)										Dodécyle acétate	
Inhibition %	Souches	DC.P R	DC.P A	ER	Falcarinol	SO	Furanoérm ophilone	Er+SO	Er+DC. P.R	SO+D C.P.R	DC.PR+D C.PA	1 mg/ml	0.5 mg/ml
		F1	4	-	5	45	22	42	-	-	-	-	0
	F2	29	3	27	30	39	30	35	15	19	12	21	31
	F3	0	23	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F5	0	0	0		83	70	0	0	0	0	-	-

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, DC.P.R : *Daucus cinitus* partie racine, Er : *Eryngium triquetrum*, SO : *Smyrnum olusatrum*

Tableau 19 : Résultats de tests antifongique des huiles essentielles de *D.crinirus* (parie racine et aérien), *S.olusatrum*, *E. triquetrum* par la méthode de fumigation après 72h d'incubation.

		Les huiles essentiellles (142*10 ⁻³ µl/ml air)				
Inhibition %	Souches	DC.PR	DC.PA	ER	SO	
		F1	11	-	43	48
	F2	16	15	8	4	
	F3	0	19	0	0	
	F5	0	0	0	0	

(F1)Botrytis cinerea: pourriture grise de nombreuses cultures, (F2)*Penicillium expansum*: pourriture, (F3)*Fusarium graminearum*: fusariose des céréales, (F5)*Zymoseptoria tritici* : septoriose du blé

7-Activité insecticide :

Les insectes, les tiques et les nématodes parasites des plantes sont les groupes d'agents pathogènes des plantes les plus destructeurs au monde et leur lutte est extrêmement difficile. Ils affectent une grande variété de cultures dans le monde. Il semble qu'aucun traitement spécifique ne puisse être utilisé pour une protection à long terme contre ces ravageurs. Parmi les stratégies actuelles de recherche d'alternatives pour réduire l'utilisation des insecticides conventionnels, la lutte écochimique basée sur la relation plante-insecte est l'une des méthodes les plus prometteuses. Les insecticides naturels à base d'huiles essentielles peuvent représenter une alternative pour la protection des cultures. Les résultats sont présentés dans le tableau 20, 21,22.



S. littoralis



M. persicae



Tique



R. padi

Figure 60 : Les insectes ravageurs des plantes

Les huiles essentielles d'*E. triquetrum* et de *D. citrinus* étaient de puissants anti-pucerons avec des valeurs d'IC₅₀ de 1,2-1,3 mg / ml pour *M. persicae* et de 2,9-1,9 mg / ml pour *R. padi* respectivement. L'huile essentielle de *S. olusatrum* était uniquement un antiappétant contre *R. padi* (IC₅₀ de 2,9 mg / ml). Ces huiles ont montré une activité antiappétant faible à

modérée contre *S. littoralis* avec des inhibitions de 48, 66, 61% à 10 mg / ml respectivement. Lorsqu'elles ont été testées contre la tique *H. lusitanicum*, L'huile d'*E. triquetrum* et *S. olusatrum* étaient très actives avec des valeurs de DL₅₀₋₉₀ de 0,03-0,05 et 0,06-0,09 mg / ml respectivement.

Les huiles essentielles de *D. citrinus* étaient un agent nématocide puissant (valeurs DL₅₀₋₉₀ de 0,014-0,053 mg / ml), suivies par l'huile essentielle d'*E. triquetrum* (valeurs DL₅₀₋₉₀ de 0,159-0,285 mg / ml) et l'huile essentielle de *S. olusatrum* (valeurs DL₅₀₋₉₀ de 0,611-0,950 mg / ml). L'activité de l'huile de *D. citrinus* a été expliquée de sa teneur en acétate de dodécyle qui a montré une activité nématocide intéressante. L'activité de l'huile essentielle ainsi que son composé majoritaire est presque la même. Donc l'activité de l'huile vient de l'activité de son composé majoritaire.(valeurs DL₅₀₋₉₀ de 0,114-0,366 mg / ml).

Le dodécyle acétate, également présent dans l'huile essentielle à des quantités élevé, était efficace contre la tique *H. lusitanicum* et pourrait être responsable de l'effet élevé de l'huile sur cette tique, expliquant ainsi les effets de l'huile essentielle contre cet insecte.

Le furanoérmophilone a manifesté une très faible activité insecticide contre la tique (à 10 mg/ml une inhibition de 3%) en comparant avec l'huile essentielle qui possède une très forte activité contre cette tique. Le furanoérmophilone a présenté de très faible activité nématocide, son activité est vraiment plus faible que l'activité de l'huile essentielle.

Les huiles essentielles d'*E. triquetrum* et *D. crinitus* ont montré une intéressante activité nématocide et l'huile de *D. crinitus* est plus active que l'huile d'*E. triquetrum* à 0.0625 les inhibitions sont 91, 13% respectivement. Tandis que l'huile de *S. olusatrum* a montré une bonne activité à 1 mg/ml mais au-delà de cette concentration, l'huile a montré de faible activité nématocide.

Tableau 20 : Résultat de l'activité insecticide des huiles essentielles et les composés majoritaires et l'extrait DCM d'*Eryngium triquetrum*.

		Les huiles essentielles / composés majoritaires						
	Souches	Concentration mg/ml	DC.PR	Dodécyle acétate	SO	Furanoérmophilone	ER	Ext DCM ER
Inhibition %	<i>S. littoralis</i>	10	48	-	66	-	61	30
		5	-	-	-	-	-	-
		2.5	-	-	-	-	-	-
		1.25	-	-	-	-	-	-
		IC ₅₀						
	<i>M. persicae</i>	10	92	69	60	-	81	37
		5	63	37	-	54	78	-
		2.5	68	-	-	-	48	-
		1.25	48	-	-	-	-	-
		IC ₅₀	1.31				1.21	
	<i>R. padi</i>	10	89	22	89	-	82	44
		5	80	-	77	77	63	-
		2.5	60	-	40	34	46	-
		1.25	33	-	-	-	-	-
		IC ₅₀	1.98		2.97		2.90	

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, **DC.P.R** : *Daucus cinitus* partie racine, **Er** : *Eryngium triquetrum*, **SO** : *Smyrniolum olusatrum*

Tableau 21: Résultats de l'activité insecticide des huiles essentielles et composés majoritaire contre les tiques

Les huiles essentielles / composés majoritaires								
	Souches	Concentration mg/ml	DC.PR	Dodécyle acétate	SO	Furanoérmophilone	ER	Ext DCM ER
Inhibition %	<i>H. lusitanicum</i>	10	100	100	100	3	100	20
		5	6	100	100	-	100	-
		2.5	18	100	94	-	100	-
		1.25	11	64	26	-	95	-
		0.625	-	3.1	-	-	15	-
		0.3125	-	0	-	-	-	-
		DL₅₀	0.00001	0.05	0.064		0.035	
		DL₉₀		0.06	0.094		0.046	

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, DC.P.R : *Daucus cinitus* partie racine, Er : *Eryngium triquetrum*, SO : *Smyrnum olusatrum*

Tableau 22 : Résultat de l'activité nématocide des huiles essentielles et composés majoritaire et l'extrait dichlorométhane

Les huiles essentielles / composés majoritaires								
	Souches	Concentration mg/ml	DC.PR	Dodécyle acétate	SO	Furanoérmophilone	ER	Ext DCM ER
Inhibition %	<i>M. javanica</i>	1	100	-	100	-	100	8
		0.5	100	92	20	4	98	-
		0.25	100	83	7	4	96	-
		0.125	100	79	-	-	21	-
		0.0625	91	69	-	-	13	-
		0.03125	68	30	-	-	-	-
		0.015625	12	13	-	-	-	-
		DL₅₀	0.014	0.114	0.611		0.159	
DL₉₀	0.053	0.366	0.950		0.285			

8-Activité molluscicide :

Les maladies infectieuses d'origine hydrique, principalement celles impliquant des parasites digénétiques, sont médiées par des processus écologiques et socio-économiques et constituent un problème de santé publique important dans les pays en développement. La schistosomiase est l'une des maladies parasitaires la plus courantes dans le monde. Il est particulièrement répandu chez les personnes vivant en milieu rural ou en milieu urbain ou périurbain défavorisé avec un accès limité à l'eau potable et des services d'assainissement inadéquats. Les modèles traditionnels basés exclusivement sur l'utilisation de médicaments schistosomicides se sont avérés réduire considérablement la morbidité chez les personnes infectées, mais la prévalence sur le terrain reste élevée après des décennies de traitement. .

On s'attend actuellement à ce que nous assistions au développement d'une nouvelle classe de molluscicides plus sûrs, qui devrait être moins nocif pour les organismes non ciblés et, si possible, sera plus sélectif envers les escargots infectés par des schistosomes. Des efforts croissants ont été réalisés pour se concentrer sur l'identification et la caractérisation des molluscicides d'origine végétale comme des alternatives plus sûres.



Figure 61 : Test molluscicide

Tableau 23: Résultats de l'activité molluscicide des huiles essentielles

Les huiles essentielles						
	Concentration	DC.PR	DC.PA	SO	ER2	ER8
	9630 mg/L	-	-	-	100	100
	9550 mg/L	-	-	92	-	-
	8550 mg/L	-	-	-	-	-
	8310 mg/L	75	-	-	-	-
	963 mg/L	-	-	-	100	100
	955 mg/L	-	-	100	-	-
Inhibition	855 mg/L	-	75	-	-	-
%	831 mg/L	58	-	-	-	-
	193 mg/L	-	-	-	100	100
	191 mg/L	-	-	100	-	-
	171 mg/L	-	25	-	-	-
	166 mg/L	8.3	-	-	-	-
	48 mg/L	-	-	92	100	100
	9.6 mg/L	-	-	25	100	100

DC.P.A : *Daucus crinitus* partie aérienne, **DC.P.R** : *Daucus cinitus* partie racine, **Er** : *Eryngium triquetrum*, **SO** : *Smyrniium olusatrum*

L'huile d'*E. triquetrum* et l'huile de *S. olusatrum* ont montré une bonne activité molluscicide et les huiles de *D. crinitus* partie racine et aérienne ont montré des activités molluscicide modérée. Mais l'huile d'*E. triquetrum* a montré une activité molluscicide très intéressante par rapport aux autres huiles essentielles. A cet égar nous sommes passé à la phase I des stades d'évaluations molluscicide recommander par l'OMS.

En premier lieu, nous avons évalué indépendamment la toxicité des trois huiles essentielles d'*E. triquetrum* avec différente proportion de falcarinol contre l'escargot *B. glabrata* adulte, vecteur du trématode *S. mansoni*. À des concentrations supérieures à 10 ppm, le taux de mortalité atteint 100% par la plupart des escargots exposés rétractés dans leur coquille avec l'expulsion de l'hémolymph. De concentrations de 0,5 à 1 ppm, le taux de survie des escargots exposés varie légèrement entre les trois lots indépendants d'huile. Sur la base d'une analyse Probit utilisant la survie des escargots traités aux huiles d'*E. triquetrum*, la concentration requise pour produire 50% de mortalité pour les décès jusqu'à 24 h d'exposition (CL₅₀) était de 0,51, 0,63, 0,69 ppm pour ET2, ET3 et ET1 (93, 89, 86 % falcarinol) respectivement (Fig 62). Les différentes valeurs de CL₅₀ étant relativement proches, les tests de toxicité suivants ont été réalisés avec l'huile essentielle ET3. Leurs valeurs CL₉₀ étaient respectivement de 0,9, 1,07 et 1,08.

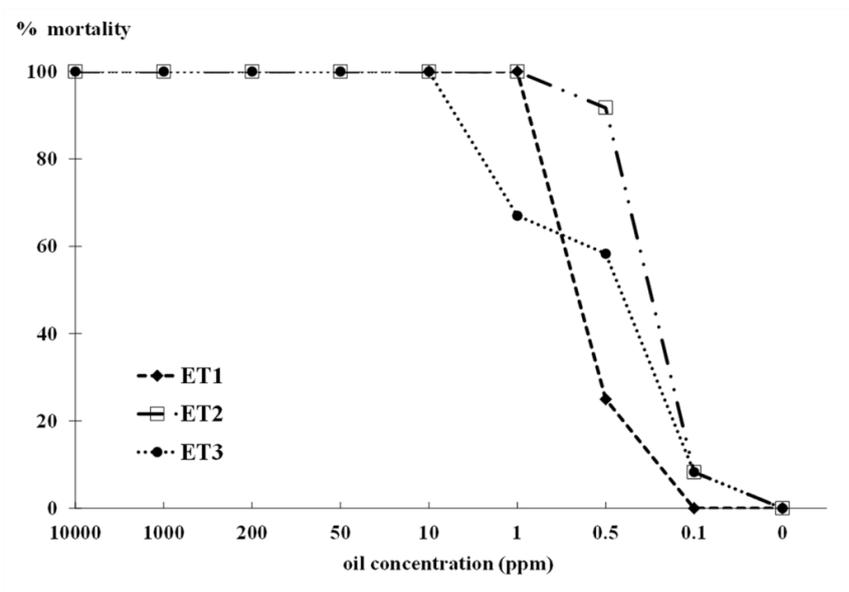


Figure 62 : Taux de mortalité de *Biomphalaria glabrata* à différentes concentrations d'huile essentielle extraite d'*Eryngium triquetrum*.

L'activité molluscicide de l'huile essentielle d'*E. triquetrum* a également été testée contre les escargots infestés par *S. mansoni*. Différentes concentrations d'huiles essentielles autour de

la CL₅₀ ont été utilisées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Fait intéressant, ce molluscicide d'origine végétale semble plus puissant contre les escargots infectés. En effet, aucun effet toxique n'est observé chez les escargots non infectés pour une concentration de 0,1 ppm alors qu'environ 20% des escargots infestés sont tués après 24 h d'exposition. A 0,5 ppm, l'huile essentielle d'*E. triquetrum* est 2 fois plus toxique pour les escargots parasités avec un taux de mortalité de 88,8% ± 4,8 alors qu'elle est de 38,9% ± 12 chez les escargots non infectés (Fig 63).

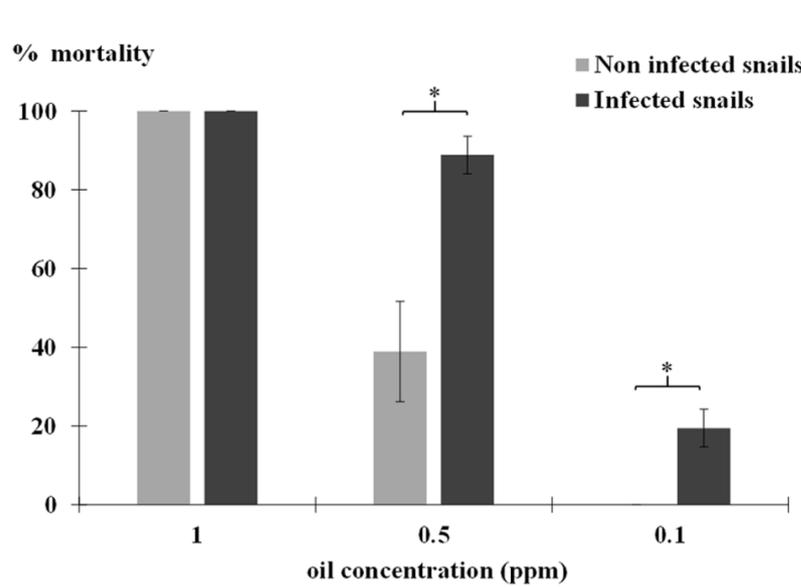


Figure 63: Effet de l'huile essentielle d'*Eryngium triquetrum* chez les escargots infectés par *Schistosoma mansoni*

L'huile d'*E. triquetrum* était toxique pour les escargots adultes d'une manière dose-dépendante, qu'il soit infecté ou non (Fig. 62 et 63). Pour la même gamme de concentration, il apparaît que les masses d'œufs sont moins sensibles à l'huile essentielle. Aucune différence de toxicité et de létalité n'a été observée dans les œufs exposés à des concentrations inférieures et voisines de la CL₅₀. Le taux d'éclosion positif était de 91,3% ± 4,7, 93,3% ± 2,8 aux concentrations de 0,1 et 0,5 ppm, respectivement par rapport au témoin qui a donné 95,7% ± 0,3 éclosion. Les embryons et les escargots *Biomphalaria* adultes présentent une sensibilité

différente à l'huile essentielle puisque la dose létale pour 100% de la population d'escargots adultes (1 ppm) a montré un effet léthal embryonnaire modéré, $64,7\% \pm 7,5$ des embryons d'escargots ont éclos et se sont développés avec succès (Fig 64) .

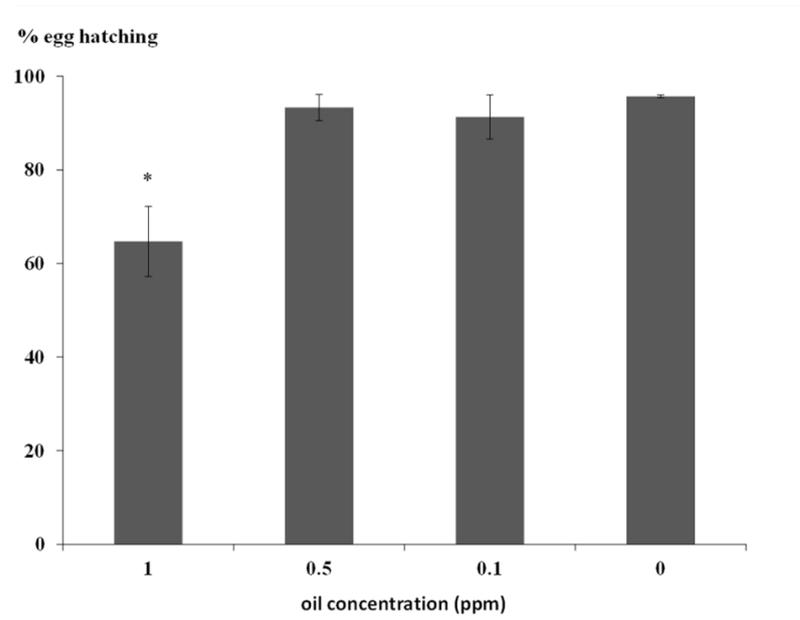


Figure 64: Oeufs et embryons de *Biomphalaria glabrata* exposés à des huiles d'*Eryngium triquetrum*.

Une approche alternative pour lutter contre la schistosomiase au lieu de contrôler la population d'escargots pourrait être de se concentrer sur le stade larvaire libre du parasite, des miracidies et des cercaires. Ainsi, les parasites ont été exposés pendant 1 ou 4 heures à différentes concentrations d'huile d'*E. triquetrum* allant de 0,1 à 1 ppm pour évaluer son effet léthal potentiel. La mortalité des miracidies et des cercaires de *S. mansoni* est presque complète pour 5, 1 et 0,5 ppm d'huile quel que soit le temps d'exposition. Pour une concentration de 0,1 ppm, le taux de mortalité des miracidies diminue considérablement pour atteindre $7,6\% \pm 2,7$ et $29,3\% \pm 8,0$ avec une période d'exposition de 1 et 4 heures (Fig 65a). Après une période d'exposition relativement courte, de graves dommages de surface sur les miracidies peuvent être observés avec une perte générale des cils qui causent probablement leur immobilité (Fig 66). Le profil de mortalité des cercaires exposées est assez similaire avec $4,6\% \pm 3,6$ et $15,6\%$

± 5,8 des décès observés après les différents temps de contact (Fig 65b). Pour déterminer la capacité des miracidie exposés à infecter leur hôte, des concentrations sublétales d'huile essentielle d'*E. triquetrum* ont été appliquées pendant 30 min. Les résultats de l'exposition des escargots à *S. mansoni* miracidie traités sont présentés sur la figure 66. Les miracidies exposées à de faibles concentrations d'huile essentielle sont moins infectieuses avec 3,3% de prévalence par rapport aux non traitées avec une prévalence de 44%.

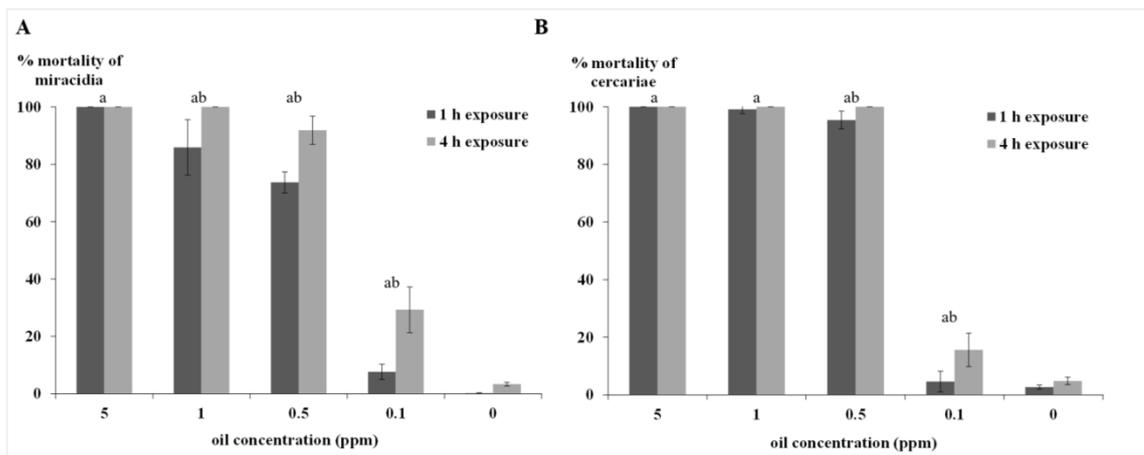


Figure 65: Mortalité des larves nageant librement de *Schistosoma mansoni* exposées à l'huile essentielle d'*Eryngium triquetrum*

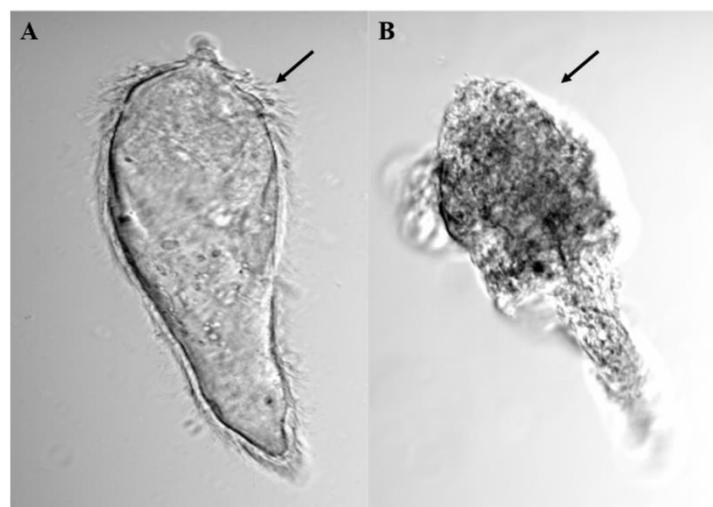


Figure 66 : Observation de l'activité parasiticide sur les miracidies. **a** Miracidium non exposé à l'huile essentielle d'*E. triquetrum*. **b** Miracidium exposé à 0,5 ppm pendant 1 h.

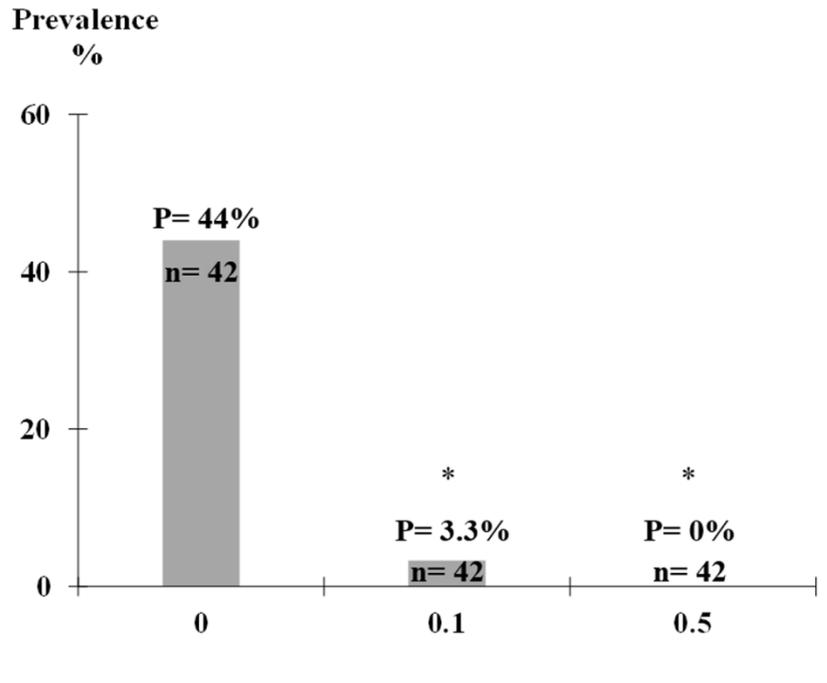


Figure 67 : Effet de l'huile d'*Eryngium triquetrum* sur l'infectivité de *Schistosoma mansoni* miracidie

Dans la présente étude, l'huile essentielle d'*E. triquetrum* semble être un candidat molluscicide prometteur considérant les critères standard établis par l'OMS avec une concentration létale de 90% et 50% inférieure à 400 et 100 ppm respectivement. Les valeurs des LC₉₀ et LC₅₀ par rapport aux escargots adultes de *B. glabrata* sont de 1,02 et 0,61 ppm, respectivement, sont significativement inférieurs à la plupart des huiles essentielles bien caractérisées et similaires au latex ou au niclosamide. Contrairement au molluscicide de référence, la plus faible toxicité de l'huile essentielle d'*E. triquetrum* à embryonnaire œufs potentiellement en raison d'une faible capacité de pénétration dans les masses d'œufs, suggère une plus grande spécificité d'action envers escargots adultes. Cette dichotomie toxique peut être utile pour traiter le milieu aquatique tout en réduisant les effets secondaires sur les animaux non ciblés. La perturbation du cycle de vie du parasite est plus favorisé lorsque les escargots sont même infectés tôt, cette mortalité plus élevée chez les escargots infectés

pourrait être liée à une large dérégulation des voies de signalisation impliquées dans la désintoxication et / ou le métabolisme de production d'énergie. Dans un contexte d'objectif d'élimination de la schistosomiase, la caractérisation des activités biologiques à partir de composés d'origine végétale se concentre principalement sur la toxicité molluscicide pour rompre le cycle de transmission du parasite. Cependant, certains candidats prometteurs présentent une double activité en provoquant soit la mort de larves infectieuses ou des anomalies du développement conduisant à une faible pathogénicité. Les valeurs de mortalité après une exposition de 24 h seulement à 0,5 ppm étaient d'environ 75% et 95% pour les miracidies et les cercarcies, respectivement, et proches de 100% pour les deux après 4 h d'exposition. Fait intéressant, aucune mort d'escargot n'a été observée dans les mêmes conditions expérimentales. Cette huile d'*E. triquetrum* enrichi en falcarinol prévient également les infestations parasitaires. En effet, à de faibles concentrations pendant une courte durée d'exposition (30 min), la compatibilité escargot-parasite est fortement affectée sans escargots parasités à 0,5 ppm. Cette perte significative de virulence parasitaire suite au traitement pourrait être attribuée à l'excrétion des plaques ciliées utilisées par les parasites pour la locomotion et la pénétration dans l'escargot hôte.

CONCLUSION

L'Algérie dispose d'une richesse de flore spécifique. Cette richesse s'exprime notamment par une variabilité taxonomique remarquable, un taux d'endémisme élevé mais aussi par une variabilité inter-spécifique des espèces. La recherche de molécules bioactives repose souvent sur la connaissance de l'usage traditionnel des plantes. D'autres approches sont également considérées, comme les approches écologiques. En effet, les plantes soumises à des stress abiotiques peuvent également être une source riche en molécules bioactives. Ces molécules sont souvent impliquées dans les mécanismes d'adaptation et de défense de la plante à ces différents stress.

Ce travail de thèse repose sur l'étude des huiles essentielles, des fractions volatiles et les composés majoritaires des trois plantes de la famille des *Apiacées* : *Eryngium triquetrum*, *Smyrniololus atrum*, *Daucus crinitus*. L'objectif principal était de réaliser la caractérisation chimique et biologique des métabolites secondaires de ces espèces afin d'identifier des constituants moléculaires dotés de propriétés biologiques laissant envisager des applications dans les domaines de la santé, cosmétique, l'agroalimentaire et l'agriculture.

Le présent travail est structuré de trois parties :

La première partie (A) nous avons tout d'abord présenté une synthèse bibliographique sur les espèces sélectionnées ainsi sur les composés présents dans les huiles essentielles des trois espèces. Nous avons également présenté les techniques d'analyses courantes dans le domaine d'analyse des mélanges volatils des plantes et pour l'étude structurale des molécules. Enfin, nous avons explicité les diverses techniques d'extractions des huiles essentielles, et leurs avantages, de même que les procédés mis en oeuvre pour l'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles.

La partie suivante (B) inclut les résultats de l'étude chimique à savoir, l'étude des compositions chimiques des huiles essentielles, les fractions volatiles et les extraits, la mise en oeuvre de stratégies d'identification optimisées et la synthèse de composé majoritaire de

l'huile essentielle de *D. crinitus* partie racine. Cette partie a été structurée sous forme de trois chapitres relatifs à chacune des espèces étudiées. Une analyse comparée des résultats nous permet de tirer les conclusions suivantes.

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles d'*E. triquetrum*, *S. olusatrum* et *D. crinitus* (partie racine et partie aérienne) permis d'identifier 24, 43, 50 et 50 composés représentant (95,6 ; 84,4, 92,4 et 93,2% de la composition totale) respectivement. Les quatre huiles essentielles ont des profils chromatographiques très différents. L'huile essentielle d'*E. triquetrum* est riche en faltarinol, un polyacétylène d'intérêt biologique intéressant qui est présent entre 71.2-92% dans l'huile essentielle. En revanche la présence des sesquiterpènes notamment les furanosesquiterpène constitue les composés majoritaires de l'huile essentielle de *S. olusatrum* (furanodiène et le furanoérmophilone). Par contre l'huile de *D. crinitus* partie aérienne est riche en composé phénylpropanoïde notamment l'isochavicol isobutyrate alors que les huiles provenant des parties racines sont riches en composé aliphatique notamment le dodécyle acétate. Les compositions chimiques des différents extraits préparés au cyclohexane d'*E. triquetrum* et *S. olusatrum* obtenus à partir de deux méthodes d'extractions, ne font pas exception puisqu'elles montrent la présence des composés majoritaires. Ces extraits révèlent une des méthodes les plus efficaces pour concentrer les composés majoritaires. En revanche, les extraits de *D. crinitus* partie racine ont montré une composition chimique différente de celle de l'huile essentielle. C'est une source de nouvelles molécules bioactives.

Le composé majoritaire isochavicol isobutyrate de l'huile de la partie aérienne de *D. crinitus* a été synthétisé afin d'avoir une quantité suffisante pour l'évaluation des activités biologiques. La synthèse fut réalisée en quatre étapes en utilisant des méthodes bien décrites dans la littérature et utilisables à l'échelle industrielle. Ces réactions incluent la protection du groupement phénol avec l'éther chloroalkyle MOM-Cl, la réaction de Suzuki-Miyaura avec le trans-1-Propenylboronic acid pinacol ester, la déprotection du groupement méthoxyméthyl

MOM, et enfin l'estérification par le chlorure d'isobutyryl. Durant nos travaux, le composé désiré a été purifié en utilisant la phase inverse et la flash-chromatographie. Nous avons pu vérifier que cette étape difficile peut être éliminée en optimisant les conditions de la réaction de Suzuki-Miyaura. Ce couplage palladocatalysé doit absolument se faire avec un excès de l'ester boronique (idéalement 3 équivalent ou plus) afin de conduire à la consommation totale du bromophénol de départ dont la séparation du produit désiré est très problématique.

La partie (C) s'intéresse aux résultats relatifs au screening biologique des huiles essentielles et leurs composés majoritaires ainsi les extraits aux solvants. Nous avons ainsi évalué le pouvoir antibactérien des huiles essentielles contre un panel de micro-organismes impliqués dans des infections nosocomiales et alimentaires, à savoir cinq souches gram+, trois souches gram-. Nos résultats ont montré que les huiles essentielles d'*E. triquetrum* et *S. olusatrum* et *D. crinitus* présentent des résultats intéressants contre *S. aureus*. En particulier, l'huile essentielle d'*E. triquetrum* a montré une bonne activité contre les différentes souches alors que l'huile de *D. crinitus* a montré une activité intéressante contre *E. faecalis*. Les tests herbicide ont montré que les huiles essentielles d'*E. triquetrum*, *S. olusatrum* et faltarinol sont des excellents inhibiteurs de la photosynthèse et peuvent être des agents herbicides naturels. Ainsi les fractions de *D. crinitus* et *S. olusatrum* ont montré une activité herbicide plus intéressante que les huiles. La lutte contre les mauvaises herbes est la composante botanique de la lutte antiparasitaire, qui tente d'empêcher les mauvaises herbes, en particulier les mauvaises herbes nuisibles. Le désherbage en agriculture conventionnelle et biologique est un enjeu majeur. En agriculture biologique, il devient impossible d'utiliser des herbicides chimiques, ce qui ouvre la voie à la recherche de molécules naturelles à pouvoir herbicide. Les travaux en cours nous permettent d'offrir une perspective pour l'utilisation de composés naturels, tels que les huiles essentielles d'*E. triquetrum* et *S. olusatrum* et le faltarinol en désherbage biologique et la protection des cultures. De la même manière, l'utilisation du

falcarinol peut également être considérée comme une bonne alternative à l'atrazine en agriculture conventionnelle, puisque le falcarinol a montré de meilleurs résultats que l'atrazine, considérée comme l'herbicide de synthèse le plus utilisé dans le monde. En parallèle, les huiles essentielles ont montré une intéressante activité écotoxicologique contre *Artémia salina* en particulier l'huile essentielle d'*E. triquetrum* et le falcarinol qui ont montré des IC₅₀ (0.7 et 0.35 µg/ml) basses. De plus cette huile a montré une activité moulluscicide éclatante, ce résultat peut être utile pour limiter la transmission des maladies parasitaires d'origine hydrique dans les zones endémiques. En ce sens, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) via le « Groupe consultatif stratégique et technique de l'OMS pour les maladies tropicales négligées (MTN) » stimule les stratégies de contrôle des maladies parasitaires par le contrôle écologique de la population de l'hôte intermédiaire, comme les escargots *B. glabrata* pour la schistosomiase contrôlée. Au cours des dernières décennies, de nombreuses plantes ont été testées comme source de molluscicides phytochimiques potentiels et *E. triquetrum* et son composant principal (falcarinol) sont prometteurs comme molluscicides contre l'escargot *B. glabrata*, répondant aux exigences de l'OMS pour une utilisation comme molluscicide naturel. Les fractions (FDC3 et SOB1) ont aussi montré une bonne activité écotoxicologique. Les huiles essentielles d'*E. triquetrum*, *D. crinitus*, *S. olusatrum* et les composés majoritaires falcarinol et furanoérmophilone ont révélé une bonne activité antibactérienne contre les phytopathogènes. Ainsi les extraits d'*E. triquetrum* et *D. crinitus* qui ont montré une bonne activité contre *Pectobactérium*. L'huile de *S. olusatrum* a révélé un pouvoir antifongique prometteur contre F5. Alors que toutes les huiles ont montré un pouvoir croissant intéressant de la souche F3. Ce résultat peut être intéressant au niveau du laboratoire. Les huiles essentielles d'*E. triquetrum* et *D. crinitus* ont montré un pouvoir anti-puceron très intéressant. Les huiles d'*E. triquetrum* et *S. olusatrum* étaient très actives contre les tiques. L'huile de *D. crinitus* est un agent nématocide puissant ainsi que le dodécyle acétate

La forte activité que l'huile essentielle d'*E. triquetrum* avait contre les bactéries les herbes, les insectes due à la présence de falcarinol. La présence de falcarinol à des pourcentages très élevés dans *Eryngium* (93 % pour certaines stations de récolte) apporte la perspective de considérer cette huile essentielle comme une source possible de cette molécule puisque c'est la seule source décrite dans la littérature qui présente du falcarinol à des taux aussi élevés. Les bons résultats des activités du falcarinol comme herbicide, antibactérien contre *Pseudomonas* et *Pectobacterium* permet donc d'envisager son utilisation à l'échelle industrielle pour la protection des cultures. La deuxième huile essentielle de cette étude, l'huile essentielle de *S. olusatrum*, a également montré très bonne activité herbicide et fongicide. Cette activité vient soit du furanodiène soit à la synergie entre les molécules. Alors que l'huile essentielle de *D. crinitus* est un excellent agent anti-pucerons et nématocide. Le dodécyle acétate est le responsable de cette activité qui a montré la même activité.

Nos travaux sur *E. triquetrum* ont fait l'objet de deux publications, la première parue en 2018 dans le journal de chemistry and biodiversity. La seconde parue en 2020 dans le journal de Parasites & Vectors. La troisième parue en 2021 dans le journal antibiotics. Deux articles sont actuellement en phase de finalisation (i) premier traite les activités insecticides des trois huiles essentielles (ii) le second s'intéresse à la caractérisation chimique et l'étude de l'activité biologique de l'huile essentielles de *D. crinitus* et la synthèse du composé majoritaire de la partie aérienne.

Les résultats de ces travaux de thèse ouvrent la voie à plusieurs perspectives :

- ❖ Etudier les potentialités d'une production industrielle des quatre huiles essentielles. Il serait intéressant d'envisager la mise en culture des espèces afin de limiter les difficultés liées au sourcing

- ❖ L'optimisation par la synthèse chimique les composés majoritaires et leurs analogues afin d'augmenter leurs activité biologique. L'évaluation biologique du composé majoritaire de *D. crinitus* que nous avons synthétisé

PARTIE
EXPERIMENTALE

1-Echantillonnage du matériel végétal :

Eryngium triquetrum

Les parties aériennes d'*Eryngium triquetrum* ont été récoltés en (Mai-Juin) 2016 et en (Mai-Juin) 2017, dans 5 localités de la région de Tlemcen ; Bouhannak, Ain fezza, lalla setti, Mefrouche, Ouchba.

Smyrniium olusatrum

Les parties racine de *Smyrniium olusatrum* ont été récoltées dans deux stations de la région de Tlemcen Oudjlida, au cours des mois de Décembre 2015 et Janvier-Février 2016.

Daucus crinitus

Les parties racines de *Daucus crinitus* ont été récoltées en mois de Mai-Juin 2016 par des herboristes et les parties aériennes ont été récoltées en Juin 2018 de la commune de Bensekrane de la région de Tlemcen.

2-Préparation d'échantillons :

2.1. Extraction des huiles essentielles :

Les hydrodistillations ont été réalisées avec un appareil de type Clevenger (bouilleurs de 5 L, 10 L), pendant une durée de 4-5 h. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C. Les rendements sont calculés par rapport à la masse de végétal frais.

2.2. Extraction des extraits aux solvants :

Le matériel végétale a été séché et broyé, par la suite, soumis à un épuisement continu aux solvants. Nous avons effectué trois extractions avec trois solvants différents (cyclohexane, méthanol, dichlorométhane) pour l'*E. triquetrum* par la méthode de macération et ultrasons, pour les deux autres espèces *S. olusatrum* et *D. crinitus*, nous avons fait l'extraction par macération et ultrasons avec le cyclohexane. Pour la méthode d'extraction par macération, nous avons pris 5 g du végétale dans 100 ml de solvant pendant 4 h deux fois. En ce qui

concerne la méthode des ultrasons, nous avons pris 100 g du matériel végétale dans 500 ml de solvant pendant 2 h trois fois. Les macéras ont été filtrés sur un papier filtre et évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les extraits sont conservés dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C.

3-Appareillage :

- **Analyse par CPG/DIF**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un GC Thermo Scientific Focus avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) en utilisant une colonne capillaire DB-5 en silice fondue (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm); la pression initiale était de 1,0 Pa. La température de la colonne a été programmée comme suit: 60 °C pendant 3 min, 60–240 °C (3 °C min⁻¹), 240–300 °C (10 °C min⁻¹) et 300 °C pendant 10 min. La température de l'injecteur était de 250 °C, avec une injection en mode «splitless». Les analyses ont duré 80 minutes. Les échantillons ont été analysés en trois exemplaires. Les indices de rétention (RI) des composés ont été déterminés en fonction des temps de rétention (RT) pour une série de n-alcanes (C7 - C40); solution commerciale, en utilisant l'équation de Van den Dool et Kratz.

- **Analyse par CPG-SM :**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Thermo Scientific et identifiées par spectrométrie de masse couplée au détecteur sélectif de masse DSQ II. Une colonne capillaire DB-5 en silice fondue (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). La méthode d'analyse est la même méthode utilisée en analyse par CPG-FID. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70eV. L'analyse qualitative des composés était basée sur la comparaison de leur masse spectrale et de leur temps de rétention relatif avec ceux de la base de données des spectres de masse NIST et Kovats RI sur les chromatogrammes enregistrés en Full Scan ou en mode SIM en utilisant les ions caractéristiques.

- **Analyse par RMN :**

Les spectres RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100,5 MHz) ont été enregistrés respectivement sur un spectromètre AJEOL JNM-EX 400. Les déplacements chimiques (δ , ppm) sont donnés en référence à ^1H ou ^{13}C résiduel de solvants deutérés dans le solvant indiqué (CDCl_3 7.27, 77.00; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ 2.05, 29.84 et 206.26, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ 2.50, 39.52)). Les déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C (δ) sont indiqués en parties par million (ppm) par rapport à l'échelle TMS. Les constantes de couplage J sont indiquées en Hz. Les abréviations suivantes sont utilisées pour les multiplicités de spectres de protons: s: singulet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, qt: quintuplet, m: multiplet, br: large, dd: double doublet, dt: double triplet. Les constantes de couplage (J) sont rapportées en Hertz (Hz). Plusieurs signaux non attribuables seront représentés par ArH (hydrogène aromatique).

- **HPLC :**

LC-MS a été enregistrée avec ThermoScientific. L'analyse LC-MS a été réalisée avec une colonne phénoménexLuna C18 (500 μl / min, 3 μ , 100A) en utilisant un mélange eau / acétonitrile / acide formique 0,1%. HPLC Accela couplé au spectromètre de masse LCQ Fleet avec ionisation d'électrospray positive (ESI +) ou négative (ESI-) (tension d'ionisation 4,5 kV, température d'injection 240 °C).

4-Fractionnement et purification

4.1. Fractionnement de l'huile d'*E. triquetrum* :

Nous avons effectué deux fractionnements de l'huile essentielle d'*E. triquetrum* et la purification du falcarinol sur une colonne ouverte de silice en utilisant cyclohexane / éther diéthylique comme éluant.

4.1.1. Premier fractionnement de l'huile d'*E. triquetrum* :

Une masse de 300 mg d'huile essentielle a été fractionnée sur une colonne ouverte de silice à l'aide d'un gradient croissant : 100% cyclohexane, 99-1 %, 96-4 %, 95-5 %, 94-6 %, 90-10 %, 100% éther diéthylique.

4.1.2. Deuxième fractionnement de l'huile d'*E. triquetrum* :

L'huile d'*E. triquetrum* (500 mg) a été fractionné pour la deuxième fois sur une colonne ouverte de silice à l'aide d'un gradient de polarité croissante de proportions : 100% cyclohexane, 95-5 %, 90-10 %, 50-50 %, 100 % éther diéthylique

4.1.3. Purification de Falcarinol à partir de l'huile *E. triquetrum* :

La purification de Falcarinol a été réalisée à partir de l'huile essentielle (150 mg) sur une colonne ouverte en appliquant le gradient suivant : 100% cyclohexane, 95-5 %, 90-10 %, 85-15 %, 50-50 %, 100 % diéthyléther. Ce fractionnement a permis d'isoler le Falcarinol dans la fraction F20 (65.7 mg, pureté : 99%) correspond au gradient 90-10 %.

Afin de déterminer la configuration de Falcarinol, nous avons procédé à la détermination du pouvoir rotatoire à l'aide d'un polarimètre. Le polarimètre utilisé est POLAX-2L (ATAGO CO), (AC100, 240V, 50/60 Hz, 40VA). Nous avons équilibré l'appareil en utilisant des produits de référence tels que l'acide glutamique, tyrosine. Nous avons préparé des solutions d'huile essentielle d'*E. triquetrum* et de Falcarinol de 5 mg/ml (0.5%) dans le chloroforme, les mesures ont été effectuées en trois reprises.

4.2. Fractionnement de l'huile de *S. olusatrum* :

Nous avons effectué trois fractionnements de l'huile essentielle d'*S. olusatrum* sur une colonne ouverte de silice en utilisant cyclohexane / acétate d'éthyle comme éluant.

4.2.1. Le premier fractionnement de l'huile de *S. olusatrum* :

L'huile de *S. olusatrum* (500 mg) a été fractionnée sur une colonne ouverte de silice à l'aide d'un gradient de polarité croissante de proportions : 100% cyclohexane, 95-5 %, 90-10 %, 50-50 %, 100 % acétate d'éthyle

4.2.2. Le deuxième fractionnement de l'huile de *S. olusatrum* :

L'huile de *S. olusatrum* (1 g) a été fractionnée pour la deuxième fois sur une colonne ouverte de silice à l'aide d'un gradient de polarité croissante de proportions : 100% cyclohexane, 95-5 %, 90-10 %, 80-20%, 70-30%, 60-40 %, 50-50 %, 30-70%, 100 % acétate d'éthyle

4.2.3. Le troisième fractionnement de l'huile de *S. olusatrum* :

L'huile de *S. olusatrum* (150 mg) a été fractionnée sur une colonne ouverte de silice à l'aide d'un gradient de polarité croissante de proportions : 100% cyclohexane, 95-5 %, 94-6 %, 90-10 %, 80-20% 50-50 %, 100 % acétate d'éthyle

4.2.4. La purification des composés majoritaires de l'huile de *S. olusatrum* :

La purification des composés majoritaires de *S. olusatrum* (391 mg) d'huile essentielle a été fractionnée sur une colonne ouverte de silice avec un gradient d'élution croissant du cyclohexane/ acétate d'éthyle: (A: 100%; 0%), b (A: 98%, B: 2%), c (A: 97%, B: 3%), d (A: 96%, B: 4%), e (A: 95%; B: 5%), f (A: 90%, B: 10%), g (A: 80%, B: 20%), h (A: 50%, B: 50%), i (A: 0% B: 100%). Ce fractionnement a permis d'isoler le Furanoérmophilone et furanodiène dans la fraction F46 et F35 (29 mg, pureté : 97%), (4.6 mg, pureté : 60%) correspond au gradient 98-2 % respectivement.

4.3. Fractionnement de l'huile de *D. crinitus* partie racine :

L'huile de *D. crinitus* partie racine (1g) a été fractionnée par la chromatographie Flash VMR international connecté au Gibson FC 204 sur une colonne de silice SI60 de 30 g (40-63 µm), flow : 10-30 ml/min, pression inf à 3 bars, chargement : 0.3-1.5 g, volume colonne :

53ml. De 0 min jusqu'à 60min un gradient croissant de 95-5% cyclohexane / acétate d'éthyle jusqu'à 100% acétate d'éthyle, après 100% d'acétate d'éthyle pendant 10 min nous avons obtenu la courbe $A = f(t)$

4.4. Chromatographie sur une couche mince (CCM)

Une chromatographie analytique sur couche mince (CCM) a été réalisée avec des plaques Merck SIL G / UV254. Les composés ont été visualisés par exposition à la lumière UV ou par trempage des plaques dans des solutions de ninhydrine ou de permanganate de potassium suivi d'un chauffage.

4.5. Chromatographie sur colonne flash inversée

La chromatographie sur colonne Flash inversée a été réalisée en utilisant la chromatographie Flash VMR international connecté au Gibson FC 204 avec du gel de silice 12g Angela Technologies (Fluka), débit 10 ml / min, $\lambda = 220$ nm

5-La synthèse de l'isochavicol isobutyrate :

a. Protection du 4-bromophénol par le groupement méthylmethoxy ether [101] :

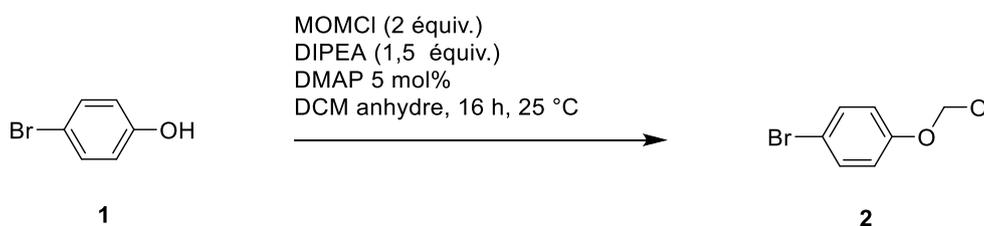


Schéma 16 : Schéma réactionnel de la protection de composé 1

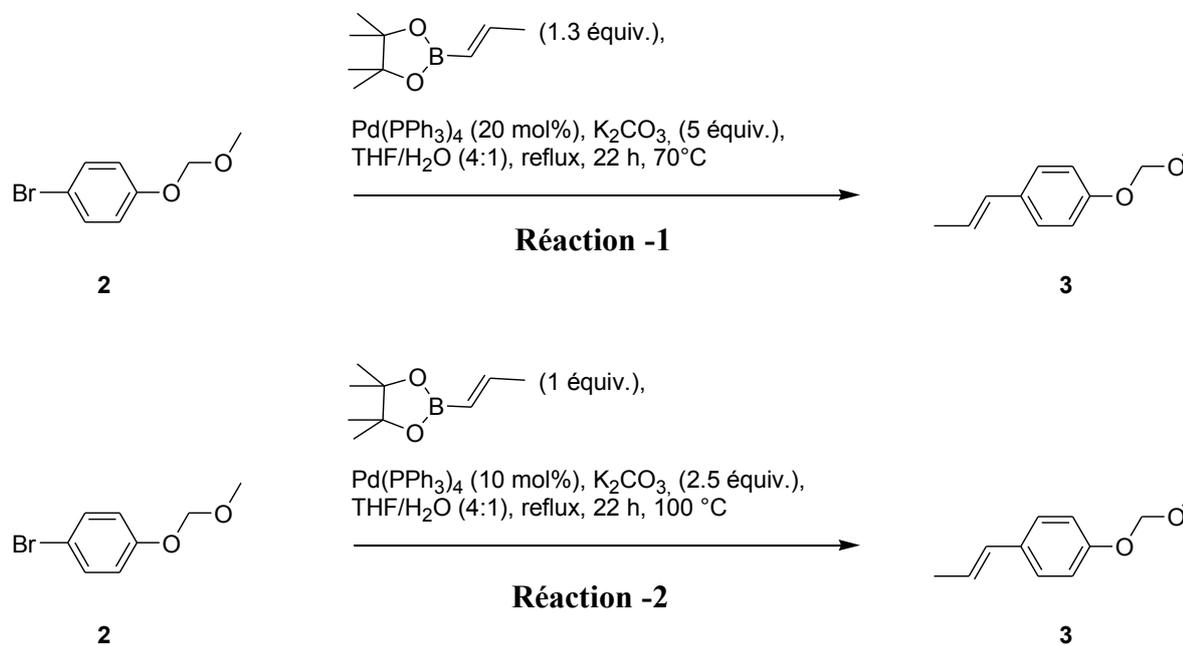
La formation du composé protégé **2** a été effectuée à température ambiante dans le dichlorométhane anhydre (DCM) en présence d'un excès de méthyle chlorométhyle éther (MOMCl), du diisopropyl éthyl amine (DIPEA) et de la 4-diméthylamino-pyridine (DMAP) selon le **Schéma 16**. Le produit souhaité **2** a été obtenu avec un très bon rendement de **95%**.

Sous un reflux d'azote, nous avons mélangé le 4-bromophénol (5 g, 28,9 mmol, 1 équiv.), de la DIPEA (10,06 ml, 58,7 mmol, 2 équiv.). Après du DCM anhydre (84 ml) a été ajouté, du

chloro (méthoxy) méthane (4,39 ml, 58,7 mmol, 2 équiv.). Le mélange a été agité à 25 °C pendant 16 h, le control de la réaction a été réalisé à l'aide des CCM en utilisant le cyclohexane/acétate d'éthyle (80-20 %) comme éluant. Nous avons effectué des extractions afin d'éliminer l'excès des réactifs. La première extraction avec (2x) Na₂CO₃ (10%) 50 ml pendant 20 min, ensuite deuxième extraction avec (2x) solution saturée de NH₄Cl avec quelques gouttes d'acide citrique (pH=4). Enfin une extraction avec la solution saturée de NaCl. La phase organique a été séchée avec le MgSO₄ ensuite filtré. Le DCM a été éliminé et la réaction brute a été soumise à un fractionnement sur une colonne éluee avec DCM /acétate d'éthyle. Le produit a été obtenu sous forme d'huile incolore

b. Couplage palladocatalysé de Suzuki-Miyaura [102] :

Cette réaction a lieu en milieu basique en présence d'un excès de K₂CO₃, dans un mélange THF/H₂O et en utilisant le [Pd⁰] comme catalyseur. Les conditions réactionnelles sont présentées dans le **Schéma 17**.



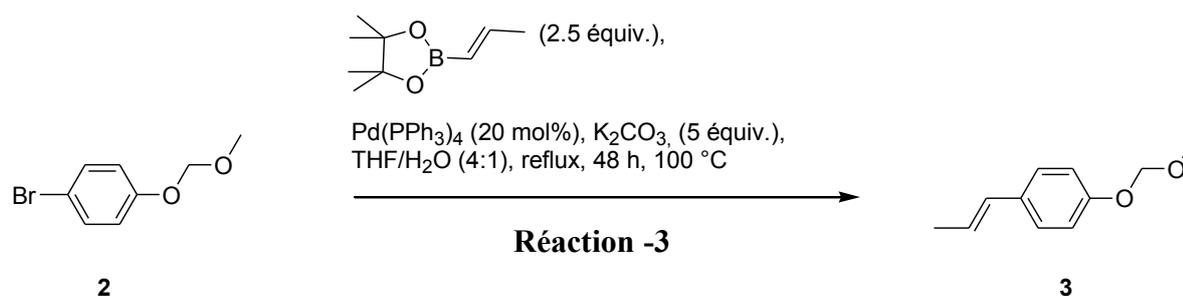


Schéma 17 : Schéma réactionnel du couplage de Suzuki-Miyaura

b.1-Protocole de la réaction 1 :

Sous un reflux d'azote nous avons mélangé de 2,4-bromo-phénol (2 g, 9,2 mmol, 1 équiv.), K₂CO₃ (6.35 g, 46 mmol, 5 équiv.); Du Pd (PPh₃)₄ (2.12 g, 1,84 mmol, 20% en moles) dans du THF / eau 4: 1 (20 ml) a été agité pendant 15 minutes. Ensuite, du 4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolane (2,01 g, 11,9 mmol, 1,3 équiv.) A été ajouté. Le mélange a été chauffé à 70°C au reflux pendant 22 h. La réaction brute a ensuite été concentrée sous vide, puis extraite avec Et₂O et une solution saturée de NaHCO₃. La couche organique a été concentrée sous vide et purifiée par Chromatographie sur colonne de gel de silice avec 100% de dichlorométhane. Nous avons obtenu un rendement de **57%**

b.2-Protocole de la réaction 2 :

Sous un reflux d'azote nous avons mélangé de 2,4-bromo-phénol (1 g, 4,6 mmol, 1 équiv.), K₂CO₃ (3,18 g, 23 mmol, 2,5 équiv.); Du Pd (PPh₃)₄ (1,12 g, 0,92 mmol, 10% en moles) dans du THF / eau 4: 1 (20 ml) a été agité pendant 15 minutes. Ensuite, du 4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolane (1 g, 5,95 mmol, 1 équiv.) A été ajouté. Le mélange a été chauffé à 100°C au reflux pendant 22 h. La réaction brute a ensuite été concentrée sous vide, puis extraite avec Et₂O et une solution saturée de NaHCO₃. La couche organique a été concentrée sous vide et purifiée par Chromatographie sur colonne de gel de silice avec 100% de dichlorométhane. Nous avons obtenu un rendement de **70%**

b.3-Protocol de la réaction 3 :

Sous un reflux d'azote nous avons mélangé de 2,4-bromo-phénol (300 mg, 1,38 mmol, 1 équiv.), K₂CO₃ (955 mg, 6,9 mmol, 5 équiv.); Du Pd (PPh₃)₄ (319 mg, 2,76 mmol, 20% en moles) dans du THF / eau 4: 1 (20 ml) a été agité pendant 15 minutes. Ensuite, du 4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolane (580 mg, 3,45 mmol, 2,5 équiv.) A été ajouté. Le mélange a été chauffé à 70°C au reflux pendant 48 h. La réaction brute a ensuite été concentrée sous vide, puis extraite avec Et₂O et une solution saturée de NaHCO₃. La couche organique a été concentrée sous vide et purifiée par Chromatographie sur colonne de gel de silice avec 100% de dichlorométhane. Le produit pur était obtenu sous forme d'huile ambrée. Nous obtenons la formation du composé **3** souhaité avec un bon rendement de **93 %**.

c. Déprotection du groupement méthymethoxy ether [103-104] :

Cette réaction a lieu en milieu acide et à température réduite (10 °C) dans un mélange THF/H₂O. Les conditions d'hydrolyse sont présentées dans le **Schéma 18**.

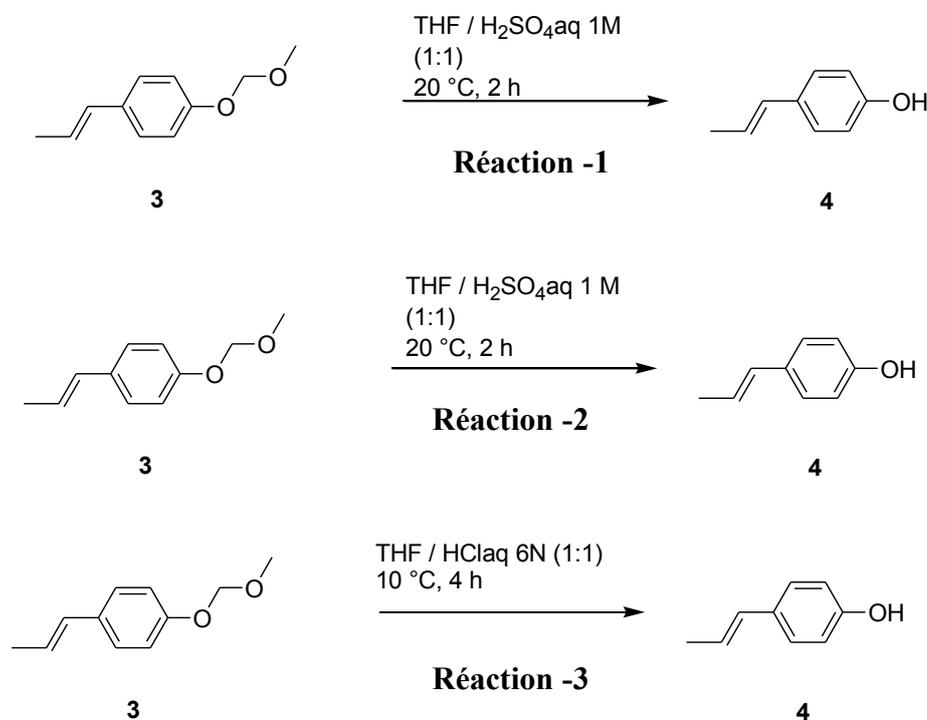


Schéma 18 : Schéma réactionnel de la réaction de déprotection

c.1-Protocol de la réaction-1 :

À une solution de 3, (E) -1- (méthoxyméthoxy) -4- (prop-1-en-1-yl) benzène (1,19g, 6,65 mmol) dans du THF (50 ml) a été ajouté H₂SO₄ aq 1M (50 ml). Le mélange a été agité à 20 °C pendant 2 h. La réaction brute a ensuite été concentrée sous vide, la réaction ensuite été extraite avec AcOEt (3 x 350 ml). La couche organique a ensuite été concentrée sous vide puis purifiée par Chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient 80:20 de cyclohexane / acétate d'éthyle. La réaction d'hydrolyse a été échouée.

c.2-Protocol de la réaction-2

À une solution de 3, (E) -1- (méthoxyméthoxy) -4- (prop-1-en-1-yl) benzène (400 mg, 2,25 mmol) dans du THF (12 ml) a été ajouté H₂SO₄ aq 1M (12 ml). Le mélange a été agité à 20 °C pendant 2 h. La réaction brute a ensuite été concentrée sous vide, la réaction ensuite été extraite avec acétate d'éthyle (3 x 350 ml). La couche organique a ensuite été concentrée sous vide puis purifiée par Chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient 80:20 de cyclohexane / acétate d'éthyle. La réaction d'hydrolyse a été échouée

c.3-Protocol de la réaction-3

À une solution de 3, (E) -1- (méthoxyméthoxy) -4- (prop-1-en-1-yl) benzène (224 mg, 1,38 mmol) dans du THF (5 ml) a été ajouté HCl aq 6N (5 ml). Le mélange a été agité à 10 °C pendant 4 h. La réaction brute a ensuite été concentrée sous vide, basifiée avec une solution saturée de Na₂CO₃ puis extraite avec Et₂O. La phase aqueuse a ensuite été extraite avec acétate d'éthyle (3 x 100 ml) et une solution 1 M de HCl. La couche organique a ensuite été concentrée sous vide puis purifiée par Chromatographie sur colonne de gel de silice avec un gradient de 90:10 à 80:20 de cyclohexane / acétate d'éthyle. Le produit pur a été obtenu sous forme d'huile chamoisée. Nous obtenons la formation du produit souhaité avec un rendement quantitatif de **75 %**.

d. Réaction d'Estérification [105]:

La dernière étape de la suite réactionnelle pour la formation de l'Isochavicol isobutyrate **5** est une estérification du phénol **4**. La réaction à lieu dans le THF anhydre en présence d'un excès de chlorure d'isobutyryle, de la base forte DIPEA, et d'une quantité catalytique de DMAP. Les conditions de la réaction sont présentées dans le **Schéma 19**.

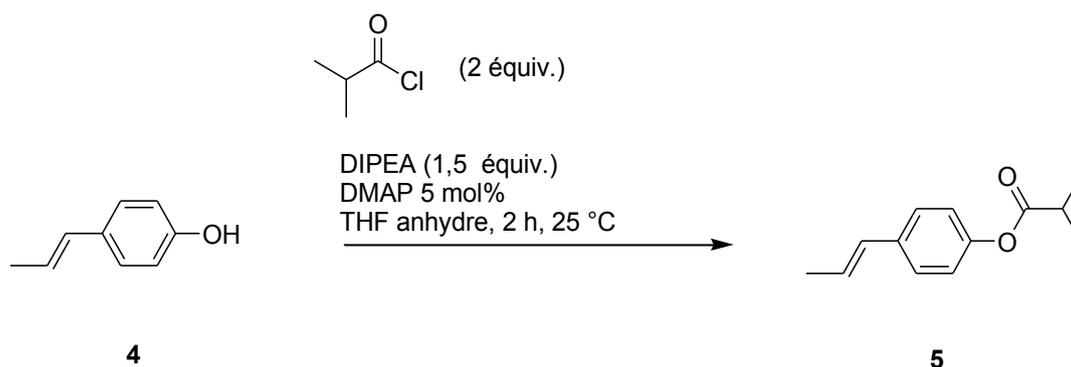


Schéma 19 : Schéma réactionnel de la réaction d'estérification

Sous un reflux d'azote (3x) de (4), (E) -4- (prop-1-én-1-yl) phénol (574 mg, 4,28 mmol, 1 équiv.), DIPEA (873 μ L, 5,1 mmol, 1,2 équiv.), du DMAP (25,65 mg, 0,21 mmol, 5 mol%), dans du THF anhydre (7 ml) a été ajouté et du chlorure d'isobutyryle (1,34 ml, 1,28 mmol, 3 équiv.). Le mélange a été agité à 25 ° C pendant 2 h. Ensuite, le THF a été éliminé par l'évaporation et la réaction brute a été extraite avec H₂O / Et₂O. La couche organique a ensuite été concentrée sous vide et purifiée sur une Chromatographie éclair en phase inverse sur une colonne C18 avec un gradient [95: 5: 0,1 - 5: 95: 0,1, 60 min] de H₂O / MeCN / acide formique. Nous avons rencontré un problème technique lors de la purification qui a conduits à une diminution du rendement à 2%. Le produit pur a été obtenu sous forme d'huile de manie de banane.

6-Activité biologique :

6.1. Activité antibactérienne :

Les huiles essentielles ont été testées sur cinq bactéries gram positive, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, et trois bactéries gram négative: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603. Toutes les bactéries proviennent de cathéters et sondes vésiculaires du service chirurgie du CHU de Tlemcen. L'identification des bactéries a été effectuée avec des bandes test APU 20 (Biomerieux). Toutes les souches ont été cultivées sur gélose Mueller-Hinton (MHA).

Les souches de référence ont été repiquées dans du bouillon nutritif puis sur gélose nutritive. L'inoculum a été préparé et calibrer à partir d'une culture jeune de 24 h dans du bouillon Muller-Hinton à 108 UFC/ml et 5. 105 UFC/ml respectivement.

4.1.a.Méthode par disque (ou diffusion sur gélose) :

La méthode de diffusion sur gélose a été mis en oeuvre selon le protocole décrit par (Khadir, Bendahou et al) et selon les recommandations de CLSI (CLSI. 2011) à partir des solutions mères. Pour les huiles essentielles, sur un disque de papier filtre Whatman stérile de 6 mm nous avons déposé un volume de 5µL pour les huiles essentielles. Les disques ainsi imprégnés sont déposés sur des boites de pétri contenant de la gélose Muller-Hinton ensemençer par les différents souches à tester. Des disques témoins et des disques d'antibiotiques (Gentamicine 15µg) ont également été disposés sur l'agar à titre de comparaison. Après incubation à 37°C ± 1°C pendant 18 à 24 h pour les bactéries, les diamètres des zones d'inhibitions ont été mesurés avec un compas.

6.1.b.Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI :

La CMI a été déterminée par la méthode de microdillution sur microplaque à 96 puits à fond rond selon le protocole de (Benbelaïd, Khadir et al); dix concentrations ont été préparées à partir des solutions mères de 80 mg/ml à 0,312 mg/ml. Dans la microplaque 180 µl de l'inoculum et de bouillon et 20 µl de chaque concentrations ont été déposé à l'intérieur de chaque puits engendrant des concentrations finales allant de 8 mg/ml jusqu'à 0,0312 mg/ml.

6.2. Activité herbicide :

6.2.1. Test anti germinatif :

La détermination des effets anti-germinatifs ont été effectués sur des graines de cresson (*Lepidium sativum*) sur des disques de cellulose dans des boîtes de Pétri selon [85] avec quelques modifications. 10 graines ont été placées sur chaque disque et trempées dans 2 ml de solution contenant les huiles essentielles. Une concentration finale de 0,1 et 0,01 mg / ml d'huile essentielle dans 1% de DMSO a été utilisée. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Les tests ont été effectués comme décrit précédemment. L'effet des traitements sur la germination et le taux de croissance a été évalué par le comptage périodique (toutes les 24 heures) du nombre de graines germées, ainsi qu'un comptage périodique de la longueur des tiges et des racines.

6.2.2. Test des thylakoïdes :

Préparation de la membrane thylakoïde

Les membranes thylakoïdes ont été isolées des feuilles d'épinards [*Spinacia oleracea L.*] selon les méthodes rapportées par (Rouillon et al. (1995)). 100 g de feuilles fraîches ont été lavées avec de l'eau distillée et homogénéisées dans 300 ml d'extrait de tampon. L'homogénat a été filtré à travers des tamis d'un diamètre de pore de 100 µm, puis centrifugé pendant 2 minutes à 3300 tr / min. Le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans la solution de rinçage et centrifugé pendant 1 minute à 3300 tr / min. Le culot a été remis en

suspension dans 1 ml d'eau distillée pour perturber les chloroplastes. Les membranes thylacoïdiennes obtenues ont été agitées pendant 10 secondes. Les membranes thylakoïdes ont ensuite été placées dans la solution de rinçage et centrifugées pendant 2 minutes à 3300 tr / min. Le culot a été remis en suspension dans le tampon d'immobilisation. La concentration de chlorophylle a été estimée. La préparation a été diluée à 2 mg de chlo / ml par le tampon d'immobilisation (manitol, acide 3-morpholinopropane-1-sulfonique, acide éthylène diamine tétra-acétique et albumine sérique bovine) et stockée dans de l'azote liquide.

Détermination de l'activité de la membrane thylakoïde

L'activité de la membrane thylakoïde a été estimée selon [87] avec plusieurs modifications. Les membranes des thylakoïdes ont été diluées à 30 ug de chlo / ml avec le tampon d'immobilisation. Les échantillons contenant 30 µl de solution de membrane thylakoïde ont été mélangés avec 20 µl de DMSO 37,5% (contrôle) ou une solution herbicide (atrazine 100 µM) ou avec une huile essentielle de 0,1, 0,05, 0,01 mg / ml, 100 µl de DPIP 0,3 mM dans 0,1 M MOPS (acide 3-morpholinopropane-1-sulfonique), à un pH de 6,5 dans les puits des microplaques de titrage. Les membranes thylakoïdes ont été préparées plus tôt et stockées dans des microplaques de titrage dans l'obscurité à 4°C. Les échantillons ont été éclairés pendant 20 min avec un OSRAM L 36 W / 865; La lampe SYLVANIA F 36 W / GRO - T8 et l'absorbance a été mesurée à 530 nm en utilisant le lecteur Thermo Scientific Varioskan LUX. Les absorbances initiales et finales pour chaque puits ont été enregistrées. L'activité des préparations de membranes des thylakoïdes a été calculée à partir des données sur la quantité de DPIP réduite, la concentration de chlorophylle et le temps d'éclairage, et exprimée en µmol DPIP / mg / chl / h.

6.2.3. Essais de croissance :

Pour une croissance optimale de la levée des graines, la bonne proportion de compost et de terre doit être mélangée: 1/3 de compost et 2/3 de terre. Le sol a été mis dans des pots (40

g), et pour garder le sol humide, 15 ml d'eau du robinet ont été ajoutés à chaque boîte. Des rangées de graines de *L. sativum* ont été ajoutées à chaque pot, avec 3 graines par rang et un total de 3 rangées (9 graines) par pot. Des huiles essentielles et des composés majoritaires à une concentration de 82,8 mg / 100 ml d'eau avec 0,35% de DMSOTween ont été utilisés comme composés d'essai et de contrôle. La sulcotrione a servi de témoin positif, tandis que l'eau avec 0,35% de DMSOTween a servi de témoin négatif. 1 ml de chaque solution a été pulvérisé dans chacun des pots. Le test a été réalisé en triple. Des observations ont été faites quotidiennement.

6.3. Activité écotoxicologie :

Préparation des larves d'*Artemia* (48h avant le test)

Les larves d'*Artemia salina* ont été lyophilisées dans une boîte de Pétri contenant de l'eau de mer préparée à partir de sel marin synthétique (3,5 g dans 100 ml d'eau distillée). Un couvercle recouvert de papier d'aluminium a été placé sur la moitié de la boîte qui a ensuite été placée sous une lampe pendant 48 heures. Après l'éclosion, les larves se sont naturellement déplacées vers la zone éclairée de la boîte.

Essai

Le test a été réalisé sur des microplaques de 96 puits selon la méthode rapportée par [85]. Un test préliminaire a été effectué avec une large gamme de concentrations (100, 500 et 1000 ppm) pour déterminer la gamme de concentration optimale (résultats non présentés). Selon ce test préliminaire, un test secondaire a été réalisé avec une large gamme de concentrations (5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 mg / ml) de chaque huile / composé afin d'estimer la IC₅₀. Chaque concentration a été testée en triple. Dans chaque puits, nous avons placé 2 µl d'huile, 198 µl d'eau de mer contenant 10 crevettes. Les contrôles ont été effectués en déposant 100% d'eau de mer contenant 1% de solvant de solubilité (DMSO). Après 24 et 48 heures, le nombre de crevettes mortes a été déterminé par l'observation binoculaire de la mobilité des crevettes.

6.4. Activité antibactérienne contre les phytopathogènes :

Souche bactérienne

L'activité antibactérienne a été testée in vitro contre *Pectobacterium atrosepticum* (souche CFBP-5384) et *Pseudomonas cichorii* (souche CFBP 4407) fournies par les Stock Culture Collections of Phytopathogenic Bacteria (CFBP, INRA Angers, France). Les bactéries ont été maintenues pendant des périodes prolongées sous forme de cultures surgelées (-20°C) et cultivées sur milieu King B Agar à 25°C pendant 48 h. La souche a été cultivée dans un milieu nutritif liquide à base d'eau peptonée (WPN) à 25°C pendant une nuit pour être utilisée dans le test d'activité antibactérienne.

Activité antibactérienne contre les phytopathogènes

Le dosage biologique sur microplaque (micro-dilution) a été utilisé pour étudier les activités antimicrobiennes de *P. atrosepticum* et *P. Cichorii* selon la méthode rapportée par [79]. L'huile essentielle dissoute dans du diméthylsulfoxyde aqueux (DMSO) à une concentration de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 et 0,312 mg / ml a été ensachée dans des plaques stériles à 96 puits sur la base d'une méthode du National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS).

La suspension bactérienne a été ajustée avec de l'eau distillée stérile à une concentration de 2,105 ufc / ml. En bref, des plaques à 96 puits ont été préparées en distribuant 198 µl de suspension de micro-organismes dans chaque puits. Ensuite, 2 µL de leurs dilutions en série d'extraits ont été transférés dans cinq puits consécutifs. Le dernier puits contenant 198 µL de milieu WPN et 2 µL des dilutions en série d'extraits a été utilisé comme contrôle négatif. Le volume final dans chaque puits était de 200 µL. La plaque a été recouverte d'un scellant à plaque stérile puis incubée à 25°C pendant 48 h. Après agitation, la croissance des micro-organismes a été estimée en lisant l'absorbance dans les puits de microplaques à 600 nm avec un lecteur de microplaques (lecteur Thermo Scientific Varioskan LUX). Nous avons utilisé du

chloramphénicol à une concentration de 10 µg / ml comme contrôle positif. L'inhibition de la croissance bactérienne a été mesurée après 24 heures d'incubation à 23°C à l'aide d'un pied à coulisse numérique qui a permis de calculer l'inhibition de la croissance avec la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = [(DO_{\text{control}} - DO_{\text{extract}}) / DO_{\text{control}}] \times 100$$

6.5. Activité antifongique :

Souches fongiques

Botrytis cinerea, *Fusarium graminearum*, *Zymoseptoria tritici* et *Penicillium expansum* (IP 1854.89; MAT REF 04-14-02-02; CBS 398.52 et IP 1350.82) ont été cultivés sur milieu gélose au malt et incubés à 23°C dans l'obscurité.

Activité antifongique par méthode de contact

L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée en fonction de leur capacité à inhiber la croissance mycélienne [82]. 10µl d'huiles essentielles ont été déposées sur un disque de cellulose. Ce dernier a été placé au milieu de la gélose dans une boîte de Pétri. Un tampon mycélien de 3 mm de diamètre de chaque pathogène d'une culture âgée de 7 jours a été placé au centre de la gélose. Le contrôle négatif (disque de cellulose sans huile essentielle) et le contrôle positif (une solution à 10 ppm de tébuconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a été préparée de la même manière. Chaque traitement a été appliqué sur La croissance radiale du mycélium a été mesurée après 1 à 6 jours d'incubation à 23°C à l'aide d'un pied à coulisse numérique qui a permis de calculer l'indice avec la formule suivante:

$$\text{Indice antifongique (\%)} = (1 - D_a / D_b) \times 100$$

Où D_a est le diamètre de la zone de croissance dans la plaque expérimentale (cm) et D_b est le diamètre de la zone de croissance dans la plaque témoin (cm)

Activité antifongique fumigante

Les huiles essentielles ont été évaluées pour l'activité antifongique fumigante en fonction de leur capacité à inhiber la croissance mycélienne selon [81]. Des bouchons mycéliens de six millimètres de diamètre pour chaque souche fongique d'une culture âgée de 7 jours ont été placés dans une boîte de Pétri. Les huiles essentielles ont été introduites sur un disque de cellulose de 6 mm et placées sur le couvercle de la boîte de Petri. Les souches antifongiques utilisées dans cette méthode sont les mêmes que celles utilisées dans la méthode précédente. Un contrôle négatif (disque de cellulose sans huile essentielle) a été réalisé de la même manière. Les boîtes de Petri ont ensuite été scellées avec du parafilm et incubées à 23°C dans l'obscurité. La croissance radiale mycélienne a été mesurée après 3 à 7 jours d'incubation, et l'indice antifongique a été calculé avec la formule suivante:

$$\text{Indice antifongique (\%)} = (1 - Da / Db) \times 100$$

6.6. Activité insecticide :

Les tests de l'activité insecticide ont été réalisés à l'institut de Ciencias Agrarias à Madrid, Espagne sous la direction de Pr Azucena Gonzalez coloma et son équipe. Nous avons procédé à deux activités :

Essai biologique nématocide

Une population de *Meloidogyne javanica* a été maintenue sur des plantes de *Lycopersicon esculentum* (var. *Marmande*) dans des cultures en pot à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% d'humidité relative. Des masses d'œufs de *M. javanica* ont été cueillies à la main à partir des racines de tomates infectées. Des juvéniles de deuxième stade (J2) ont été obtenus à partir d'œufs éclos en incubant des masses d'œufs dans une suspension aqueuse à 25°C pendant 24 h. Les huiles essentielles ont été dissous dans de l'eau distillée contenant 5% d'une solution de DMSO/Tween (0,6% de Tween 20 dans du DMSO) et évalués comme décrit par (Andrés et al.2012). La concentration initiale testée était de 1 mg / ml. Huit concentrations d'huile

essentielle et deux composés purs ont été testés et quatre réplicats ont été utilisés dans chaque concentration. Les données sont présentées en pourcentage de mort J2 corrigé selon la formule de Schneider-Orelli (Schneider-Orelli, 1947). Les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse statistique Statgraphics (Centurion XVIII) en utilisant la méthode statistique d'analyse Probit. Les valeurs des doses létales efficaces (CL₅₀) (avec des limites de confiance à 95%) ont été calculées.

Essai biologique d'insectes

Des colonies d'insectes de *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* et *Leptinotarsa decemlineata* ont été élevées avec un régime artificiel, des plants de poivron (*Capsicum annuum*) et de pomme de terre (*Solanum tuberosum*), et maintenu à 22 ± 1°C, > 70% d'humidité relative avec une photopériode de 16: 8 h (L: D) dans une chambre de croissance. Des essais biologiques ont été menés avec des larves de sixième stade de *S. littoralis* nouvellement émergées (10 répétitions avec 2 insectes chacune) et des adultes de *L. decemlineata* (10 répétitions avec 2 insectes chacun) et *M. persicae* (20 répétitions avec 10 insectes chacune). L'inhibition de l'alimentation ou de la décantation (% FI ou % SI) a été calculée comme suite :

$$FI = [1 - (T / C)] \times 100,$$

Où T et C sont la consommation de disques feuilles traités et témoins, respectivement,

$$\text{Ou comme } SI = [1 - 10 (\% T / \% C)] \times 100$$

Où % C et % T sont des pourcentages de pucerons installés sur les disques foliaires témoins et traités, respectivement, comme décrit (Navarro-Rocha et al 2018).

Les effets anti-médicamenteux (FI / SI) ont été analysés pour leur signification par le test non paramétrique du rang signé de Wilcoxon. Les valeurs EC₅₀ (dose efficace pour obtenir 50% d'inhibition de l'alimentation) ont été déterminées pour les OE avec des valeurs FI / SI > 70% à partir d'une analyse de régression linéaire.

6.7. Activité molluscicide :

Animaux expérimentaux.

B. glabrata originaire de Recife de Brésil (BgBRE2) a été utilisé pour cette étude. Ces escargots ont été maintenus dans des chambres d'élevage à 26°C, 12/12 h période claire / sombre et nourris avec de la laitue fraîche. Une souche portoricaine (NMRI) de *S. mansoni* a été utilisée dans cette étude pour déterminer les effets du molluscicide sur la sensibilité des escargots infectés et la compatibilité hôte-parasite.

Essais biologiques molluscicides.

Des tests biologiques contre l'escargot *B. glabrata* ont été effectués à la suite de la phase I des stades d'évaluation des méthodes molluscicides recommandées par l'OMS. En bref, 12 escargots d'un diamètre de coquille de 6 à 8 mm ont été exposés individuellement à différentes concentrations d'huile essentielle ou de DMSO utilisées comme témoin. Tous les escargots ont été immergés pendant 24 heures, puis lavés et transférés dans des réservoirs remplis d'eau de forage. Les escargots ont été nourris avec de la laitue fraîche pendant la période d'observation (48 heures). Chaque escargot a été observé au microscope binoculaire pour apprécier les mouvements cardiaques. Aucune différence de mortalité n'a été trouvée entre les différentes périodes de récupération, 24 ou 48 heures. Pour déterminer la concentration létale CL_{50} , l'analyse Probit a été utilisée à partir des 3 expériences indépendantes réalisées avec les différentes huiles essentielles d'*E. triquetrum*.

En ce qui concerne les essais sur des escargots infectés, chaque escargot a été exposé à 5 miracidia de la souche NMRI de *S. mansoni*. La récupération de Miracidia et l'infestation d'escargots ont été menées selon les procédures décrites dans les références. Leur statut de parasite a été contrôlé par l'observation directe de sporoscytes filles à travers la coquille d'escargots exposés. Après 15 jours d'exposition au parasite, 20 à 30 escargots infectés ont été soumis à différentes doses d'huile essentielle d'*E. Triquetrum* pour comparer leur sensibilité

toxique avec des escargots non infectés. Cette expérience a été répétée trois fois à différents moments par différents expérimentateurs.

Propriétés miracidiacides et cercariacides de l'huile essentielle d'*Eryngium triquetrum*.

Des miracidia provenant de la souche NMRI ont éclos à partir d'œufs récupérés à partir de foies des hamsters après 50 jours après l'infestation. Les œufs ont été filtrés et lavés pour obtenir des miracidies recueillies sous éclairage. Environ 300 miracidies fraîchement éclos ont été utilisées pour tester la toxicité de l'huile essentielle d'*E. Triquetrum*. Le comportement de nage et la mortalité ont été étudiés après 1 et 4 heures de traitements. Toutes les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope Zeiss LSM et d'un microscope stéréoscopique. Des *B. glabrata* infectés (BgBre2) ont été exposés à la lumière artificielle pour induire une émission cercarienne. Une centaine de cercaires ont été collectées et exposées à différentes concentrations d'huile essentielle. Les cercaires immobiles ont été considérées comme mortes.

Impact du composant actif dérivé d'*Eryngium triquetrum* sur la compatibilité avec *S. mansoni* / *Biomphalaria*.

Les miracidies fraîchement éclos ont été récupérées et exposées à 0,5 ou 0,1 ppm d'huile essentielle pendant 30 minutes. Ensuite, chaque miracidia a été collecté individuellement pour être placé avec un seul escargot dans 5 ml d'eau déchlorée. Pour chaque condition, 42 escargots ont été exposés individuellement à 1 miracidia traité ou non à l'huile essentielle. La prévalence a été déterminée pour chaque condition 40 jours après l'infestation.

Toxicité de l'huile essentielle d'*Eryngium triquetrum* sur les embryons de *Biomphalaria*.

La toxicité de l'huile essentielle a été évaluée par rapport aux masses d'œufs exposées pendant 24 heures à trois concentrations (1, 0,5 et 0,1 ppm). Le développement embryonnaire des escargots dans les masses d'œufs a été suivi pendant 20 jours au microscope binoculaire après l'éclosion des œufs. Des feuilles de polystyrène ont servi de substrat pour la ponte. Les masses d'œufs ont été recueillies doucement pour éviter de les endommager et maintenues

dans des boîtes de Petri avec de l'eau Volvic. 24 heures après l'exposition, les masses d'œufs ont été lavées avec de l'eau Volvic et placées dans une plaque de culture cellulaire (Sarstedt). Aucune sélection de masses d'œufs n'a été effectuée selon le stade de développement. La présence de tous les stades embryonnaires (blastula, gastrula, trochophore, veliger et hippo stage) a été vérifiée. Ce test de toxicité a été effectué deux fois sur plus de 25 masses d'œufs.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] S. Sutour. « Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats ». *Thèse de doctorat en chimie organique et analytique, faculté de science de Corse*. 222 p, **2010**.
- [2] F. A. Benomari. « Variabilité chimique et activités biologiques des volatils des espèces aromatiques à intérêt économique des genres mentha, inula, thymus, astericus et chrysanthemum de l'ouest algérien. » Thèse de doctorat. Université de Tlemcen, Algérie. **2018**
- [3] R. Deschepper. « Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie » Thèse de doctorat. Université de pharmacie de Marseille. **2017**.
- [4] B. Nabila. « Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachrys libanotis* L ». *Thèse de doctorat en chimie organique, faculté des sciences de Constantine*. 208 P, **2013**.
- [5] Paloma Filliat. « Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs ». *Thèse de doctorat en pharmacie, faculté de pharmacie de Grenoble*. 129P, **2012**
- [6] A-K. borg-karlson, I. Valterova, L. A. Nilsson. « volatile compounds from flowers of six species in the family apiaceae: bouquets for different pollinators ». *Phytochemistry*, 35, 111-119, **1994**
- [7] G. Benellia, R. Pavela, R. Iannarelli, R. Petrelli, L. Cappellacci, K. Cianfaglione, F. H. Afsharf, M. Nicoletti, A. Canale, F. Maggi. « Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: Larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say ». *Industrial Crops and Products*. 96, 186-195, **2017**.
- [8] E. Koziół, F. S. Senol Deniz, I. E. Orhan, L. Marcourt, B. Budzyńska, J-L. Wolfender, A. D. Crawford, K. S. Woźniak. « High-performance counter-current chromatography isolation and initial neuroactivity characterization of furanocoumarin derivatives from *Peucedanum alsaticum* L. (Apiaceae) ». *Phytomedicine*. 57, 259-264, **2019**.
- [9] G. Benelli, R. Pavela, A. Canale, M. Nicoletti, R. Petrelli, L. Cappellacci, R. Galassi, F. Maggi. « Isofuranodiene and germacrene from *Smyrniololus* essential oil as acaricides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae*: impact of chemical stabilization of isofuranodiene by interaction with silver triflate ». *Pest Science*. 90, 693-699, **2016**
- [10] R. Pavela, L. Pavoni, G. Bonacucina, M. Cespi, N. G. Kavallieratos, L. Cappellacci, R. Petrelli, F. Maggi, G. Benelli. « Rationale for developing novel mosquito larvicides based on isofuranodiene microemulsions ». *Journal of Pest Science*, 1-13. **2019**

- [11] A. Brunetti, O. Marinelli, M. B. Morelli, R. Iannarelli, C. Amantini, D. Russotti, G. Santoni, F. Maggi, M. Nabissi. « Isofuranodiene synergizes with Temozolomide in inducing glioma cells death ». *Phytomedicine*. 1-24, **2018**.
- [12] A. Rosato, F. Maggi, K. Cianfaglione, F. Conti, G. Ciaschetti, R. Rakotosaona, G. Fracchiolla, M. L. Clodoveo, C. Franchini, F. Corbo. “Chemical composition and antibacterial activity of seven uncommon essential oils ». *Journal of Essential Oil Research*. 31, 1-11, **2018**.
- [13] R. Petrelli, F. Ranjbarian, S. Dall’Acqua, F. Papa, R. Iannarelli, S. L. Ngahang Kamte, S. Vittori, G. Benelli, F. Maggi, A. Hofer, L. Cappellacci. « An overlooked horticultural crop, *Smyrniium olusatrum*, as a potential source of compounds effective against African trypanosomiasis”. *Parasitology International*. 1-27, **2017**
- [14] G. Tsasi, M. Soković, A. Cirić, E. Eriotou, E. Sakadani, Y. Samaras, H. Skaltsa. “Antifungal Compounds Isolated from *Smyrniium olusatrum* L. Essential Oil, Growing Wild in Cephalonia, Greece. Chemical Analysis and Structure Elucidation ». *Records of natural products*. 10, 93-102, **2016**
- [15] A. M. Mustafa, F. Maggi, F. Papa, E. Kaya, M. Dikmen, Y. Öztürk. “Isofuranodiene: A neurotogenic compound isolated from wild celery (*Smyrniium olusatrum* L., Apiaceae)”. *Food Chemistry*. 192, 782-787, **2016**
- [16] M. Cespi, L. Quassinti, D. R. Perinelli, M. Bramucci, R. Iannarelli, F. Papa, M. Ricciutelli, G. Bonacucina, G. F. Palmieri, F. Maggi. « Microemulsions enhance the shelf-life and processability of *Smyrniium olusatrum* L. essential oil”. *Flavour and Fragrance Journal*. 34, 159-164, **2016**.
- [17] W. Li, J. Shi, F. Papa, F. Maggi, X. Chen. « Isofuranodiene, the main volatile constituent of wild celery (*Smyrniium olusatrum* L.), protects d-galactosamin/ lipopolysacchride-induced liver injury in rats”. *Natural Product Research*. 33, 1-4, **2015**.
- [18] L. Quassinti, F. Maggi, L. Barboni, M. Ricciutelli, M. Cortese, F. Papa, C. Garulli, C. Kalogris, S. Vittori, M. Bramucci. « Wild celery (*Smyrniium olusatrum* L.) oil and isofuranodiene induce apoptosis in human colon carcinoma cells”. *Fitoterapia*. 97, 133-141, **2014**.
- [19] M. Buccioni, D. Dal Ben, C. Lambertucci, F. Maggi, F. Papa, A. Thomas, C. Santinelli, G. Marucci. « Antiproliferative Evaluation of Isofuranodiene on Breast and Prostate Cancer Cell Lines”. *The Scientific World Journal*. 1-6, **2014**.
- [20] F. Maggi, F. Papa, C. Giuliani, L. M. Bini, A. Venditti, A. Bianco, M. Nicoletti, R. Iannarelli, G. Caprioli, G. Sagratini, M. Cortese, M. Ricciutelli, S. Vittoria. « Essential oil chemotypification and secretory structures of the neglected vegetable *Smyrniium olusatrum* L. (Apiaceae) growing in central Italy”. *Flavour and Fragrance Journal*. 34, 1-21, **2014**.

- [21] T. Houachri, D. Bolonio, A. Llamas, J. R-Fernández, M. E. Gazza, M. Mittelbach, M. Lapuerta, L. Canoira. “Fatty acid methyl esters (FAME) from oleaginous seeds grown in arid lands. Part II: *Ibicella lutea*, *Onopordum nervosum*, *Peganum harmala*, *Smyrnum olusatrum* and *Solanum elaeagnifolium*”. *Energy sources*. 1-8, **2018**.
- [22] G. Caprioli, D. Fiorini, F. Maggi, M. Marangoni, F. Papa, S. Vittori, G. Sagratini. « Ascorbic acid content, fatty acid composition and nutritional value of the neglected vegetable Alexanders (*Smyrnum olusatrum* L., Apiaceae)”. *Food composition and analysis*. 51, 1-22, **2014**
- [23] M. Khoury, M. E. Beyrouthy, V. Eparvier, N. Ouaini, D. Stien. “Chemical diversity and antimicrobial activity of the essential oils of four Apiaceae species growing wild in Lebanon”. *Journal of Essential Oil Research*. 31, 1-7. **2017**.
- [24] W.Youdi; L.Jiahong; G.Jiquan ;,W.Qiyou; Z.Shuguang; G.Siyuan; Y.Chen; W.Junye; Z.Linquan. « Cytotoxic and Antitumor Effects of Curzerene from *Curcuma longa* ». *Planta Medicavol*. Vol. 83. p. 23 – 29. 2017
- [25] G.Marimuthu; R.Mohan; S.Sengamalai; V.Periasamy; A.Naiyf; K.Shine; K.Jamal.; B.Giovanni. «Curzerene, trans- β -elemenone, and γ -elemene as effective larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus*: toxicity on non-target aquatic predators ». *Environmental Science and Pollution Research*. Vol.25. P.10272-10282. **2018**
- [26] A.Mohammad; K.Aidy; A.Asadollahi. « Protective effects of smyrnium cordifolium boiss essential oil on pentylenetetrazol-induced seizures in mice: Involvement of benzodiazepine and opioid antagonists ». *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*vol. Vol.31. p. 683 – 689. **2017**
- [27] M. A. Dib, N. Djabou, J-M. Desjobert, H. Allali, B. Tabti, A. Muselli, J. Costa. « Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation ». *Chemistry Central Journal*. 4, 16, **2010**.
- [28] D-A. LANFRANCHI, H. LAOUER, M. KOLLI, S. PRADO, C. MAULAY-BAILLY, N. BALDOVINI. “Bioactive Phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria”. *J. Agric. Food Chem*. 58, 2174–2179, **2010**.
- [29] F. Jamila, E. Mostafa. « Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments”. *Journal of Ethnopharmacology*. 12, **2014**
- [30] S. Bouayad Alam, N. Gaouar Benyelles, M. El Amine Dib, N. Djabou, L. Tabtil, J. Paolini, A. Muselli, J. Costa. « Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western

- Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)”. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 87, 56 – 61, **2014**
- [31] A. Bendiabdellah, M. El Amine Dib, N. Meliani, A. Muselli, N. Djabou, B. Tabti, J. Costa. “Antibacterial Activity of *Daucus crinitus* Essential Oils along the Vegetative Life of the Plant”. *Journal of Chemistry*, 7, **2013**
- [32] M. A. Abdoune, F. Benbelaïd, A. Khadir, M. Bendahou. “Evaluation of antimicrobial activity of solvent extracts from different parts of *Daucus crinitus* Desf.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 11, 117-121, **2013**
- [33] A. Bendiabdellah, M. El. A. Dib, N. Meliani, N. Djabou, H. Allali, B. Tabti. “Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus crinitus* Desf., from Algeria”. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 07; 92-95, **2012**
- [34] M. A. Dib, M. Bendahou, A. Bendiabdellah, N. Djabou, H. Allali, B. Tabti, J. Paolini, J. Costa. « Partial chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus crinitus* Desf. extracts. *GRASAS Y ACEITES*. 61, 271-278, **2010**
- [35] F. Bouzergoune, M. L. Ciavatta, F. Bitam, M. Carbone, M. C. Aberkane, M. Gavagnin. « Phytochemical Study of *Eryngium triquetrum*: Isolation of Polyacetylenes and Lignans”. *Planta Med.* 82, 1438–1445, **2016**
- [36] S. Casigliaa, M. Brunoa, S. Rossellia, F. Senatoreb. “Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Flowers of *Eryngium triquetrum* (Apiaceae) Collected Wild in Sicily”. *Natural Product Communications*. 11, 1019-1024, **2016**
- [37] A. Khalfallah, D. Berrehal, A. Kabouche, A. Karioti, A-R. Bilia, Z. Kabouche. “FLAVONOIDS, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *Eryngium triquetrum* ». *Chemistry of Natural Compounds*. 50, 130-132, **2014**
- [38] S. A. Erdem, S. F. Nabavi, I. Erdogan Orhan, M. Daglia, M. Izadi, S. M. Nabavi. “Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23, 1-22, **2015**
- [39] A. Medbouhi. “Recherche de nouveaux principes actifs issus des espèces du genre *Eryngium* de l’Ouest Algérien ». *Thèse de doctorat en chimie organique et analytique*. Faculté des sciences, Tlemcen. 165 p, **2018**
- [40] A. Medbouhi, N. Merad, A. Khadir, M. Bendahou, N. Djabou, A. Muselli, J. Costa. “Chemical Composition and Biological Investigations of *Eryngium triquetrum* Essential Oil from Algeria”. *Chem. Biodivers.*, vol. 15, no 1, **2018**

- [41] E-M. Pferschy-Wenzig, V. Getzinger, O. Kunert, K. Woelkart, J. Zahrl, R. Bauer. “Determination of falcarinol in carrot (*Daucus carota* L.) genotypes using liquid chromatography/mass spectrometry ». *Food Chemistry*. 114 1083–1090, **2009**
- [42] L. P. Christensen. “Aliphatic C17-Polyacetylenes of the Falcarinol Type as Potential Health Promoting Compounds in Food Plants of the Apiaceae Family”. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 3, 64-77, **2011**
- [43] P. T. Okoli, V. C. Nzute, O. A. Durojaye, O. H. Chielo, Q. C. Ajibo, S. I. Udo, S. Munachiso Ezeh. « An *In-silico* Pharmacokinetics Study on Cis- Heptadeca-1,9-Diene-4,6-Diyne-3,8-Diol: A Nutraceutical Compound with Anticancer Properties”. *Asian Food Science Journal*. 3, 1-7, **2019**
- [44] S. S. C. Cheung, D. Hasman, D. Khelifi, J. Tai, S. Garth, L. Warnock. “ Devil’s Club Falcarinol-Type Polyacetylenes Inhibit Pancreatic Cancer Cell Proliferation”. *NUTRITION AND CANCER*. 1-12, **2018**.
- [45] M. Kobaek-Larsen , G. Baatrup, M. K. Notabi, R. Bahij El-Houri, E. Pipó-Ollé, E. Christensen Arnspang, L. Porskjær Christensen. “Dietary Polyacetylenic Oxylipins Falcarinol and Falcarindiol Prevent Inflammation and Colorectal Neoplastic Transformation: A Mechanistic and Dose-Response Study in A Rat Model”. *Nutrients*, 11, 1-14, **2019**.
- [46] K. Tan, D. P. Killeen, Y. Li, J. W. Paxton, N. P. Birch, A. Scheepens. “Dietary polyacetylenes of the falcarinol type are inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)”. *European Journal of Pharmacology*. 1-7, **2013**.
- [47] T. Ahmad, S. Binger, K. Brandt. “ Changes in contents of polyacetylenes and carotenoids in carrots kept at different temperatures after harvest”. *Proceedings of the Nutrition Society*. 70, **2011**.
- [48] H. Saleh, H. Garti, M. Carroll, K. Brandt. “Effect of carrot feeding to APCMin mouse on intestinal tumours”. 72 (OCE4), E183, **2013**
- [49] N. P. McLaughlin , E. Butler , P. Evans, N. P. Brunton , A. Koidis, D. K. Rai. “A short synthesis of (b) and ()-falcarinol”. *Tetrahedron* 66, 9681-9687, **2010**
- [50] H. Larqué-García, L. W. Torres-Tapia, M. Vera-Ku, R, Gamboa-León, S. Novelo-Castilla, T. I. Coral-Martínez, S. R. Peraza-Sánchez. “Quantitative seasonal variation of the falcarinol-type polyacetylene (3S)-16,17-didehydrofalcarinol and its spatial tissue distribution in *Tridax procumbens*”. *Photochemical analysis*, 0-9, **2019**
- [51] S. PURUP, E. LARSEN, L. P. CHRISTENSEN. “Differential Effects of Falcarinol and Related Aliphatic C17-Polyacetylenes on Intestinal Cell Proliferation”. *Agricultural and Food chemistry*. 57, 8290-8296, **2009**.

- [52] L Hinds, O Kenny, M B Hossain, D Walsh, E Sheehy, P Evans², M Gaffney, D K Rai, « Evaluating the Antibacterial Properties of Polyacetylene and Glucosinolate Compounds with Further Identification of Their Presence within Various Carrot (*Daucus carota*) and Broccoli (*Brassica oleracea*) Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector and Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analyses”. *J Agric Food Chem.* 33, 44, **2017**
- [53] A. Schinkovitz, M. Stavri, S. Gibbons. « Antimycobacterial polyacetylenes from *Levisticum officinale*”, *Phytotherapy Research*, 22(5):681-4. **2008**
- [54] Y. Yan-Qing, Li. Shuo-Ning , Z. Jiang-Chun, Y. Zhou, Z. Hao-Zhe, D. Hong-Jie, B. Qing-Hua, M. Wang. “Total synthesis of each enantiomer of falcarinol and panaxjapyne A via asymmetric catalytic alkynylation of an aldehyde”. *Tetrahedron: Asymmetry.* 26,361–366, **2015**
- [55] N. P. McLaughlin^a, E. Butler, P. Evans, N. P. Brunton, A. Koidis, D. K. Rai” A short synthesis of (+) and (-)-falcarinol”. *Tetrahedron*, 66, P 9681–9687, **2010**
- [56] S. F. Mayer, A. Steinreiber, R. V. A. Orru, K. Faber. “Chemoenzymatic Asymmetric Total Syntheses of Antitumor Agents (3*R*,9*R*,10*R*)- and (3*S*,9*R*,10*R*)-Panaxytriol and (*R*)- and (*S*)-Falcarinol from *Panax ginseng* Using an Enantioconvergent Enzyme-Triggered Cascade Reaction”. *J. Org. Chem.*, 67, pp 9115–9121, **2002**
- [57] A. L. K. Shi Shun, R. R. Tykwinsk. “Synthesis of Naturally Occurring Polyynes” *Angewandte Chemie International Edition*, 10, **2006**
- [58] H. Yun ,C. Ting-Chao , D. Huajin , Y. Tian ,L. Yue-ming , S. J. Danishefsky. “Total Synthesis as a Resource in Drug Discovery: The First In Vivo Evaluation of Panaxytriol and Its Derivatives”. *J. Org. Chem*, 70 , pp 10375–10380, **2005**
- [59] H. Yun, S. J. Danishefsky.” Straightforward Synthesis of Panaxytriol: An Active Component of Red Ginseng”. *J. Org. Chem*, 68, pp 4519–4522, **2003**
- [60] K. Hüsnu Can Baser, Gerhard Buchbauer. “Handbook of essential oils : science, technology, and applications”. Boca Raton London New York. 994 P. **2010**.
- [61] F. Darriet. « Caract_erisation de nouvelles mol_ecules et variabilit_e chimique de trois plantes du continuum Corse-Sardaigne: Chamaemelum mixtum, Anthemis maritima et Eryngium maritimum ». Thèse de doctorat. Université de Corse, France. **2011**.
- [62] E. M. Walker; M. J. Saraste; N. J. Gay. “Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold”. *Journal of embo.* 8 , 945-951, **1982**.

- [63] B. Jacques ; R. André. « Biochimie métabolique ». *Ed ellipses .Paris.*, 217-219-220-223-225, **2004**.
- [64] M. Martinez-Cayuella. “Oxygen free radicals and human disease”. *Biochem.* 77, 147-161, **1995**
- [65] B. Aurousseau. « Les radicaux libres dans l’organisme des animaux d’élevage :conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits ». *Inra Prod. Anim.* 15, 67-82, **2002**
- [66] M. Valko ; C. J. Rhodes ; J. Moncol ; M. Izakovic ; M. Mazur. “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer”. *Chem. Biol Interact.* 160, 1–40, **2006**.
- [67] O. I. Aruoma. “Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease”. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 75, 199–212, **1998**
- [68] A. R. Smith; S. V. Shenvi; M. Widlansky; J. H. Suh; T. M. Hagen. “Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress”. *Curr. Med. Chem.* 11, 1135–1146, **2004**
- [69] J. L. Bolton; M. A. Trush; T. M. Penning; G. Dryhurst; T. J. Monks. “Role of quinones in toxicology”. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 135, **2000**
- [70] S. S. Ali; N. Kasoju; A. Luthra; A. Singh; H. Sharanabasava; A. Sahu; U. Bora. “Indian medicinal herbs as sources of antioxidants”. *Food Res Int.* 41, 1–15, **2008**.
- [71] P. J ha; M. Flather; E. Lonn; M. Farkouh; S. Yusuf. “The antioxidant vitamins and cardiovascular disease”. *A critical review of epidemiologic and clinical trial data. Ann. Intern Med.* 123-860, **1995**.
- [72] C. H. Zoubeydi. « Etude des antioxydants dans le Rosmarinus officinalis ». *Labiatae*,7, 167-275 , **2004**.
- [73] L. Unten; M. Koketsu; M. Kim. “Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agr. Food. Chem.* 45, 2009-2019, **1997**
- [74] A. Bougatef; M. Hajji; I. Lassoued; Y. Triki Ellouz; M. Nasri. “Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases”. *Food Chem.* 114, 1198-1205, **2009**.
- [75] C. Bonnaillie; M. Salacs; E. Vassiliova. « Etude de l’extraction de composés phénoliques à partir de pélicules d’arachide ». *Génie industriel* 7, 35-45, **2012**
- [76] N. Pellegrini ; M. Serafini ; B. Colombi. « Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays». *J Nutr.* 133, 2812-2819, **2003**
- [77] S. Phipps; M. Sharaf; V. Butterweck. “Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements”. *Pharmacopeial Forum.* 33, 810-814, **2007**.

- [78] Z. mohammedi. « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïde de quelques plantes de la région de Tlemcen ». Mémoire de magister. Université de Tlemcen. **2006**.
- [79] S. Meziani, B.D. Oomah , F. Zaidi , A. Simon-Levert , C. Bertrand e, R. Zaidi-Yahiaoui. « Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum* ». *Microbial Pathogenesis*, 78. 95-102, **2015**
- [80] M. Delisle-Houde, R.J. Tweddell. “Antibacterial activity against *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas chichori* of different plant extracts prepared from horticultural and forest species”. *Phytoprotection*, 99, 1-29, **2019**.
- [81] F. Z. Benomari. V. Andreu, J. Kotarba, M. E. A. Dib, C. Bertrand, A. Muselli, J. Costa, N, Djabou. « Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains”. *Environ Sci Pollut Res*, 1-12, **2017**.
- [82] V. Andreu, A. Levert, A. Amiot, A. Cousin, N. Aveline, C. Bertrand. « Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming”. *Environmental Science and Pollution Research*. 1-14. **2018**
- [83] J. Tanouss. « Patuline, mycotoxine de *penicillium expansum*, principal pathogene post-recol des pommes ». thèse de doctorat en pathologie, toxicologie et nutrition. Institut national polytechnique de Toulouse. 208 P, **2015**
- [84] Thiebeauld de la Crouee. « USE OF A CELLULAR EXTRACT OF ONE OR MORE MICROALGAE OF THE AMPHIDIUM GENUS , FOR ITS FUNGICIDAL AND / OR BACTERICIDAL ACTIVITY ON FUNGI , OOMYCETES AND / OR PATHOGENIC BACTERIA OF PLANTS AND CULTURE SEEDS”. *Patent Application Publication Jun* . 13 , 2 -10, **2019**
- [85] T. N. Füller, C. Bertrand, B. Antonello, C. Wesp, I.B. I. de Barros, J. F. Barbosa Neto. « Chemical diversity of wild populations of *Elionurus muticus* (Spreng.) and the allelopathic effect of its essential oil ». *Journal of Essential Oil Research*. 1-8, **2017**
- [86] S.N. ANDRIANJAFINANDRASANA, H.S. ANDRIANOELISOA, M.L. JEANSON, I. RATSIMIALA RAMONT, P. DANTHU. « Allelopathic effects of volatile compounds of essential oil from *Ravensara aromatica* Sonnerat chemotypes”. *Allelopathy Journal* 31, 333-344 , **2013**
- [87] E.V. Piletskaya, S.A. Piletsky, T.A. Sergeyeva, A.V. El'skaya, A.A. Sozinov, J.-L. Marty, R. Rouillon. “Thylakoid membranes-based test-system for detecting of trace quantities of the photosynthesis-inhibiting herbicides in drinking water”. *Analytica Chimica Acta* 391 1-7, **1999**

- [88] R. Rouillon, J. J. Mestres, J. L. Marty, 'Entrapment of chloroplasts and thylakoids in polyvinyl alcohol polymers. Optimization of membrane preparation and storage conditions', *Anal. Chem. Acta*, 311, 437-442, **1995**
- [89] K. Trigui. " Recherches sur l'éco-biologie de l'Artémia (*Artemia salina*) de la saline de Sahline et effet des principaux facteurs externes sur sa survie en vue de maîtriser son élevage ». Thèse de doctorat. Université de Tunisie. **2017**
- [90] P. BRISSET. «élevage et utilisation en aquaculture de l'artemia . Thèse de doctorat. Université de Lille , **1984** .
- [91] M. F. Andre´s, A. Gonza´lez-Coloma, J. Sanz, J. Burillo, P. Sainz. « Nematicidal activity of essential oils: a review". *Phytochem Rev*, 11, 371–390, **2012**
- [92] M. Garcí'a, A. Gonzalez-Coloma, O. J. Donadel, C. E. Ardanaz, C. E. Tonn, M. E. Sosa. « Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil ». *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 181-187, **2007**
- [93] M. E. Sosa, H. G. Lancelle, C. E. Tonn , M. F. Andres c, A. Gonzalez-Coloma. « Insecticidal and nematicidal essential oils from Argentinean *Eupatorium* and *Baccharis* spp ». *Biochemical Systematics and Ecology*, 43 ,132–138, **2012**
- [94] A. G. Pretel, H. P. del Pulgar, E. Guerrero de León, J. L. López-Pérez, A. S. Olmeda , A. Gonzalez-Coloma , A. F. Barrero, J. F. Quílez del Moral. « Germacrone Derivatives as new Insecticidal and Acaricidal Compounds: A Structure-Activity Relationship". *Molécule*, 24, 2898, **2019**.
- [95] W. Wang, Q. Mao, J. Yao, W. Yang, Q. Zhang, W. Lu, Z. Deng, L. Duan." Discovery of the pyridylphenylureas as novel molluscicides against the invasive snail *Biomphalaria straminea*, intermediate host of *Schistosoma mansoni* ». *Parasites & Vectors* 11, 291, **2018**
- [96] B. Mandefro, S. T. Mereta¹, Y. Tariku, A. Ambelu. "Molluscicidal effect of *Achyranthes aspera* L. (Amaranthaceae) aqueous extract on adult snails of *Biomphalaria pfeifferi* and *Lymnaea Natalensis* ». *Infectious Diseases of Poverty* ,6, 133, **2017**
- [97] L. P. L. Alves Pereira, C. N. Dias¹, M. V. Miranda¹, W. d. C Araújo Firmo. « Molluscicidal effect of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns latex on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host snail ». *Rev Inst Med Trop São Paulo.*;59:, 85, **2017**
- [98] m. m. salama, e. e. taheer, m. m. el-bahy. " molluscicidal and mosquitocidal activities of the essential oils of *thymus capitatus* hoff. et link. and *Marrubium vulgare* L. ». *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 54(5), 281-286, **2012**

- [99] H. D.A. Araújo, L. R.S. Silva, W. N. Siqueira, C.S.M. Fonseca, N. H. Silva, A. M.M.A. Melo, M. C.B. Martins, V. L.M. Lima. “Toxicity of Usnic Acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata* ». *Acta Tropica* 179, 39–43, **2018**
- [100] C. N. Dias, K. A. F. Rodriguesb, F. A. A. Carvalhob, S. M. P. Carneirob, J. G. S. Maiac, E. H. A. Andradec, D. F. C. Moraes. “Molluscicidal and Leishmanicidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil”. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 10, **2013**.
- [101] Ellinwood, D. C. et al. Total synthesis of [13 C] 2 -, [13 C] 3 -, and [13 C] 5 - isotopomers of xanthohumol, the principal prenylflavonoid from hops. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 60, 639–648. **2017**.
- [102] Kusturin, C. et al. Switchable Catalysis: Modular Synthesis of Functionalized Pyrimidinones via Selective Sulfide and Halide Cross-Coupling Chemistry. *Org. Lett.* 5, 4349–4352. **2003**.
- [103] Paul, C. E. et al. Expanding the regioselective enzymatic repertoire: oxidative mono-cleavage of dialkenes catalyzed by *Trametes hirsuta*. *Chem. Commun.* 48, 3303, **2012**.
- [104] Hua, X., Masson-Makdissi, J., Sullivan, R. J. & Newman, S. G. Inherent vs Apparent Chemoselectivity in the Kumada–Corriu Cross-Coupling Reaction. *Org. Lett.* 18, 5312–5315 **2016**.
- [105] Nakazono, M., Oshikawa, Y., Nakamura, M., Kubota, H. & Nanbu, S. Strongly Chemiluminescent Acridinium Esters under Neutral Conditions: Synthesis, Properties, Determination, and Theoretical Study. *J. Org. Chem.* 82, 2450–2461, **2017**.
- [106] Medbouhi A, Benbelaid F, Djabou N, Beaufay C, Bendahou M, Quetin- Leclercq J, et al. Essential oil of Algerian *Eryngium campestre*: chemical variability and evaluation of biological activities. *Molecules*.;24:2575. **2019**
- [107] Medbouhi A, Tintaru A, Beaufay C, Naubron JV, Djabou N, Costa J, et al. Structural elucidation and cytotoxicity of a new 17-membered ring lactone from Algerian *Eryngium campestre*. *Molecules*. 23:3250, **2018**.
- [108] Lamberton PHL, Faust CL, Webster JP. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence rom a laboratory life-history trade-offs selection study. *Infect Dis Poverty*.;6:110. **2017**
- [109] Dai JR, Li YZ, Wang W, Xing YT, Qu GL, Liang YS. Resistance to niclosamide in *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of *Schistosoma japonicum*: should we be worried”. *Parasitology*. 142:332–40. **2015**;

- [110] Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg.* 60:932–5. **1999**
- [111] da Silva VBR, Campos B, de Oliveira JF, Decout JL, do Carmo Alves de Lima M. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: praziquantel and oxamniquine. *Bioorg Med Chem.*;25:3259–77. **2017**
- [112] Souza CP. Molluscicide control of snail vectors of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;90:165–8. **1995**
- [113] Pereira L, Dias CN, Miranda MV, Firmo W, Rosa CDS, Santos PF, et al. Molluscicidal effect of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns latex on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host snail. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*;59:e85. **2017**
- [114] Jurberg P, Cabral Neto JB, Schall VT. Molluscicide activity of the “avelós” plant (*Euphorbia tirucalli* L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;80:423–7. **1985**
- [115] de Vasconcellos MC, de Amorim A. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopianae* N.E.B. (“Christ’s Crown”) (*Euphorbiaceae*) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (*Pulmonata: Lymnaeidae*), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (*Trematode: Fasciolidae*)- test in laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;98:557–63. **2003**
- [116] Pereira Filho AA, Franca CR, Oliveira Dda S, Mendes RJ, Goncalves Jde R, Rosa IG. Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*;56:505–10. **2014**
- [117] Ibrahim AM, Abdalla AM. Impact of *Moringa oleifera* seed aqueous extract on some biological, biochemical, and histological aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Environ Sci Pollut Res Int.*;24:28072–8. **2017**
- [118] dos Santos AF, Fonseca SA, Cesar FA, de Azevedo Albuquerque MC, Santana JV, Santana AE. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol Res.*;113:1077–84. **2014**
- [119] Radwan MA, El-Zemity SR, Mohamed SA, Sherby SM. Potential of some monoterpenoids and their new N-methyl carbamate derivatives against schistosomiasis snail vector, *Biomphalaria alexandrina*. *Ecotoxicol Environ Saf.*;71:889–94. **2008**

- [120] Pereira L, Ribeiro ECG, Brito MCA, Silveira DPB, Araruna FOS, Araruna FB, et al. Essential oils as molluscicidal agents against schistosomiasis transmitting snails—a review. *Acta Trop.*;209:105489. **2020**
- [121] Lahlou M, Berrada R, Hmamouchi M. Molluscicidal activity of thirty essential oils on *Bulinus truncatus*. *Therapie.*;56:71–2. **2001**
- [122] Rai DK, Brunton NP, Koidis A, Rawson A, McLoughlin P, Griffiths WJ. Characterisation of polyacetylenes isolated from carrot (*Daucus carota*) extracts by negative ion tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*;25:2231–9. **2011**
- [123] Augusto RC, Tetreau G, Chan P, Walet-Balieu ML, Mello-Silva CC, Santos CP, et al. Double impact: natural molluscicide for schistosomiasis vector control also impedes development of *Schistosoma mansoni* cercariae into adult parasites. *PLoS Negl Trop Dis.*;11:e0005789. **2017**
- [124] Ibrahim AM, Abdel-Gawad MM, El-Nahas HA, Osman NS. Studies on the molluscicidal activity of *Agave angustifolia* and *Pittosporum tobira* on schistosomiasis transmitting snails. *J Egypt Soc Parasitol.*;45:133–41. **2015**
- [125] dos Santos AF, Fonseca SA, César FA, de Azevedo Albuquerque MC, Santana JV, Santana AE. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol Res.*;113:1077–84. **2014**
- [126] Rodrigues KA, Dias CN, do Amaral FM, Moraes DF, Mouchrek Filho VE, Andrade EH, et al. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. *Pharm Biol.*;51:1293–7. **2013**
- [127] el-Ansary A, Sammour EM, Soliman MS, Gawish FA. In vivo, attenuation of schistosome cercarial development and disturbance of egg laying capacity in *Biomphalaria alexandrina* using sublethal concentrations of plant molluscicides. *J Egypt Soc Parasitol.*;31:657–69. **2001**
- [128] Zhang SM, Buddenborg SK, Adema CM, Sullivan JT, Loker ES. Altered gene expression in the Schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to niclosamide, the active ingredient in the widely used molluscicide Bayluscide. *PLoS Negl Trop Dis.*;9:e0004131. **2015**
- [129] Kobaek-Larsen M, Baatrup G, KhataeiNotabi M, El-Houri RB, Pipó-Ollé E, Christensen Arnspang E, et al. Dietary polyacetylenic oxylipins falcarinol and falcarindiol prevent inflammation and colorectal neoplastic transformation: a mechanistic and dose-response study in a rat model. *Nutrients.*;11:2223. **2019**
- [130] Thiem B, Kikowska M, Kurowska A, Kalemba D. Essential oil composition, of the different parts and in vitro shoot culture of *Eryngium planum* L. *Molecules.*;16:7115–24. **2011**

- [131] Kikowska M, Kalembe D, Dlugaszewska J, Thiem B. Chemical composition of essential oils from rare and endangered species-Eryngium maritimum L. and E. alpinum L. *Plants (Basel)*.;9:417. **2020**
- [132] Landoulsi A, Hennebelle T, Bero J, Rivière C, Sahpaz S, Quetin-Leclercq J, et al. Antimicrobial and light-enhanced antimicrobial activities, cytotoxicity and chemical variability of all Tunisian Eryngium species. *Chem Biodivers.*;17:e1900543 **2020**.
- [133] Europe Co. European Pharmacopoeia. 3rd ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 1997.
- [134] Augusto RC, Duval D, Grunau C. Effects of the environment on developmental plasticity and infection success of Schistosoma parasites—an epigenetic perspective. *Front Microbiol.*;10:1475. **2019**
- [135] Li H, Wang W. Apropos: critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infect Dis Poverty.* 6:54. **2017**;
- [136] Silva H, Sa JLF, Siqueira WN, Lima MV, Martins MCB, Aires AL, et al. Toxicological effects of Ramalina aspera (lichen) on Biomphalaria glabrata snails and Schistosoma mansoni cercariae. *Acta Trop.*;196:172–9. **2019**

ANNEXES

Article 1: Essential Oils from Two Apiaceae Species as Potential Agents in Organic Crops Protection

N. Merad , V. Andreu , S. Chaib , R. deCarvalhoAugusto, D. Duval , C.Bertrand, Y. Boumghar , A. Pichette , N. Djabou.” Essential Oils from Two Apiaceae Species as Potential Agents in Organic Crops Protection”, *antibiotics.*, vol. 10. 2021

Article

Essential Oils from Two Apiaceae Species as Potential Agents in Organic Crops Protection

Nadjiya Merad ¹, Vanessa Andreu ², Slimane Chaib ³, Ronaldo de Carvalho Augusto ^{4,5} , David Duval ⁴,
Cédric Bertrand ^{2,3} , Yacine Boumghar ^{6,*}, André Pichette ⁷ and Nassim Djabou ^{1,*} 

- ¹ Laboratoire COSNA, Département de Chimie, Faculté des Sciences, BP 119, Université de Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria; ninaruby-tlem@hotmail.fr
- ² AKINAO, 52 Avenue. Paul Alduy, 66860 Perpignan, France; vanessa.andreu@akinao-lab.com (V.A.); cedric.bertrand@univ-perp.fr (C.B.)
- ³ Université de Perpignan, PSL Research University, EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, 52 Avenue Paul Alduy, CEDEX, 66860 Perpignan, France; slimane.chaib@univ-perp.fr
- ⁴ Université Perpignan Via Domitia, 52 Avenue Paul Alduy, CEDEX, 66860 Perpignan, France; ronaldodecarvalhoaugusto@gmail.com (R.d.C.A.); david.duval@univ-perp.fr (D.D.)
- ⁵ Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, CNRS, Université Lyon, 69007 Lyon, France
- ⁶ CÉPROCQ, College of Maisonneuve, 6220 Rue Sherbrooke est, Montréal, QC H1N 1C1, Canada
- ⁷ Centre de Recherche sur la Boréale (CREB), Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi (UQAC), 555, Boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7H 2B1, Canada; Andre_Pichette@uqac.ca
- * Correspondence: yboumghar@cmaisonneuve.qc.ca (Y.B.); nassim.djabou@univ-tlemcen.dz (N.D.)



Citation: Merad, N.; Andreu, V.; Chaib, S.; de Carvalho Augusto, R.; Duval, D.; Bertrand, C.; Boumghar, Y.; Pichette, A.; Djabou, N. Essential Oils from Two Apiaceae Species as Potential Agents in Organic Crops Protection. *Antibiotics* **2021**, *10*, 636. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060636>

Academic Editors: Carla Sabia and Ramona Iseppi

Received: 22 April 2021
Accepted: 18 May 2021
Published: 26 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chemical composition and herbicidal, antifungal, antibacterial and molluscicidal activities of essential oils from Choukzerk, *Eryngium triquetrum*, and Alexander, *Smyrniium olusatrum*, from western Algeria were characterized. Capillary GC-FID and GC/MS were used to investigate chemical composition of both essential oils, and the antifungal, antibacterial, molluscicidal and herbicidal activities were determined by % inhibition. Collective essential oil of *E. triquetrum* was dominated by faltarinol (74.8%) and octane (5.6%). The collective essential oil of *S. olusatrum* was dominated by furanoeremophilone (31.5%), furanodiene+curzurenene (19.3%) and (E)- β -caryophyllene (11%). The *E. triquetrum* oil was tested and a pure faltarinol (99%) showed virtuous herbicidal and antibacterial activities against potato blackleg disease, *Pectobacterium atrosepticum*, and Gram-negative soil bacterium, *Pseudomonas cichorii* (85 and 100% inhibition, respectively), and high ecotoxic activity against brine shrimp, *Artemia salina*, and the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, with an IC₅₀ of 0.35 μ g/mL and 0.61 μ g/mL, respectively. Essential oil of *S. olusatrum* showed interesting antibacterial and ecotoxic activity and good herbicidal activity against watercress seeds, *Lepidium sativum* (74% inhibition of photosynthesis, 80% mortality on growth test on model watercress), while the furanoeremophilone isolated from the oil (99% pure) showed moderate herbicidal activity. Both oils showed excellent antifungal activity against *Fusarium*. Both oils and especially faltarinol demonstrated good potential as new biocontrol agents in organic crop protection.

Keywords: *Eryngium triquetrum*; *Smyrniium olusatrum*; essential oils; chemical composition; crop protection; faltarinol

1. Introduction

Today, it is widely recognized that herbicides may pose a significant risk to human health and to the environment. This risk has led to an increased interest in alternative strategies which have led to the development of biodegradable compounds [1,2]. Aromatic plants are increasingly used for pest control in bioagriculture. The essential oils and volatile constituents extracted from these plants are widely used as new replacement agents for biological control against microbial strains and pests, due to their specificity of action, their biodegradable nature and their commercial applications [3–5].

The genus sea holly (*Eryngium*) belongs to the family Apiaceae (Umbelliferae) and contains about 317 species [6,7]. Some of them have traditionally been used for the treatment of various anti-inflammatory disorders and antinociceptive activity [6]. Secondary metabolites isolated from plants belonging to this genus have displayed important biological activities, including antitumor, antibacterial, molluscicide, parasiticide, antimicrobial, antifungal, cytotoxic and phototoxic [6–10]. Many studies deal with phytochemical constituents of the *Eryngium* genus, reporting terpenoids, polyacetylenes, triterpenoid, saponins, steroids and phenolics [6,7,11].

Choukzerk (*Eryngium triquetrum* Vahl) is a plant that is endemic to North Africa and widely distributed in all parts of Algeria along with other *Eryngium* species [6]. The species grows particularly well in rocky pastures. It is considered to be a sturdier species, which the local people call “choukzerk” [12].

In the genus *Eryngium*, faltarinol has been identified as a major component in the essential oil in previous studies [7,12]; it is a highly bioactive polyacetylene with remarkable cytotoxic activity. It displays anti-inflammatory, antibacterial and a very strong antifungal potential [12]. It also displays antiproliferative [13] and nematocidal activity against pine wilt nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) and root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) [14]. It is also a natural pesticide and an anticancer agent [15].

Alexander (*Smyrniium olusatrum* L.) is certainly worthy of consideration. This plant, probably used since prehistoric times, became very popular in the time of Alexander the Great (4th century BC) and was widely cultivated and eaten by the Romans, who introduced it into Western and Central Europe, including the British Isles where it is now completely naturalized [16]. *S. olusatrum*, known as wild celery, is a biennial plant with a celery-like flavor that was used for several centuries as a vegetable and was then abandoned after the introduction of celery [16]. It was cultivated in Roman times for culinary and healing purposes [17]. The composition of the essential oils from *S. olusatrum*'s leaves, flowers and fruits is characterized by a high proportion of furanosesquiterpenes [18–21]. Roots and herbs are characterized by their high content of oxygenated sesquiterpenoids, most of which are furanosesquiterpenoids, while green and ripe fruits are dominated by hydrocarbons. In the roots and grass, the furanoeremophilone is the second most important furanosesquiterpenoid [22]. Furanodiene is a thermosensitive molecule that is subjected to a Cope rearrangement which yields the less active curzurenene isomer. This rearrangement occurs during the heating of the plant material [23].

Essential oil of *S. olusatrum* shows natural antioxidant and herbicidal action against *Convolvulus arvensis* [24], high efficacy against larvae of the southern house mosquito (*Filariasis* vector *Culex quinquefasciatus*) with LD₅₀ = 17.5 µg/mL [25] and cytotoxic activity on human colon cancer [16,21]. *S. olusatrum* oil is rich in furanoeremophilone, which is an active molecule against fungi such as *Aspergillus*, *Trichoderma* and *Penicillium* [26]. This oil is also rich in curzurenene, which has anticancer activity [27], and displays toxicity against mosquito species such as Celia mosquito (*Anopheles subpictus*), Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) and *Culex* mosquito (*Culex tritaeniorhynchus*) [28].

In our characterization of Algerian aromatic plants in the field of crop protection [1,3–5,7,12,29,30], we reported here the chemical composition of the essential oils of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* from western Algeria using a combination of flash chromatography followed by capillary GC(RI) and GC/MS. Biological activities were established through the characterization of phytotoxicity assays (germination, thylakoid activity and growth assay on the model grass watercress (*Lepidium sativum*)), ecotoxicology tests against *Artemia* larvae (*A. salina*) and freshwater snail (*B. glabrata*), antibacterial activity against potato blackleg disease (*Pectobacterium atrosepticum*) and Gram-negative soil bacterium (*Pseudomonas cichorii*) and finally antifungal activity against noble rot fungus (*Botrytis cinerea*) IP 1854.89 and wheat head blight fungus (*Fusarium graminearum*).

2. Results

2.1. Composition of *E. triquetrum* Essential Oils

High-availability species have been identified as a result of the sampling of plant material in northwestern Algeria. Hydrodistillation of the fresh aerial parts of plants from Algeria resulted in (*w/w*) 0.02 to 0.11% (average 0.05%) of red essential oils. Table 1 presents the yields for all essential oils analyzed. The oils were first analyzed by both GC-FID and GC/MS and were primarily found to contain linear oxygenates (92.6%), dominated by falcarinol (74.8%), followed by octanal (5.6%) and nonanal (0.8%). Twenty components were identified by comparing their retention indices and their mass spectra with those from a “homemade” mass spectral library. Major compounds are schematized in Table 2.

Table 1. Chemical composition of *S. olusatrum* and *E. triquetrum* essential oils from Algeria.

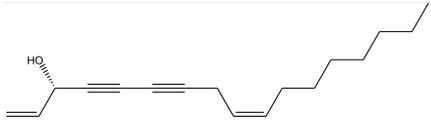
No	Components †	RI a‡	<i>S. olusatrum</i>	<i>E. triquetrum</i>	Identification
			Roots §	Stems §	
1	butanol	638	0.5		RI, MS
2	heptane	703		0.6	RI, MS
3	hexanal	774		0.5	RI, MS
4	heptanal	877		tr *	RI, MS
5	α-thujene	925	0.1		RI, MS
6	α-pinene	933	0.8		RI, MS
7	sabinene	968	0.1		RI, MS
8	β-pinene	974	3		RI, MS
9	octanal	979		5.6	RI, MS
10	myrcene	983	0.1		RI, MS
11	α-phellandrene	996	tr *		RI, MS
12	Δ-3-carene	1008	2.2		RI, MS
13	p-cymene	1013	0.3		RI, MS
14	limonene	1022	0.2		RI, MS
15	E-β-ocimene	1037	0.1		RI, MS
16	(E)-2-octenal	1039		0.2	RI, MS
17	1-octanol	1063		tr *	RI, MS
18	nonan-2-one	1077		tr *	RI, MS
19	α-terpineol	1079	0.1		RI, MS
20	nonanal	1081		0.8	RI, MS
21	(E)-2-nonenal	1133		0.5	RI, MS
22	p-menth-8-en-1-ol	1139	0.1		RI, MS
23	(Z)-2-nonen-1-ol	1155		0.2	RI, MS
24	menthofurane	1156	0.1		RI, MS
25	p-cymen-8-ol	1160	0.1		RI, MS
26	α-terpineol	1172	Tr *		RI, MS
27	octanoic acid	1174		Tr *	RI, MS
28	1-decen-3-ol	1181		0.7	RI, MS
29	decanal	1183		Tr *	RI, MS
30	citronellol	1209	0.3		RI, MS
31	cuminaldehyde	1212	0.2		RI, MS
32	3-dodecen-1-yne	1214		0.5	RI, MS
33	carvone	1225		0.5	RI, MS
34	(E)-2-decanal	1251		Tr *	RI, MS

Table 1. Cont.

No	Components †	RI a‡	<i>S. olusatrum</i>		<i>E. triquetrum</i>	
			Roots §	Stems §	Roots §	Stems §
35	piperitenone	1286	Tr *			RI, MS
36	(E,E)-2,4-decadienal	1289			Tr *	RI, MS
37	citronellyl acetate	1333	0.1			RI, MS
38	α -copaene	1379	0.1			RI, MS
39	β -bourbonene	1382	0.2			RI, MS
40	β -elemene	1387	1.1			RI, MS
41	E-β-caryophyllene	1420	11			RI, MS
42	δ -elemene	1427	0.3			RI, MS
43	α -humulene	1450	0.9			RI, MS
44	β -ionone	1454			0.3	RI, MS
45	germacrene D	1475	0.1			RI, MS
46	furanodiene	1480	19.1			RI, MS
47	curzurene	1484	0.2			RI, MS
48	3,4-dimethyl-5-pentyl-5H-furan-2-one	1486			2.7	RI, MS, Ref **
49	α -bulnesene	1507	0.2			RI, MS
50	α -cadinene	1510	0.3			RI, MS
51	δ -cadinene	1515	0.5			RI, MS
52	γ -undecalactone	1524			tr *	RI, MS, Ref **
53	dodecanoic acid	1547			tr *	RI, MS
54	germacrene B	1552	1.5			RI, MS
56	caryphylleneoxyde	1572	2.2			RI, MS
57	isocaryophyllen-14-ol	1629	0.7			RI, MS
58	4- β -4-cadin-9-en-15-al	1677	0.9			RI, MS
59	14-hydroxy- δ -cadinene	1776	0.5			RI, MS
60	Furanoeremophilone	1860	31.5			RI, MS
61	hexadecanoic acid	1968			1.9	RI, MS
62	Falcarinol	2026			74.8	RI, MS
63	α -kaurene	2049	1.4		0.3	RI, MS
64	E-phytol	2106	2.3			RI, MS
65	Tridecane	2303	0.5			RI, MS
66	Tetradecane	2403	0.4			RI, MS
67	Pentadecane	2503	0.1			RI, MS
	Total identification %		84.4		90.1	
	EO, yields (%) (<i>w/w</i>)		0.004		0.02	
	Oxygenated compounds		39.6		89.2	
	Hydrogenated compounds		44.8		0.9	

† Order of elution is given on a polar column (DB5), ‡ retention indices on DB5 column (RIa), § collective oils: mixture of all Algerian *S. olusatrum* and *E. triquetrum* (roots and stems essential oils, respectively). * tr = trace (< 0.05%). RI: retention indices; MS: mass spectrometry in electronic impact mode. ** All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library, except for compounds 48 and 52.

Table 2. Falcarinol structure and information.

Molecule	Name	Formula	IUPAC Name
	Falcarinol (74.8%)	C ₁₇ H ₂₄ O	(3S,9Z)-Heptadeca-1,9-diene-4,6-diyn-3-ol

2.2. Composition of *S. olusatrum* Essential Oils

The essential oil composition of *S. olusatrum* roots is reported in Table 1. A total of 41 components were identified, corresponding to 84.4% of the total oil. The main fraction consisted of furanosesquiterpenoid (59.1%). Collective essential oil was dominated by furanoermophilone (31.5%), furanodiene+curzurenene (19.3%) and E-β-caryophyllene (11%). All of the furanosesquiterpenoids detected in this study are known to be precursors of sesquiterpene lactones, which are considered to be marker compounds of the genus *Smyrniium*. Furanoermophilone and furanodiene+curzurenene are bioactive components. It is interesting to note that furanodiene is a thermosensitive molecule that is subjected to a Cope rearrangement to produce curzurenene isomer. For this reason, we prefer to give the percentage of both molecules together (Figure 1). Major compounds are schematized in Table 3.

2.3. Germination

The germination is a preliminary bioherbicide test made in vitro (Petri boxes), giving the inhibitory effect of our samples on the germination and the growth of roots and stems on a model grass cross during a week. In all tests, *E. triquetrum* and *S. olusatrum* essential oils and pure falcarinol and furanoermophilone were tested. The germination test showed that both essential oils and major compounds had low inhibition of the germination rate and moderate inhibition of growth (Table 4).

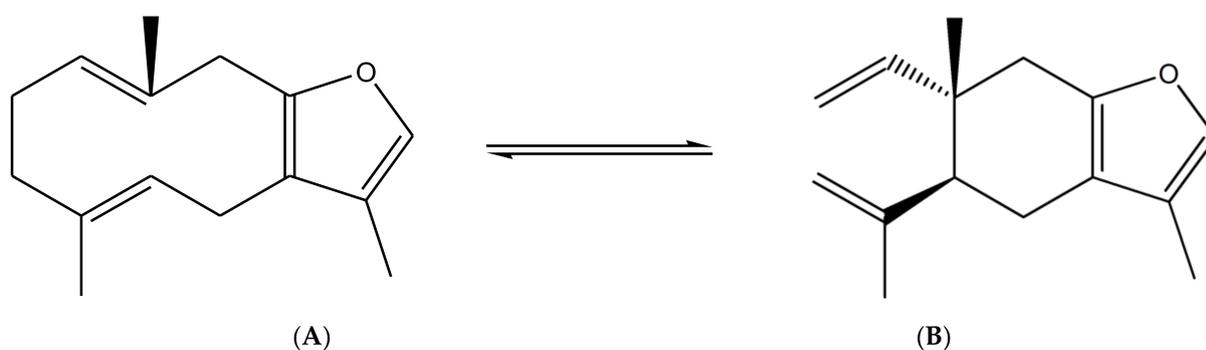
**Figure 1.** Cope rearrangement of furanodiene (A) to curzurenene (B).

Table 3. Furanoermophilone and furanodiene+curzuren structures and information.

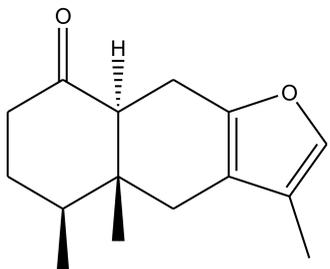
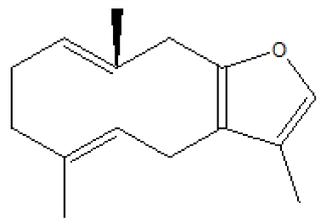
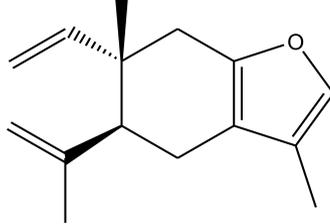
Molecule	Name	Formula	IUPAC Name
	Furanoermophilone (31.6%)	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	3,4a,5-trimethyl-4a,5,6,7,8a,9-hexahydro-4H-naphtho[2,3-b]furan-8-one
	Furanodiene (19.1%)	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	3,6,10-trimethyl-4,7,8,11-tetrahydro-cyclodeca[b]furan
	Curzuren (0.2%)	C ₁₅ H ₂₀ O	5-isopropenyl-3,6-dimethyl-6-vinyl-4,5,6,7-tetrahydro-benzofuran

Table 4. Germination and growth inhibition results of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* essential oils and the major compounds.

EO/Molecules 0.1 mg/mL	% Inhibition	
	Germination Rate	Growth Inhibition
<i>E. triquetrum</i>	3	12
Falcarinol	5	18
<i>S. olusatrum</i>	0	18
Furanoermophilone	0	10

2.4. Thylakoid Activity

The thylakoid test is a bioherbicide test which involves testing the inhibitory effect of our samples on photosynthesis. We used an atrazine positive control; this is the most common chemical molecule used as a herbicide in crop protection which has an inhibitory effect on the photosynthesis system.

As summarized in Table 5, essential oils of *S. olusatrum* and *E. triquetrum* and major compounds (falcarinol and furanoermophilone) showed photosynthesis inhibition activity of 74% and 43% for essential oils and 28% and 51% for furanoermophilone and falcarinol, respectively, at 0.01 mg/mL, with the inhibition of the positive control (atrazine) of 48% at the same concentration.

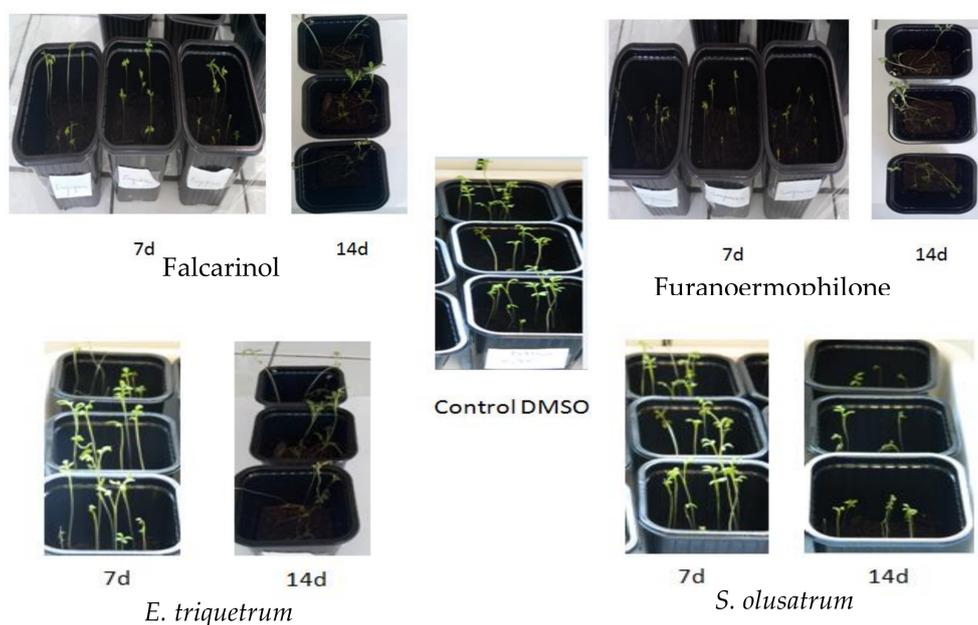
Table 5. Thylakoid test results of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* essential oils and the major compounds.

EO/Molecules 0.01 mg/mL	% Inhibition of Photosynthesis
<i>E. triquetrum</i>	43
Falcarinol	51
<i>S. olusatrum</i>	74
Furanoermophilone	28
Atrazine	48

Compared with the positive control, the essential oil of *S. olusatrum*, especially, showed very interesting activity compared to the atrazine. Both falcarinol and *E. triquetrum* oil also showed very interesting results. Based on these results, falcarinol, *E. triquetrum* oil and especially *S. olusatrum* oil can be suggested as a substitution for chemical atrazine in crop protection to inhibit photosynthesis of weeds.

2.5. Growth Assay on the Model Grass Watercress (*Lepidium sativum*)

In order to confirm the potential ability to inhibit the photosynthesis of weeds, the growth test on the cress model was performed and results are presented in Figure 2. The experiments were carried out several times and in triplicate each time. We present the results after 7 days of treatment (7d) and after 15 days (15d). We took the photos using a camera. The plants after 7 days (7d) of treatment still kept their shape by comparing with the negative control but after 15 days (15d) the plants lost their shape, especially with the treatment with the essential oil of *E. triquetrum*, falcarinol and furanoermophilone.

**Figure 2.** The effect of essential oils and major compounds on growth on model grass cress (*Lepidium sativum*) after 7 and 14 days.

This *in vivo* test is similar to the reality and shows the essential oil inhibition on the vegetative stage development of the plant. The observations were made after 7 and 14 days, and therefore the essential oils of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* and major compounds showed good inhibition after 7 days, with a rate of mortality of 52% and 62%, respectively, and after 14 days, a mortality rate of 70% and 80%, respectively. For falcarinol and furanoermophilone, 68% and 50% rate of mortality was observed after 7 days and 88% and 67% after 14 days.

The results showed that both treatments (germination and growth inhibition) with the essential oils of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* and major compounds demonstrated a weak inhibitory effect of sprouting on Petri dishes at a concentration of 0.1 mg/mL, and no large difference between both treatments was observed.

However, both treatments showed an inhibitory effect of photosynthesis and treatment with *S. olusatrum* oil especially, and faltarinol demonstrated an inhibition of photosynthesis of interest to 0.01 mg/mL compared with the second treatment. The results of the treatment on the pots showed that both treatments had an inhibitory effect on the growth of the model plants, and that the treatment with *S. olusatrum* and faltarinol showed an interesting mortality effect and growth inhibition after 14 days of treatment. Therefore, *S. olusatrum* oil and faltarinol can be considered to be a natural herbicide treatment against weeds.

2.6. Ecotoxicity Activity

The ecotoxicology test allows the evaluation of the toxicity of essential oils on aquatic fauna. Ecotoxicology test of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* essential oils and their major compounds (faltarinol and furanoermophilone) was performed against *A. salina* and *B. glabrata*.

Figure 3 shows the mortality rate of *Artemia salina* larvae as a function of different concentrations of our samples. The experiment was carried out several times in triplicate, at different concentrations, and the results were determined after 24 h and 48 h by binocular observation.

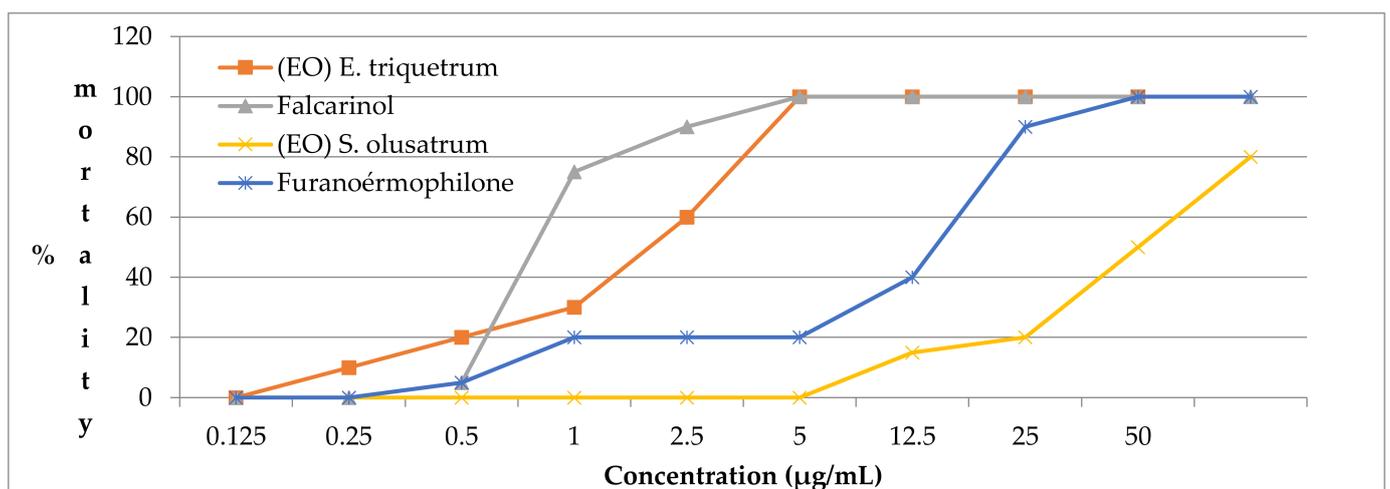


Figure 3. The death rate of *Artemia* at different concentrations of essential oils *E. triquetrum* and *S. olusatrum* and major compounds.

For *A. salina*, results showed that the faltarinol and the collective essential oil of *E. triquetrum* have high activities with an IC_{50} of 0.35 µg/mL and 0.7 µg/mL, respectively. On the other hand, the essential oil of *S. olusatrum* and furanoermophilone showed moderate activity against *A. salina* with an IC_{50} of 5 µg/mL for furanoermophilone and 25 µg/mL for *S. olusatrum*.

Figure 4 shows the mortality of *B. glabrata* at different concentrations of our samples. The snails were fed fresh lettuce during the observation period (48 h). Each snail was observed under a binocular microscope to assess heart movements.

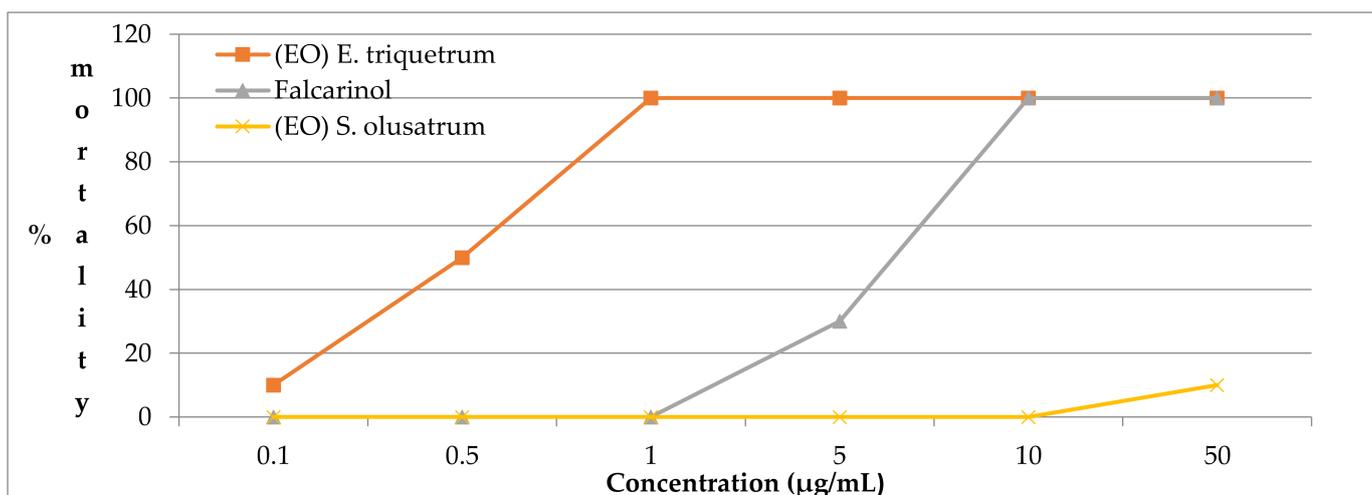


Figure 4. The death rate of *B. glabrata* at different concentrations of essential oils *E. triquetrum* and *S. olusatrum* and major compounds.

For *B. glabrata*, the results showed that falcarinol and *E. triquetrum* also presented very efficient activity with IC_{50} of 5.1 µg/mL and 0.5 µg/mL, respectively. Surprisingly, *S. olusatrum* showed low efficiency effect against *B. glabrata*, reaching 8.3% mortality at 50 µg/mL.

Our results provide evidence that: (i) the ecotoxicological effect may vary between the target organisms; and (ii) the ecotoxicological action of the two plants studied goes beyond the action of their major component [8,31]. Together, these results are very interesting, especially with falcarinol and the oil of *E. triquetrum*, which can be used to support control strategies of parasitic diseases related to limnic environments.

2.7. Antibacterial Activity against Phytopathogens

Antibacterial activity is carried out on phytopathogens, including *Pectobacterium atrosepticum*, responsible for the black leg of the potato and *Pseudomonas cichorii*, responsible for the disease of lettuce, celery and chrysanthemum. The antibiotic chloramphenicol is used as a positive control.

The results of the antibacterial activity of the essential oils are shown in Table 6. The results showed that falcarinol and *E. Triquetrum* oil have good antibacterial activity against *Pectobacterium* and *Pseudomonas* at 40 mg/mL (85% to 100% of inhibition after 24 h, respectively). On the other hand, the essential oil of furanoermophilone and *S. olusatrum* showed moderate activity against both strains (58% to 70%, respectively).

Table 6. Antibacterial activity of essential oils and the major compounds.

EO/Molecules 40 mg/mL	% Inhibition after 24 h	
	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>E. triquetrum</i>	85	100
Falcarinol	100	100
<i>S. olusatrum</i>	63	58
Furanoermophilone	70	70
Chloramphenicol	100	100

Based on these results, falcarinol can be a good natural alternative to chemical antibiotics used against *Pectobacterium* and *Pseudomonas*, especially in organic farming.

2.8. Antifungal Activity of Essential Oils on Mycelial Growth

Antifungal activity was tested on four fungal strains, including *Botrytis cinerea*, responsible for gray rot (tomatoes, strawberries), *Penicillium expansum*, responsible for fruit rot (apple/pear), *Zymoseptoria tritici*, responsible for septoria blight and *Fusarium graminearum*, responsible for cereal fusarium. A fungicide that was used as a positive control is Tebuconazol.

Antifungal activity of essential oils on mycelial growth is presented in Table 7. Falcari-nol and *E. triquetrum* essential oil showed excellent activity against *Fusarium graminearum*, with lack of growth, moderate inhibition against *Botrytis cinerea* (55% and 43%), *Penicillium expansum* (33% and 27%) and *Zymoseptoria tritici* (17% and 34%) at very low concentration of 1.42×10^{-1} $\mu\text{L}/\text{mL}$ air. Furanoermophilone and *S. olusatrum* showed more interesting inhibition activities than falcari-nol and *E. triquetrum*, also with excellent activity against *Fusarium graminearum* with lack of growth, interesting activity against *Zymoseptoria tritici* (70% and 83%) and moderate activity against *Penicillium expansum* (30% and 39%) at very low concentration of 1.42×10^{-1} $\mu\text{L}/\text{mL}$ air.

Table 7. Antifungal activity of essential oils and the major compounds on mycelial growth.

EO/Molecules 1.42×10^{-1} $\mu\text{L}/\text{mL}$ Air	% Inhibition after 3 Days			
	<i>Botrytis Cinerea</i>	<i>Penicillium Expansum</i>	<i>Fusarium Graminearum</i>	<i>Zymoseptoria Tritici</i>
<i>E. triquetrum</i>	43	27	Growth	17
Falcarinol	55	33	Growth	34
<i>S. olusatrum</i>	48	39	Growth	83
Furanoermophilone	42	30	Growth	70
Tebuconazole	100	100	100	100

These results demonstrate that both oils and major compounds have antifungal potential against several fungi, especially *Fusarium graminearum*, and can be considered to be potential natural antifungal agents.

2.9. Fumigant Antifungal Activity

The fumigant antifungal activity is tested on four strains, same as above. The difference between the two methods is that in the previous one, the strains are in direct contact with the essential oils and major compounds. Fumigant antifungal activity of essential oils is presented in Table 8.

Falcarinol and *E. triquetrum* essential oil showed excellent activity against *Fusarium graminearum* with lack of growth, moderate inhibition again *Botrytis cinerea* (55% and 43%), *Zymoseptoria tritici* (46% and 33%) and *Penicillium expansum* (17% and 8%) and at very low concentration of 1.42×10^{-1} $\mu\text{L}/\text{mL}$ air. Furanoermophilone and *S. olusatrum* showed less activity than falcari-nol and *E. triquetrum*, also with excellent activity against *Fusarium graminearum* with lack of growth, interesting activity against *Botrytis cinerea* (42% and 48%) and no activity against *Zymoseptoria tritici* and *Penicillium expansum*, also at very low concentration of 1.42×10^{-1} $\mu\text{L}/\text{mL}$ air.

Table 8. Fumigant antifungal activity of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* essential oils and the major compounds.

EO/Molecules 1.42*10 ⁻¹ µL/mL Air	% Inhibition after 3 Days			
	<i>Botrytis Cinerea</i>	<i>Penicillium Expansum</i>	<i>Fusarium Graminearum</i>	<i>Zymoseptoria Tritici</i>
<i>E. triquetrum</i>	43	8	Growth	33
Falcarinol	55	17	Growth	46
<i>S. olusatrum</i>	48	0	Growth	0
Furanoermophilone	42	0	Growth	0
Tebuconazole	100	100	100	100

3. Discussion

Chemical compositions were performed by GC-FID and GC/MS-IE. Compositions were characterized by some interesting compound structures, such as falcarinol and furanoermophilone's skeleton. These molecules and essential oils demonstrated moderate activity in the preliminary bioherbicide test made in vitro, giving the inhibitory effect of our samples on the germination and the growth of roots and stems on model grass cress.

Bioherbicide assay, which involves testing the inhibitory effect of our samples on photosynthesis (thylakoid activity), showed very promising activity compared to atrazine positive control, the most common chemical molecule used as herbicide in crop protection which has an inhibitory effect on the photosynthesis system. Major compound of *Eryngium triquetrum*, falcarinol, showed photosynthesis inhibition activity of 74% at 0.01 mg/mL, with inhibition of the positive control (atrazine) of 48% at the same concentration. This result suggests the possibility of using falcarinol as potential industrial bioherbicide in inhibition of photosynthesis. This result was supported by the growth assay on the model grass watercress as evidence of potential ability to inhibit the photosynthesis of weeds. *S. olusatrum* oil and falcarinol demonstrated an inhibition of photosynthesis of interest to 0.01 mg/mL.

The ecotoxicology effect of essential oils and major compounds tested against *A. salina* and *B. glabrata* demonstrated a very strong effect at low concentration, especially of falcarinol and *E. triquetrum* oil, which can be suggested in support control strategies of parasitic diseases related to limnic environments.

Finally, antibacterial and antifungal activities were carried out against phytopathogens responsible for many diseases, as black leg and lettuce and mycelial growth were tested against gray rot, fruit rot, septoria blight and cereal *Fusarium*. All these activities showed interesting results, offering very large spectra of use of natural compound as potential agents in organic crop protection.

The plants of the family Apiaceae are known for the richness of bioactive compounds in their essential oils. In this study, we investigated the herbicidal and pesticidal potency of two Apiaceae species, as alternatives to synthetic chemical pesticides. *E. triquetrum* is a species rich in terpene alcohol, falcarinol, and the second species, *S. olusatrum*, is rich in furanosesquiterpenes molecules. This study showed that the essential oil of *E. triquetrum* had strong herbicidal, ecotoxic and antibacterial activity, and that this high activity was due to the presence of falcarinol, which is a compound associated with various biological activities. The second essential oil in this study, *S. olusatrum* essential oil, also showed good herbicidal activity, yet its ecotoxic and antibacterial activity was less important when compared to that of *E. triquetrum*.

Weed control is the botanical component of pest control, which attempts to stop weeds, especially noxious weeds, from competing with desired flora and fauna, including domesticated plants and livestock, and in natural settings, preventing non-native species from competing with native species. Weed control in conventional and organic agriculture is a major issue. In organic farming, it becomes impossible to use chemical herbicides, which opens the way to the search for natural molecules with bioherbicidal power. The work in progress allows us to offer a perspective for the use of natural compounds, such as *E. triquetrum* and *S. olusatrum* essential oils and falcarinol in organic weed control and

crop protection. In the same way, the use of falcarinol may also be considered as a good alternative to atrazine in conventional agriculture, since falcarinol has shown better results than atrazine, considered to be the most widely used synthetic herbicide in the world. This may also be helped by the problems with atrazine and its current ban by several countries due to its contamination of water sources.

The presence of falcarinol at very high percentages in *Eryngium* (93% for some harvesting stations) brings the perspective of considering this essential oil as a possible source of this molecule since it is the only source described in the literature that presents falcarinol at such high rates. The good results of falcarinol's activities as a herbicide, antibacterial against *Pseudomonas* and *Pectobacterial* and antifungal against *Fusarium* at very low concentrations, therefore allows us to consider its use on an industrial scale for crop protection.

The essential oil of *S. olusatrum* has shown more interesting herbicidal activity, also better than furanoermophilone. Our work has shown that this activity is not only due to the major compound (furanoermophilone), which was tested as a pure molecule and did not give similar results as the essential oil, but that it is rather a synergistic effect between the different molecules of this oil that is responsible for this activity. In addition to the herbicidal activity, this oil has also shown very good results as antifungal activity against *Zymoseptoria* and *Fusarium*, which gives it a wide spectrum of use as a bioherbicide, biofungicide and also antibacterial agent in organic farming and crop protection.

In addition, both compounds gave interesting results which could be useful to limit transmission of water-borne parasitic diseases in endemic areas. In this sense, the World Health Organization (WHO) via "WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases (NTD)" stimulates strategies to control parasitic diseases through ecological control of population of the intermediate host, such as *B. glabrata* snails for schistosomiasis control. Both compounds studied here presented molluscicide properties, even in different levels, and should be considered instead of deleterious chemical pesticides, such as Roundup (glyphosate) [31]. In the past decades, many plants were tested as a source of potential phytochemical molluscicides [32–34], and *E. triquetrum* and its major component (falcarinol) are promising as molluscicides against the fresh snail *B. glabrata*, meeting the requirements of WHO for use as a natural molluscicide [35].

The two essential oils tested in this work reinforce the willingness to use natural substances as healthy control substances against pests affecting the development of organic agriculture and crop protection worldwide.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material and Oil Isolation

The aerial parts of *E. triquetrum* and root parts of *S. olusatrum* were harvested from May to June 2017 and December 2016, respectively, for each species, during the vegetative cycle of the plant, in northwestern Algeria (Tlemcen). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen (voucher numbers of each specimen analyzed are ET-1011-S1 and SO-1012-S1, respectively, for *E. triquetrum* and *S. olusatrum*). The essential oils were obtained from the aerial parts and fresh roots of both species, through a 4 h hydrodistillation process with a Clevenger-type device, which met the European Pharmacopoeia standards [36] and yielded (*w/w*) from 0.035 to 0.078% of *E. triquetrum* and 0.004 to 0.009% of *S. olusatrum*.

4.2. Gas Chromatography

Essential oil samples were analyzed for each individual plant with a Thermo Scientific Focus GC with a flame ionization detector (FID) using a DB-5 fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) and SPB-1 with helium as the carrier gas (flow 1.0 mL min⁻¹) and an injection volume of 1 µL (2% solution in cyclohexane); the initial pressure was 1.0 Pa (Thermo Electron SAS, Villebon-sur-Yvette, France) The column temperature was programmed as follows: 60 °C for 3 min, 60–240 °C (3 °C min⁻¹), 240–300 °C (10 °C min⁻¹) and 300 °C for 10 min. The injector temperature was 250 °C, with injection in the "splitless"

mode. The analyses lasted 80 min. Samples were analyzed in triplicate. The retention indices (RIs) of the compounds were determined to the retention times (RT) for a series of n-alkanes (C7–C40): commercial solution, using the equation of Van den Dool and Kratz.

4.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry

The essential oils were also analyzed and identified using mass spectrometry in chromatography coupled to mass selective detector DSQ II with the same conditions as above. The condition had impact energy of 70 eV. Qualitative analysis of compounds was based on the comparison of their spectral mass and their relative retention time with those of NIST mass spectra database and Kovats RI on the chromatograms recorded in full scan or in SIM mode using the characteristic ions.

4.4. Compound Identification

Identification of the components was based on a comparison of their GC retention indices (RI) with data found within the literature [37,38], and/or from MS databases [39].

4.5. Oil Fractionation

Collective oils of *E. triquetrum* and *S. olusatrum* were obtained from a mixture of all individual essential oils prepared from plant material harvested in west Algerian locations. For *E. triquetrum*, collective oil was fractionated and falcarinol was purified (99%). Essential oil (105 mg) was separated on a chromatographic column using silica gel and cyclohexane-diethylether as eluent. Falcarinol was purified by thin layer chromatography (TLC) using KMnO_4 as revelator. A mass of 65.7 mg of yellow colored oil was obtained at 99% purity (determined by GC analysis). In order to know the configuration of falcarinol, the measurement of the rotatory power is necessary. Optical rotation of falcarinol was measured in chloroform, using a polarimeter model ATAGO, POLAX-2L (Ficher Bioblock Scientific, Illkirch, France) The test consisted of measuring the rotatory power of the oil at 0.5% and the purified falcarinol at 0.5%. $\alpha_D(\text{oil}) = +30^\circ$, $\alpha_D(\text{falcarinol}) = +46^\circ$.

S. olusatrum collective oil was fractionated. A 391 mg portion of the latter was fractionated on a conventional silica gel column. The eluting solvents were n-hexane (A) and ethyl acetate (B), which yielded several fractions (a-i) with an elution gradient: a (A: 100%; B: 0%), b (A: 98%, B: 2%), c (A: 97%, B: 3%), d (A: 96%, B: 4%), e (A: 95%; B: 5%), f (A: 90%, B: 10%), g (A: 85%, B: 15%), h (A: 50%, B: 50%), i (A: 0 % B: 100%).

4.6. Phytotoxicity Assays

4.6.1. Germination

Determination effects on pregermination were performed on watercress seeds (*Lepidium sativum*) on cellulose disks in Petri dishes according to [40] with some modifications. Ten seeds were placed on each disk and soaked in 2 mL of solution containing the essential oil. A final concentration of 0.1 and 0.01 mg/mL of essential oil in 1% DMSO was used. Four replicates were performed for each concentration. The effect of the treatments on germination and growth rate was evaluated through periodic counting (every 24 h) of the number of seeds that sprouted, as well as the length of the stems and roots.

4.6.2. Thylakoid Activity

Thylakoid Membrane Preparation

Thylakoid membranes were isolated from spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.), according to methods reported by Rouillon et al. [41]. First, 100 g of fresh leaves was washed with distilled water and homogenized in 300 mL of extract buffer. The homogenate was filtered through sieves with a pore diameter of 100 μm , and then centrifuged for 2 min at 3300 RPM. Supernatant was eliminated and the pellet was resuspended in the flushing solution and centrifuged for 1 min at 3300 RPM. Pellet was resuspended in 1 mL of distilled water to disrupt chloroplasts. The obtained thylakoid membranes were stirred for 10 s. Thylakoid membranes were then placed in the flushing solution and centrifuged for 2 min

at 3300 RPM. The pellet was resuspended in the immobilization buffer. The concentration of chlorophyll was estimated. The preparation was diluted to 2 mg chlo/mL by immobilization (manitol, 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, ethylene diamine tetra-acetic acid and bovine serum albumin) buffer and stored in liquid nitrogen.

Determination of Thylakoid Membrane Activity

Thylakoid membrane activity was estimated, according to the method reported by [42], with several modifications. Thylakoid membranes were diluted to 30 µg chlo/mL with the immobilization buffer. Samples containing 30 µL of thylakoid membrane solution were mixed with 20 µL of DMSO 37.5% (control) or herbicide solution (atrazine 100 µM) or with an essential oil of 0.1, 0.05, 0.01 mg/mL, 100 µL 0.3 mM DPIP in 0.1 M MOPS (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid), at a pH of 6.5 in the micro titer plate wells. Thylakoid membranes were prepared earlier and stored in micro titer plates in the dark at 4 °C. The samples were illuminated for 20 min with an OSRAM L 36 W/ 865; SYLVANIA F 36 W/ GRO-T8 lamp and absorbance was measured at 530 nm using reader Thermo Scientific Varioskan LUX. The initial and final absorbencies for each well were recorded. The activity of thylakoid membrane preparations was calculated from the data on the amount of reduced DPIP, the concentration of chlorophyll and the time of illumination, and was expressed as µmol DPIP/mg/chl/h.

4.6.3. Growth Assay on the Model Grass Watercress (*Lepidium sativum*)

For optimal seed emergence growth, the following proper proportion of compost and soil must be mixed: 1/3 compost and 2/3 soil. The soil was put in pots (40 g), and to keep the soil moist, 15 mL of tap water was added to each box. Rows of *L. sativum* seeds were added to each pot, with 3 seeds per row and a total of 3 rows (9 seeds) per pot. Essential oils at a concentration of 82.8 mg/100 mL of water with 0.35% DMSO were used as the test and control compounds. Sulcotrine served as a positive control, while water with 0.35% DMSO served as a negative control. Next, 1 mL of each solution was sprayed in each of the pots. The assay was carried out in triplicate. Observations were made daily.

4.6.4. Ecotoxicology Test on *Artemia* larvae (*Artemia salina*)

Harvesting Larvae of *Artemia* (48 h before the Test)

Artemia salina larvae were lyophilized in a Petri dish containing seawater prepared from synthetic sea salt (3.5 g in 100 mL of distilled water). A foil-covered lid was placed on half of the box which was then positioned under a lamp for 48 h. After hatching, the larvae naturally moved to the lit area of the box.

Assay

The test was carried out in 96-well micro plates according to the method reported by [43]. A preliminary test was performed with a wide range of concentrations (100, 500 and 1000 ppm) to determine the optimal concentration range (results not shown). Following this preliminary test, a secondary test was performed with higher concentrations (5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 mg/mL) of each oil in order to estimate the IC₅₀. Each concentration was tested in triplicate. In each well, we placed 2 µL of oil, 198 µL of seawater and 10 shrimp. Controls were made by depositing 100% seawater containing 1% solubility solvent (DMSO). After 24 and 48 h, the number of dead shrimp was determined through the binocular observation of shrimp mobility.

4.6.5. Ecotoxicological Test against *Biomphalaria glabrata*

Harvesting the Freshwater Snail *B. glabrata*

B. glabrata originating from Recife Brazil (BgBRE2) was used for this study. These snails were maintained in rearing chambers at 26 °C, 12/12 h light/dark period and fed ad libitum with fresh lettuce. A Puerto Rican strain (NMRI) of *S. mansoni* was used in this

study to determine the effects of molluscicide on the susceptibility of infected snails and host–parasite compatibility.

Molluscicidal Bioassays

Biological assays against the snail *B. glabrata* were carried out with 12 snails with shell diameters from 6–8 mm individually exposed to different concentrations of essential oil or DMSO used as control. All snails were immersed for 24 h and then washed and transferred to tanks filled with drilling water. Snails were fed with fresh lettuce ad libidum during the observation period (48 h). Each snail was observed under binocular microscope to appreciate the heart movements.

4.7. Screening for Antibacterial Activity

4.7.1. Bacterial Strain

Antimicrobial activity was tested in vitro against *Pectobacterium atrosepticum* (strain CFBP-5384) and *Pseudomonas cichorii* (strain CFBP 4407) provided by the Stock Culture Collections of Phytopathogenic Bacteria (CFBP, INRA Angers, France). Bacteria were maintained for extended periods as deep-frozen cultures (−20 °C) and cultivated on King B Agar Medium at 25 °C for 48 h. Strain was grown in peptone water liquid nutritive medium (WPN) at 25 °C overnight for use in the antibacterial activity test.

4.7.2. Antibacterial Activity against Phytopathogens

The microplate bioassay (microdilution) was used to study the antimicrobial activities of *P. atrosepticum* and *P. Cichorii*, according to the method reported by Meziani et al. [44]. The essential oil dissolved in aqueous dimethylsulfoxide (DMSO) at 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.312 mg/mL concentration was pipetted into sterile 96-well plates based on a National Committee for Clinical Laboratory Standard method (NCCLS).

The bacterial suspension was adjusted with sterile distilled water to 2.105 cfu/mL concentration. In brief, 96-well plates were prepared by dispensing 198 µL of microorganism suspension into each well. Then, 2 µL from their serial dilutions of extracts was transferred into five consecutive wells. The last well containing 198 µL of WPN medium and 2 µL of the serial dilutions of extracts was used as a negative control. The final volume in each well was 200 µL. The plate was covered with a sterile plate sealer and then incubated at 25 °C for 48 h. After agitation, microorganism growth was estimated by reading absorbance in microplate wells at 600 nm with a Microplate Reader Thermo Scientific Varioskan LUX (Life Technologies SAS, Villebon-sur-Yvette, France). We used chloramphenicol at a concentration of 10 µg/mL as a positive control. Inhibition of bacterial growth was measured after 24 h of incubation at 23 °C using a digital caliper which made it possible to calculate growth inhibition with the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = [(DO_{\text{control}} - DO_{\text{extrait}}) / DO_{\text{control}}] \times 100$$

4.8. In Vitro Antifungal Activity of Selected Extracts on Mycelial Growth

4.8.1. Fungal Strains

Botrytis cinerea, *Fusarium graminearum*, *Zymoseptoria tritici* and *Penicillium expansum* (IP 1854.89; MAT REF 04-14-02-02; CBS 398.52 and IP 1350.82) were grown on malt agar medium and incubated at 23 °C in darkness.

4.8.2. Antifungal Activity by Contact Method

The essential oils were evaluated for antifungal activity based on their ability to inhibit mycelial growth [45]. First, 10 µL of essential oils was put on a cellulose disk. The latter was placed in the middle of the agar in a Petri dish. A 3 mm diameter mycelial buffer of each pathogen from a 7-day-old culture was placed in the center of the medium. The negative control (100% medium and cellulose disk without essential oil) and the positive control (a 10 ppm solution of tebuconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)) were

prepared in the same way. Each treatment was applied in triplicate. The radial growth of the mycelium was measured after 1 to 6 days of incubation at 23 °C using a digital caliper which allowed calculating the index with the following formula:

$$\text{Antifungal index (\%)} = (1 - Da/Db) \times 100$$

where Da is the diameter of growth zone in the experimental plate (cm) and Db is the diameter of growth zone in the control plate (cm).

4.8.3. Fumigant Antifungal Activity

Essential oils were evaluated for fumigant antifungal activity based on their ability to inhibit mycelial growth, according to Benomari et al. [4]. Six-millimeter-diameter mycelial plugs for each fungal strain from a 7-day-old culture were placed into a Petri dish. Essential oils were introduced onto a 6 mm cellulose disk and placed on the agar-free lid of the Petri dish. The antifungal strains used in this method are the same as those used in the previous method (antifungal activity by contact method). A negative control (cellulose disk without essential oil) was performed in the same way. Petri dishes were then sealed with parafilm and incubated at 23 °C in the dark. Mycelial radial growth was measured after 3 to 7 days of incubation, and the antifungal index was calculated with the formula as follows:

$$\text{Antifungal index (\%)} = (1 - Da/Db) \times 100$$

5. Conclusions

The present study describes the chemical composition and herbicidal, antifungal, antibacterial and molluscicidal activities of two Algerian essential oils, *E. triquetrum* oil, which is dominated by falcarinol (a C-17 polyacetylene with interesting biological activities) and *S. olusatrum* oil, which is rich in furanosesquiterpenes (mainly furanoeremophilone).

Capillary GC-FID and GC/MS-IE were used to investigate chemical composition of both essential oils. Collective essential oil of *E. triquetrum* was dominated by falcarinol (74.8%) and octane (5.6%). Collective essential oil of *S. olusatrum* was dominated by furanoeremophilone (31.5%), furanodiene+curzurenene (19.3%) and (E)- β -caryophyllene (11%).

Activity stemming from *E. triquetrum* essential oil, which has high falcarinol content, was of great interest, as falcarinol is responsible for many important biological activities such as antimicrobial activity as well as potentially interesting herbicidal and ecotoxic activities. *E. triquetrum* essential oil and isolated falcarinol are promising against fresh snail *B. glabrata*, main intermediate host of schistosomiasis. In addition, *E. triquetrum* oil and falcarinol have shown interesting results as an alternative molluscicidal agent to reduce snail infections with schistosomes in transmission foci. Future research could investigate the biological activity of synthetic or natural falcarinol and its derivatives to develop new agents to prevent schistosomiasis transmission.

The *E. triquetrum* oil tested and a pure falcarinol (99%) showed virtuous herbicidal and antibacterial activities against potato blackleg disease, *Pectobacterium atrosepticum*, and Gram-negative soil bacterium, *Pseudomonas cichorii* (85 and 100% inhibition, respectively), and high ecotoxic activity against brine shrimp, *Artemia salina*, with an IC₅₀ of 0.35 μ g/mL. In the same case, essential oil of *S. olusatrum* showed interesting antibacterial and ecotoxic activity and good herbicidal activity against watercress seeds, *Lepidium sativum* (74% inhibition of photosynthesis, 80% mortality on growth test on model watercress), while the furanoeremophilone isolated from the oil (99% pure) showed moderate herbicidal activity.

Both essential oils showed excellent antifungal activity, especially against *Fusarium*. Both *E. triquetrum* and *S. olusatrum* essential oils and their major compounds could be considered as biocontrol agents to protect trees from bacteria and may serve as important alternatives to chemical pesticides in crop protection.

Author Contributions: N.D., C.B., D.D., A.P. and Y.B. conceived and designed the experiments. N.M., V.A., R.d.C.A. and S.C. performed the experiments. N.M., C.B., R.d.C.A., A.P., Y.B. and N.D. wrote the manuscript. A.P., Y.B., D.D. and N.D. revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors gratefully thank Jeanine Almany for providing English language editing (as well as constructive comments) which improved the manuscript. The spectroscopic experiments have been performed using the Biodiversité et Biotechnologies Marines (Bio2Mar, <http://bio2mar.obsbanyuls.fr/fr/index.html>, last access on July 2019) facilities at the University of Perpignan via Domitia.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. BouayadAlam, S.; Dib, M.A.; Djabou, N.; Tabti, B.; Guauar, N.; Costa, J.; Muselli, A. Essential oils as biocides for control of fungal infections and devastating pest (*Tutaabsoluta*) of Tomato (*Lycopersiconesculentum* Mill.). *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1700065. [[CrossRef](#)]
2. Dudai, N.; Mayber, A.P.; Mayer, A.M. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 1079–1089. [[CrossRef](#)]
3. Mejdoub, K.; Benomari, F.Z.; Djabou, N.; Dib, M.A.; GaouarBenyelles, N.; Costa, J.; Muselli, A. Antifungal and insecticidal activities of essential oils of four *Mentha* species. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* **2019**, *14*, e64165.
4. Benomari, F.Z.; Andreu, V.; Kotarba, J.; Dib, M.A.; Bertrand, C.; Muselli, A.; Costa, J.; Djabou, N. Essential oils from Algerian species of *Mentha* as new bio-control agents against phytopathogen strains. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 29889–29900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tabet Zatl, A.; Dib, M.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**, *25*, 391–399.
6. Bouzergoune, F.; Ciavatta, M.L.; Bitam, F.; Carbone, M.; Aberkane, M.C.; Gavagnin, M. Phytochemical Study of *Eryngium triquetrum*: Isolation of Polyacetylenes and Lignans. *Med. Plant.* **2016**, *82*, 1438–1445. [[CrossRef](#)]
7. Medbouhi, A.; Benbelaid, F.; Djabou, N.; Beaufay, C.; Bendahou, M.; Quetin-Leclercq, J.; Tintaru, A.; Costa, J.; Muselli, A. Essential oil of Algerian *Eryngium campestre*: Chemical variability and evaluation of biological activities. *Molecules* **2019**, *24*, 2575. [[CrossRef](#)]
8. Augusto, R.C.; Merad, N.; Rognon, A.; Gourbal, B.; Bertrand, C.; Djabou, N.; Duval, D. Molluscicidal and parasiticidal activities of *Eryngium triquetrum* essential oil on *Schistosoma mansoni* and its intermediate snail host *Biomphalaria glabrata*, a double impact. *Parasites Vectors* **2020**, *13*. [[CrossRef](#)]
9. Cianfaglione, K.; Blomme, E.E.; Quassinti, L.; Brumucci, M.; Lupidi, G.; Dall'Acqua, S.; Maggi, F. Cytotoxic essential oils from *eryngium campestre* and *eryngium amethystinum* (Apiaceae) growing in central Italy. *Chem. Biodivers.* **2017**, *14*, e1700096. [[CrossRef](#)]
10. Kumar, P.; Singh, V.K.; Singh, D.K. Bait formulations of molluscicides and their effects on biochemical changes in the ovotestis of snail *Lymnaea acuminata* (Mollusca; Gastropoda: Lymnaeidae). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2011**, *53*, 271–275. [[CrossRef](#)]
11. Medbouhi, A.; Tintaru, A.; Beaufay, C.; Naubron, J.V.; Djabou, N.; Costa, J.; Muselli, A. Structural elucidation and cytotoxicity of a new 17-membered ring lactone from Algerian *Eryngium campestre*. *Molecules* **2018**, *23*, 3250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Medbouhi, A.; Merad, N.; Khadir, A.; Bendahou, M.; Djabou, N.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical Composition and Biological Investigations of *Eryngium triquetrum* Essential Oil from Algeria. *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*, e1700343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Purup, S.; Larsen, E. Differential effects of falcarinol and related aliphatic C-17 polyacetylenes on intestinal cell proliferation. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8290–8296. [[CrossRef](#)]
14. Liu, G.; Lai, D.; Liu, Q.Z.; Zhou, L.; Liu, Z.L. Identification of nematicidal constituents of *Notopterygium incisum* rhizomes against *Bursaphelenchus xylophilus* and *Meloidogyne incognita*. *Molecules* **2016**, *21*, 1276. [[CrossRef](#)]
15. Xu, L.L.; Han, T.; Wu, J.Z.; Zhang, Q.Y.; Zhang, H.; Huang, B.K.; Rahman, K.; Qin, L.P. Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. *Phytomedicine* **2009**, *16*, 609–616. [[CrossRef](#)]
16. Quassinti, L.; Maggi, F.; Barboni, L.; Ricciutielli, M.; Cortese, M.; Papa, F.; Garulli, C.; Kalogris, C.; Vittori, S.; Bramucci, M. Wild celery (*Smyrniolusastrum* L) oil and isofuranodiene induce apoptosis in human colon carcinoma cells. *Fitoterapia* **2014**, *97*, 133–141. [[CrossRef](#)]
17. Cespi, M.; Quassinti, L.; Perinelli, D.R.; Bramucci, M.; Iannarelli, R.; Papa, F.; Ricciutielli, M.; Bonacucina, G.; Palmieri, G.F.; Maggi, F. Microemulsions enhance the shelf-life and process ability of *Smyrniolusastrum* L. essential oil. *Flavour Frag. J.* **2016**, *34*, 159–164.

18. Maggi, F.; Papa, F.; Giuliani, C.; Bini, L.M.; Venditti, A.; Bianco, A.; Nicoletti, M.; Iannarelli, R.; Caprioli, G.; Sagratini, G.; et al. Essential oil chemotypification and secretory structures of the neglected vegetable *Smyrniium olusatrum* L (Apiaceae) growing in central Italy. *Flavour Frag. J.* **2015**, *30*, 139–159. [[CrossRef](#)]
19. Messaoud, C.; Benabdallah, A.; Boussaid, M. Phytochemicals, Antioxidant and α -amylase inhibitory activities of *Smyrniium olusatrum* L leaf flower and fruit. *Ser. F. Biotechnol.* **2013**, *17*, 212–219.
20. Mustafa, A.M.; Maggi, F.; Papa, F.; Kaya, E.; Dikmen, M.; Ozturk, Y. Isofuranodiene: A neurotoxic compound isolated from wild celery (*Smyrniium olusatrum* L, Apiaceae). *Food Chem.* **2016**, *192*, 782–787. [[CrossRef](#)]
21. Quassinti, L.; Bramucci, M.; Lupidi, G.; Barboni, L.; Ricciutelli, M.; Sagratini, G.; Papa, F.; Caprioli, G.; Petrelli, D.; Vitali, L.A.; et al. In vitro biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniium olusatrum* L (Apiaceae). *Food Chem.* **2013**, *1382*, 808–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Molleken, U.; Sinnwell, V.; Kubeczka, K.H. Essential oil composition of *Smyrniium olusatrum*. *Phytochemistry* **1998**, *38*, 603–698. [[CrossRef](#)]
23. Benelli, G.; Pavela, R.; Canale, A.; Nicoletti, M.; Petrelli, R.; Cappellacci, L.; Galassi, R.; Maggi, F. Isofuranodiene and germacrone from *Smyrniium olusatrum* essential oil as acaricides and oviposition inhibitors against Tetranychus urticae: Impact of chemical stabilization of isofuranodiene by interaction with silver triflate. *J. Pest. Sci.* **2017**, *90*, 693–699. [[CrossRef](#)]
24. Sabzi Nojadeh, M.; Pouresmaeil, M.; Younessi, H.M.; Venditti, A. Phytochemical profile of fennel essential oils and possible applications for natural antioxidant and controlling *Convolvulus arvensis* L. *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 1–5. [[CrossRef](#)]
25. Benelli, G.; Pavela, R.; Iannarelli, R.; Petrelli, R.; Cappellacci, L.; Cianfaglione, K.; Afshar, F.H.; Nicoletti, M.; Canale, A.; Maggi, F. Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: Larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *96*, 186–195. [[CrossRef](#)]
26. Gerasimia, T.; Marina, S.; Ana, C.; Effimia, E.; Eleni, S.; Yiannis, S.; Helen, S. Antifungal compounds isolated from *Smyrniium olusatrum* L essential oil, growing wild in Cephalonia, Greece Chemical analysis and structure elucidation. *Rec. Nat. Prod.* **2016**, *10*, 93.
27. Wang, Y.; Li, J.; Guo, J.; Zhu, S.; Gao, S.; Yang, C.; Wei, M.; Pan, X.; Ding, D.; Zhang, W.; et al. Cytotoxic and Antitumor Effects of Curzerene from *Curcuma longa*. *Med. Plant.* **2017**, *83*, 23–29.
28. Marimuthu, G.; Mohan, R.; Sengamalai, S.; Periasamy, V.; Naiyf, A.; Shine, K.; Jamal, K.; Giovanni, B. Curzerene, trans- β -elemenone, and γ -elemene as effective larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus*: Toxicity on non-target aquatic predators. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 10272–10282.
29. Bouayad Alam, S.; Guaouar, 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.
30. Tabti, L.; Dib, M.A.; Djabou, N.; Benyelles, N.; Paolini, J.; Costa, J.; Muselli, A. Control of fungal pathogens of *Citrus sinensis* L. by essential oil and hydrosol of *Thymus capitatus* L. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2014**, *87*, 279–285.
31. Augusto, R.C.; Duval, D.; Grunau, C. Effects of the environment on developmental plasticity and infection success of Schistosoma parasites—An epigenetic perspective. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Augusto, R.C.; Tetreau, G.; Chan, P.; Walet-Balieu, M.-L.; Mello-Silva, C.C.; Santos, C.P. Double impact: Natural molluscicide for schistosomiasis vector control also impedes development of Schistosoma mansoni cercariae into adult parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jurberg, P.; Vasconcellos, M.C.; Mendes, N.M. Plantas empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1989**, *84*, 76–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Singh, S.K.; Yadav, R.P.; Singh, A. Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India. *J. Appl. Toxicol.* **2010**, *30*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. WHO. Global Vector Control Response: An Integrated Approach for the Control of Vector-Borne Diseases. 2017. Available online: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275708/A70_R16-en.pdf (accessed on 15 November 2020).
36. Council of Europe. *European Pharmacopoeia*; Council of Europe: Strasbourg, France, 1997; Available online: <https://pheur.edqm.eu/home> (accessed on 15 September 2018).
37. Jennings, W.; Shibamoto, T. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass-Capillary Gas Chromatography*; Jovanovich, H.B., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1980.
38. König, W.A.; Hochmuth, D.H.; Joulain, D. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils Library of Mass Finder 21*; Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg: Hamburg, Germany, 2001.
39. McLafferty, F.W.; Stauffer, D.B. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data*; Wiley-Interscience Ed: New York, NY, USA, 1988.
40. Füller, T.H.; Bertrand, C.; Antonello, B.; Wesp, C.; Ichausti, I.B.; Barbosa-Neto, J.F. Chemical diversity of wild populations of *Elionurus muticus* (Spreng) and the allelopathic effect of its essential oil. *J. Essent. Oil Res.* **2017**, *29*, 499–506. [[CrossRef](#)]
41. Rouillon, R.; Mestres, J.J.; Marty, J.L. Entrapment of chloroplasts and thylakoids in polyvinyl alcohol polymers Optimization of membrane preparation and storage conditions. *Anal. Chem. Acta* **1995**, *311*, 437–442. [[CrossRef](#)]
42. Piletskaya, E.V.; Piletsky, S.A.; Sergeeva, T.A.; El'skaya, A.V.; Sozinov, A.A.; Marty, J.L.; Rouillon, R. Thylakoid membranes-based test-system for detecting of trace quantities of the photosynthesis-inhibiting herbicides in drinking water. *Anal. Chem. Acta.* **1999**, *391*, 1–7. [[CrossRef](#)]

-
43. Füller, T.H.; Bertrand, C.; Simon, A.; Inchausti, I.B. *Elionurus muticus* as an Alternative source of citral from Pampa biome, Brazil. *J. Oleo. Sci.* **2014**, *49*, 1109–1116. [[CrossRef](#)]
 44. Meziani, S.; Oomah, B.; Zaidi, F.; Simon-Levert, A.; Bertrand, C.; Yahiaoui, R.Z. Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. *Microb. Pathog.* **2015**, *78*, 95–102. [[CrossRef](#)]
 45. Andreu, V.; Levert, A.; Amiot, A.; Cousin, A.; Aveline, N.; Bertrand, C. Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 1–14. [[CrossRef](#)]

Article 2: Molluscicidal and parasiticidal activities of *Eryngium triquetrum* essential oil on *Schistosoma mansoni* and its intermediate snail host *Biomphalaria glabrata*, a double impact

R. de Carvalho Augusto, N. Merad , A. Rognon , B. Gourbal , C. Bertrand , N. Djabou, D. Duval.” Molluscicidal and parasiticidal activities of *Eryngium triquetrum* essential oil on *Schistosoma mansoni* and its intermediate snail host *Biomphalaria glabrata*, a double impact”, *parasites & vectors.*, vol. 13. 2020

RESEARCH

Open Access



Molluscicidal and parasiticidal activities of *Eryngium triquetrum* essential oil on *Schistosoma mansoni* and its intermediate snail host *Biomphalaria glabrata*, a double impact

Ronaldo de Carvalho Augusto^{1,2†}, Nadjiya Merad^{3†}, Anne Rognon^{1,2}, Benjamin Gourbal^{1,2}, Cédric Bertrand^{4,5,6}, Nassim Djabou^{3*} and David Duval^{1,2*} 

Abstract

Background: Freshwater snails are the intermediate hosts of a large variety of trematode flukes such as *Schistosoma mansoni* responsible for one of the most important parasitic diseases caused by helminths, affecting 67 million people worldwide. Recently, the WHO Global Vector Control Response 2017–2030 (GVCR) programme reinforced its message for safer molluscicides as part of required strategies to strengthen vector control worldwide. Here, we present the essential oil from *Eryngium triquetrum* as a powerful product with molluscicide and parasiticide effect against *S. mansoni* and the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*.

Methods: In the present study, we describe using several experimental approaches, the chemical composition of *E. triquetrum* essential oil extract and its biological effects against the snail *B. glabrata* and its parasite *S. mansoni*. Vector and the free-swimming larval stages of the parasite were exposed to different oil concentrations to determine the lethal concentration required to produce a mortality of 50% (LC₅₀) and 90% (LC₉₀). In addition, toxic activity of this essential oil was analyzed against embryos of *B. glabrata* snails by monitoring egg hatching and snail development. Also, short-time exposure to sublethal molluscicide concentrations on *S. mansoni* miracidia was performed to test a potential effect on parasite infectivity on snails. Mortality of miracidia and cercariae of *S. mansoni* is complete for 5, 1 and 0.5 ppm of oil extract after 1 and 4 h exposure.

Results: The major chemical component found in *E. triquetrum* oil determined by GC-FID and GC/MS analyses is an aliphatic polyacetylene molecule, the falcarinol with 86.9–93.1% of the total composition. The LC₅₀ and LC₉₀ values for uninfected snails were 0.61 and 1.02 ppm respectively for 24 h exposure. At 0.5 ppm, the essential oil was two times more toxic to parasitized snails with a mortality rate of 88.8 ± 4.8%. Moderate embryonic lethal effects were observed

*Correspondence: nassim.djabou@mail.univ-tlemcen.dz; david.duval@univ-perp.fr

†Ronaldo de Carvalho Augusto and Nadjiya Merad contributed equally to this work

¹ University Perpignan Via Domitia, IHPE, UMR 5244, CNRS, IFREMER, Perpignan, France

³ Faculté des Sciences, Département de Chimie, Université de Tlemcen, Laboratoire COSNA, Tlemcen, Algeria

Full list of author information is available at the end of the article



at the concentration of 1 ppm. Severe surface damage in miracidia was observed with a general loss of cilia that probably cause their immobility. Miracidia exposed 30 min to low concentration of plant extract (0.1 ppm) were less infective with 3.3% of prevalence compare to untreated with a prevalence of 44%.

Conclusions: Essential oil extracted from *E. triquetrum* and falcarinol must be considered as a promising product for the development of new interventions for schistosomiasis control and could proceed to be tested on Phase II according to the WHO requirements.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*, *Eryngium triquetrum*, Molluscicide, Oil, Parasiticide, *Schistosoma mansoni*

Background

Water-borne infectious diseases, mainly those involving digenetic parasites, are mediated by both ecological and socioeconomic processes, and constitute an important public health problem in developing countries [1]. Schistosomiasis is one of the most common parasitic diseases worldwide [2]. It is particularly prevalent among people living in rural or deprived urban or peri-urban settings with limited access to clean water and with inadequate sanitation provision [3, 4]. Digenetic schistosomes have complex life-cycles entailing both mammalian hosts, including humans, and freshwater snail hosts. During their development, schistosomes have to deal with organic and inorganic compounds once in freshwater and then must face a multitude of molecules once inside both hosts [5]. For the control of schistosomiasis, the World Health Organization (WHO) recommends the mass administration of the chemotherapeutic praziquantel (PZQ), but also health education, technical cooperation between health institutions and research to verify the elimination of infection, and control of snail populations [2, 6].

The complexity of the parasite life-cycle gives rise to a complex list of requirements to obtain a successful control programme. Traditional models based exclusively on the use of schistosomicidal drugs have proven to significantly reduce morbidity in infected individuals, but the prevalence in the field remains high after decades of treatment. Indeed, continuous mass drug administration (MDA) campaigns in Africa and Brazil with PZQ, were not successful to eradicate the disease and a high prevalence and territorial expansion of infection areas are still detected worldwide [7]. Besides this, control strategies based only on one trial are struggling and deserve special attention since cases of rapid adaptation of the parasites to various treatment or specific environmental cues have been documented [5, 7–10]. To integrate MDA approaches, the WHO recommends the use of the synthetic molluscicide niclosamide (Bayluscide®) as one of the strategies to fight schistosomiasis in the field [2]. However, niclosamide has high a production value and

can induce several secondary effects, such as bioaccumulation and high toxicity in non-target animals [11]. Also, snails resistant to niclosamide appeared recently and thus finding new molluscicides becomes necessary [12]. It is currently expected that we will see the development of a new class of safer molluscicides, which should be less harmful to the non-target organisms and, if possible, will be more selective to snails infected with schistosomes [13]. Increasing efforts have been made to focus on identifying and characterizing plant-derived molluscicides as safer alternatives [14–19].

In this study, we have focused on an essential oil extracted from *Eryngium triquetrum*. This Apiaceae is an endemic species of northern Africa, distributed in all parts of Algeria; the green perennial plant becomes a bluish-purple color when ripe. This species grows particularly well in rocky pastures. It was considered as a ruderal species, which the local people call ‘choukzerk’ [20]. No traditional use for this thorny plant has been reported by the Algerian population. However, species of the genus *Eryngium* are used as a folk remedy for the treatment of various inflammatory disorders, and as an emetic infusion, antidote for poisons, hypoglycemic, antitussive and diuretic agents [21–24]. Species of *Eryngium* have been subjects of many phytochemical studies. For example, hexanic extract of *E. campestre* showed anti-trypanosomal and leishmanial activities [23]. *Eryngium caeruleum* extract displayed antimicrobial activities [25]. The essential oil of *E. triquetrum* for which the chemical composition was reported exhibits a moderate antibacterial action against Gram-positive and Gram-negative bacteria [23].

In order to further analyze the biological activity of *E. triquetrum*, we characterize and investigate the toxic effects of its essential oil against *S. mansoni* free-swimming stages (miracidia and cercariae) and on adults and embryos of the snail *B. glabrata*. Our results suggest that this biological compound could be used as a biological control agent against *B. glabrata* snails and its parasite *S. mansoni*.

Methods

Plant material and essential oil extraction

The fresh stems of *E. triquetrum* were harvested from June 2017, from three localities of northwest Algeria (Samples ET01-ET03) as described in the Table 1.

The essential oil extractions were performed using a Clevenger-type apparatus according to the method recommended in the European Pharmacopoeia [26]. A sample of 400–500 g of the fresh plant was subjected to hydrodistillation.

Compound identification

The identification of individual components was based on: (i) the comparison of the retention indices (RIs) determined on nonpolar columns with those of authentic compounds or literature data [27]; (ii) computer matching of the mass spectra with commercial mass-spectral libraries; and (iii) the comparison of the mass spectra with those listed in our in-house library built of mass spectra of authentic compounds or literature data [28].

Compound quantification

Quantification of the oil components was performed using the methodology reported by Rubiolo et al. [29] and adapted in our laboratory [30]. Briefly, the compound quantification was carried out using peak normalization, including FID response factors (RFs) relative to tridecane (0.7 g/100 g) used as internal standard, and expressed as normalized contents (% abundances).

Gas chromatography

Essential oil samples were analyzed with Thermo Scientific Focus GC with Detector Flame Ionization (FID) using an SPB-1 column fused silica capillary (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) with helium as the carrier gas (flow rate 1.0 ml/min) and an injection volume of 1 μl (solution in cyclohexane); the initial pressure was 1.0 Pa. The oven temperature was programmed as follows: 60 °C for 3 min, 60–240 °C (3 °C min⁻¹), 240–300 °C (10 °C min⁻¹) and 300 °C for 10 min. The injector temperature was 235 °C, the detector temperature was 300 °C with injection in the 'splitless' mode. The analyses lasted 80 min. Samples were analyzed in triplicate. The retention indices (RIs) of the compounds were determined related to the retention times (RT) of a series of n-alkanes (C7-C40) using the Van den Dool-Kratz equation.

Gas chromatography-mass spectrometry

Thermo Scientific DSQ™ II gas chromatography coupled with a mass spectrometry detector, was performed with the same conditions that were previously described in Gas Chromatography. MS data were collected and processed on an Xcalibur™ version 1.4.1. For mass

spectrometry conditions, the electron ionization was 70 eV.

Experimentals animals

Biomphalaria glabrata originating from Recife, Brazil (BgBRE2), was used for this study. These snails were maintained in rearing chambers at 26 °C, 12:12 h light:dark photoperiod and fed *ad libitum* with fresh lettuce. A Puerto Rican strain (NMRI) of *S. mansoni* was used in this study to determine the effects of molluscicide on the susceptibility of infected snails and host-parasite compatibility.

Material collection and extraction of essential oil from *Eryngium triquetrum*

Control experiments were performed with 1% dimethyl sulphoxide (DMSO) diluted with distilled and sterile water. Each essential oil (ET01, ET02 and ET03) was dissolved in DMSO to obtain different solutions in the following concentrations: 1 g/ml, 200 mg/ml, 40 mg/ml, 10 mg/ml, 2 mg/l, 0.2 mg/ml and 0.02 mg/ml. Then, each stock solution was diluted in natural mineral water to prepare the different test solutions.

Molluscicidal bioassays

Biological assays against the snail *B. glabrata* were carried out following Phase I of stages of evaluation of molluscicides methods recommended by the WHO [31]. Briefly, 12 snails with shell diameters of 6–8 mm were individually exposed to different concentrations of essential oil or DMSO used as control into 12-well tissue culture plate (about 5.5 ml). All snails were immersed during 24 h and then washed and transferred to acrylic tanks filled with 5 liters with well water. Snails were fed with fresh lettuce *ad libitum* during the observation period (48 h). Each snail was observed under binocular microscope to appreciate the heart movements. No difference in mortality was found between the different recovery periods, 24 or 48 h respectively. To determine the lethal concentration LC₅₀, Probit analysis was used from the three independent experiments performed with the different extract of essential oil.

Table 1 Sample location of *Eryngium triquetrum* essential oil from three distinct geographical localities in Algeria

	ET01	ET02	ET03
Locality	Bouhanak	Ain fezza	Mefrouch
Latitude	35°08'16.22"N	34°52'37.96"N	34°50'59.19"N
Longitude	1°25'20.67"W	1°14'07.62"W	1°17'46.06"W
Altitude (m)	313	853	1108

Concerning assays on infected snails, each snail was exposed to 5 miracidia from the NMRI strain of *S. mansoni*. The procedures of miracidial recovery and snail infection were as conducted and described by Mone et al. [32]. Snail infection status was assessed by direct observation of daughter sporocysts through the shell of exposed snails. After 15 days of exposure to parasites, 20–30 infected snails were submitted to different doses of essential oil from *E. triquetrum* to compare their toxic sensitivity with non-infected snails. This experiment was repeated three times at different times by different experimenters.

Miracidicidal and cercariacidal properties of essential oil from *Eryngium triquetrum*

Miracidia from NMRI strain were hatched from eggs recovered from hamster livers after 50 days post-infection. Eggs were filtered and washed to obtain miracidia which were collected under illumination. About 300 freshly hatched miracidia were used to test the toxicity of the essential oil from *E. triquetrum*. Swimming behavior and mortality were investigated after 1 and 4 h of treatments. All observations were done using Zeiss LSM microscope and stereoscopic microscope.

Infected *B. glabrata* (BgBre2) were exposed to artificial light to induce cercarial emission. About 100 cercariae were collected and exposed to different concentrations of essential oil in duplicates. Immobile cercariae were considered as dead.

Impact of the active component derived from *Eryngium triquetrum* on *S. mansoni*-*B. glabrata* compatibility

The freshly hatched miracidia were recovered and exposed to 0.5 or 0.1 ppm of essential oil for 30 min. Then, each miracidium was collected individually to be placed with a single snail in 5 ml of dechlorinated water. For each condition, 42 snails were exposed individually to 1 miracidium which was treated with essential oil or left untreated. Prevalence was determined for each condition 40 days post-infection as described above.

Toxicity of *Eryngium triquetrum* essential oil on *B. glabrata* embryos

Toxicity of the essential oil was evaluated against egg masses exposed during 24 h at three concentrations (1, 0.5 and 0.1 ppm). Embryonic development of the snails in egg masses was followed for 20 days under a binocular microscope after egg hatching. Polystyrene sheets served as substrate for oviposition. Egg masses were collected gently to avoid damaging them and maintained in Petri dishes with Volvic water. Twenty-four hours after exposition, the egg masses were washed with Volvic water and placed in a cell culture plate (Sarstedt). No selection of

egg masses has been done according to the stage of development. The presence of all embryonic stages (blastula, gastrula, trochophore, veliger and hippo stage) has been checked. This toxicity test was carried out twice on more than 25 egg masses per condition.

Statistical analysis

In all biological assays, at least three independent experiments were conducted at different times. The results were expressed as the mean \pm standard deviation and subjected to the Fischer's exact test. The lethal dose concentrations (LC₉₀ and LC₅₀) for each essential oil were calculated using a program employing probit analysis [33].

Results

Chemical characterization of the essential oil extracted from *Eryngium triquetrum*

The sampling of plant material in the three locations of northwest Algeria has allowed the determination of the species with large availability. Hydrodistillation from the fresh aerial parts of the three Algerian samples yields respectively (w/w) 0.05%, 0.04% and 0.03% of essential oils. GC-FID and GC/MS analyses of the three samples and subsequent fractions obtained by column chromatography allowed the identification of 24 components, accounting for more than 95% of the total composition (Table 2). The essential oil contains mostly linear oxygenated compounds, dominated by falcarinol (86.9–93.1%), followed by octanal (1.0–1.8%) and nonanal (0.2–0.4%). Twenty-two components were identified by comparison of their retention indices and mass spectra with those in an in-house mass spectral library.

Toxic activity of essential oil from *Eryngium triquetrum* against adult *B. glabrata* snails

We independently assessed trial toxicity of three extractions of essential oil from *E. triquetrum* against adult *B. glabrata*, the vector snail of the trematode *S. mansoni*. At concentrations above 10 ppm, the mortality rate reached 100% whereby most of the exposed snails retracted into their shells with hemolymph expulsion. From concentrations of 0.5 to 1 ppm, the survival rate of exposed snails varied slightly between the three independent batches of oil extracted. Based on Probit analysis using the survival of treated snails to *E. triquetrum* oils, the concentration required to produce 50% mortality for deaths to 24 h after exposure (LC₅₀) was 0.51, 0.63, 0.69 ppm for ET02, ET03 and ET01 respectively (Fig. 1). As the different LC₅₀ values were relatively close, the following toxicity assays were performed with ET03 essential oil extract. Their LC₉₀ values were 0.9, 1.07 and 1.08 respectively.

Toxic activity of *Eryngium triquetrum* extract against infected snails

The molluscicidal activity of the essential oil from *E. triquetrum* was also tested against snails infected with *S. mansoni*. Different essential oil concentrations around the LC_{50} were used under the same conditions as those described previously. Interestingly, this plant-derived molluscicide seems to be more potent against infected snails. Indeed, no toxic effects were observed in non-infected snails for a concentration of 0.1 ppm while about 20% of infected snails were killed after 24 h exposure. At 0.5 ppm, the essential oil of *E. triquetrum* was 2 times more toxic to parasitized snails with a mortality rate of $88.8 \pm 4.8\%$ whereas it was $38.9 \pm 12\%$ in the non-infected snails (Fig. 2).

Embryotoxicity evaluation on snail eggs

Eryngium triquetrum extract was toxic to adult snails (infected or uninfected) in a dose-dependent manner (Figs. 1, 2). For the same range of concentrations, it appears that the egg masses are less sensitive to the essential oil extract. No difference of toxicity and lethality was observed in eggs exposed to concentrations below and around the LC_{50} . The positive hatching rates were $91.3 \pm 4.7\%$, $93.3 \pm 2.8\%$ at the concentrations of 0.1 and 0.5 ppm, respectively compared to the control which yielded $95.7 \pm 0.3\%$ hatching. Embryos and adult *B. glabrata* snails showed different sensitivity to the plant extract since the lethal dose for 100% of the adult snail population (1 ppm) showed moderate embryonic lethal effect, $64.7 \pm 7.5\%$ of snail embryos hatched and developed successfully (Fig. 3).

Parasiticidal activity against the free-swimming larval stages of *S. mansoni* and effect on snail-parasite compatibility

An alternative approach in control of schistosomiasis instead of controlling the snail population could be to focus on the free-swimming larval stages of the parasite, miracidia and cercariae. These parasite larval stages were exposed for 1 or 4 h to different concentrations of *E. triquetrum* extract ranging from 0.1 to 1 ppm to evaluate its potential lethal effect. The mortality of the miracidia and cercariae of *S. mansoni* was nearly complete for 5, 1 and 0.5 ppm of oil extract irrespective of the exposure time. For a concentration of 0.1 ppm, the mortality rate of miracidia dropped considerably reaching $7.6 \pm 2.7\%$ and $29.3 \pm 8.0\%$ with 1 and 4 hours of exposure (Fig. 4a). After a relatively short exposure time, severe surface damage on miracidia can be observed with a general loss of cilia that probably cause their immobility (Fig. 5). The mortality pattern for exposed cercariae was quite similar with $4.6 \pm 3.6\%$ and $15.6 \pm 5.8\%$ of deaths observed after

the different contact times (Fig. 4b). To determine the ability of exposed miracidia to infect their host, sublethal concentrations of the essential oil from *E. triquetrum* were applied for 30 min. Results of the snail exposure to treated *S. mansoni* miracidia are shown in Fig. 6. Miracidia exposed to low concentrations of plant extract were less infective with a prevalence of 3.3% compared to untreated miracidia (prevalence of 44%).

Discussion

The eradication of schistosomiasis provided by the WHO's road map and planned for 2030 requires a significant investment from all disciplinary fields to develop new drugs against human schistosomes and to interrupt the parasite life-cycle. Even if the study of biological interactions between *Schistosoma* and its snail vector has taken a new dimension based on their genome sequencing studies [34, 35], the CRISPR production of parasite-resistant transgenic snails or genetically modified sterile worms are quite far from having any results because of technical difficulties and little-known ecological aspects of such releases [36, 37]. Currently, massive treatment with praziquantel and improving sanitation appear the best way to control the disease. However, new foci are appearing, and other are re-emerging probably due to global warming [38, 39] and mass human migration [40], but also to the emergence of drug-tolerant schistosomes [41, 42]. In this context, snail control appears to be a crucial strategy to ensure a sustainable control and elimination of schistosomiasis. A number of molluscicides have been developed in an attempt to decrease parasitic disease transmission. Among synthetic molluscicides, niclosamide is the most widely employed in official schistosomiasis control programmes [43, 44] although concerns about the emergence of resistant snail population remains [12] and its apparent toxicity to other living organisms has been observed [11, 45, 46]. In addition, it is often necessary to repeat spraying in treated transmission sites due to snail repopulation [44]. Consequently, increasing efforts focused on identifying and characterizing new plant-derived molluscicides is required as a safer alternative [43, 44]. Among the molluscicidal agents extracted from plants, the latex from *Euphorbia* sp. appears promising by acting on both the snail vector and the parasite [13]. The LC_{50} can depend on several parameters such as *Euphorbia* species, the different part of the plant or the solvent used for latex extraction [47]. For example, LC_{50} of latex extracted from *E. umbellata* range from 1.36 to 40 ppm [45, 48] and around 30 ppm and 0.5 from *E. tirucalli* and *E. splendens*, respectively [49, 50]. Others plant extracts also display molluscicidal activities at concentrations

Table 2 Percentage of different fractions of *Eryngium triquetrum* essential oil from three distinct geographical localities in Algeria

No	Components ^a	RI _a ^b	<i>Eryngium triquetrum</i>			Identification
			ET01 ^c	ET02 ^c	ET03 ^c	
1	Heptane	703	0.2	0.1	0.1	RI, MS
2	Hexanal	774	0.2	0.2	0.2	RI, MS
3	Heptanal	877	tr	tr	tr	RI, MS
4	Octanal	979	1.8	1.0	1.0	RI, MS
5	(E)-2-octenal	1039	tr	tr	tr	RI, MS
6	1-octanol	1063	0.3	0.1	0.1	RI, MS
7	Nonan-2-one	1077	tr	0.1	0.1	RI, MS
8	Nonanal	1081	0.4	0.2	0.3	RI, MS
9	(E)-2-nonenal	1133	0.4	0.3	0.2	RI, MS
10	(Z)-2-nonen-1-ol	1155	0.1	0.4	0.4	RI, MS
11	Octanoic acid	1174	0.1	tr	tr	RI, MS
12	1-decen-3-ol	1181	0.6	tr	tr	RI, MS
13	Decanal	1183	tr	0.2	0.2	RI, MS
14	3-dodecen-1-yne	1214	0.1	tr	tr	RI, MS
15	Carvone	1225	tr	tr	tr	RI, MS
16	(E)-2-decanal	1251	tr	0.2	0.2	RI, MS
17	(E,E)-2,4-decadienal	1289	0.3	0.3	0.3	RI, MS
18	β-ionone	1454	0.2	0.2	0.2	RI, MS
19	3,4-dimethyl-5-pentyl-5H-furan-2-one	1486	1.9	1.0	1.0	RI, MS, Ref
20	γ-undecalactone	1524	tr	tr	0.2	RI, MS, Ref
21	Dodecanoic acid	1547	0.1	tr	tr	RI, MS
22	Hexadecanoic acid	1968	1.4	0.8	0.8	RI, MS
23	falcarinol	2026	86.9	93.1	90.6	RI, MS
24	α-kaurene	2049	0.1	0.3	0.2	RI, MS
Total identification (%)			95.1	98.3	96.2	
EO yields (%) (w/w)			0.05	0.04	0.03	
Oxygenated compounds			92.8	95.4	92.7	
Hydrogenated compounds			2.3	2.9	3.5	

^a Order of elution is given on apolar column (SPB-1)

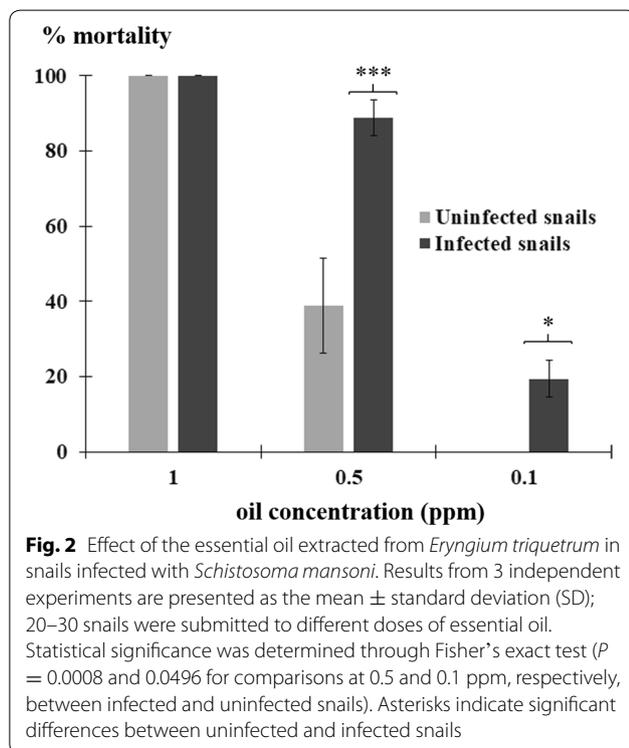
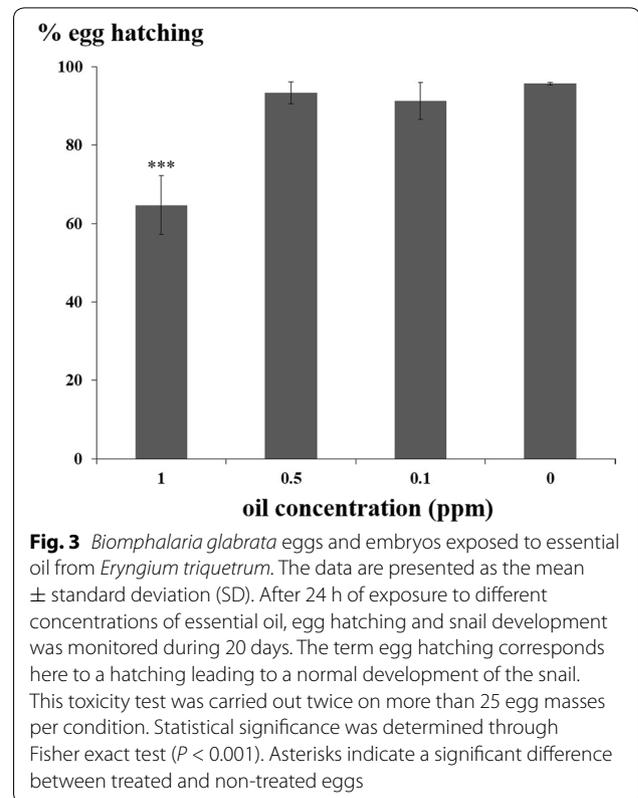
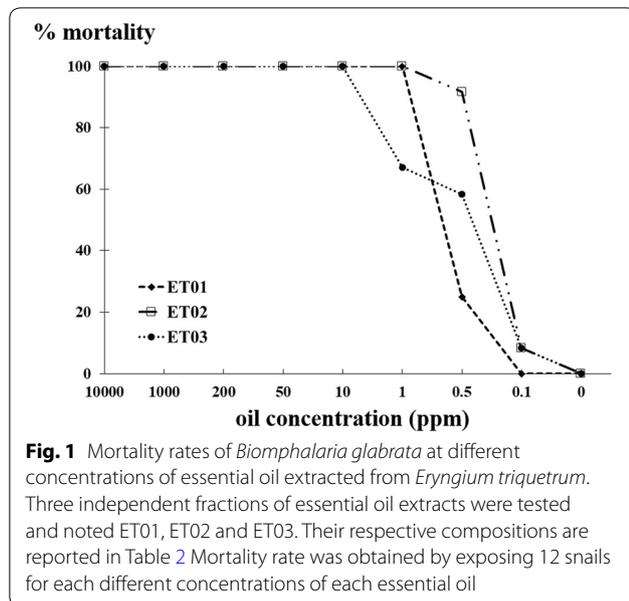
^b Retention indices on SPB-1 column (RI_a)

^c Essential oils of *E. triquetrum* stems. Quantification was carried out using RFs relative to tridecane as internal standard

Abbreviations: %, normalized percentages are given on the apolar column; tr, trace (< 0.05%); RI: retention index; MS: mass spectrometry in electronic impact mode. All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library except for compounds 19 and 20; EO: essential oil. Yield is based on the fresh weight of the stems; Ref, Compounds identified with references from literature data and compiled in the in-house library

lower than the one required by the WHO. Alcoholic stem extract from *Jatropha gossypifolia* shows toxicity towards adult snails after 24 h exposure with a LC₅₀ of 25 ppm [51]. Chlorophyllin extracted from *Moringa oleifera* leaves has a lethal activity on adult *Biomphalaria* snails exposed during 24 h probably by interfering with nervous and digestive systems [52]. A *Camellia oleifera* extract enriched in saponin exhibits a high level of toxicity against adult *B. alexandrina* snails for which LC₅₀ is quite similar to niclosamide, used as reference [14]. Other plant-derived terpenes such as jatrophone have also a high toxicity against adult snails

[53, 54]. This list of plant-derived extracts with a potential molluscicidal activity is far from being exhaustive. Moreover, a recent review updates the different essential oils used for their toxic effect against schistosomiasis transmitting snails [55]. The most studied plants are those belonging to families Lamiaceae, Rutaceae and Myrtaceae. The major chemical components determined by chromatography analyses are the terpenic derivatives for which their concentration in oils depends strongly on the nature of organic solvent and the different parts of plants used [55, 56]. To our knowledge, the present study is the first to report the molluscicidal



and parasiticidal activities of an essential oil extracted from an Apiaciae, *Eryngium triquetrum*. Its biological activities can be assigned to the high falcarinol content (about 90%), an aliphatic polyacetylene molecule produced by several plants such as carrots [57]. Interestingly, the high level of this component is only found in

E. triquetrum and could be considered as a main source of production. Indeed, essential oils of *Eryngium* species such as *E. campestre*, *E. maritimum* or *E. alpinum* do not contain such falcarinol compound or at lower concentrations [58–60]. As for *E. planum*, the maximal rate of falcarinol (about 60%) is concentrated in roots which make it difficult to benefit from its biological activity [61]. As *E. triquetrum* from Algeria is a falcarinol-rich essential oil, especially from stems, exploitation at large farming scale could be proposed for molluscicidal but also therapeutic application. Indeed, falcarinol and/or essential oil from *E. triquetrum* display antimicrobial effect as well as anti-inflammatory properties [23, 59]. Also, falcarinol could be used in tumor treatment since cytotoxic activity against human cancer cell lines has been demonstrated [59, 62].

In the present study, the essential oil from *E. triquetrum* seems to be a promising molluscicidal candidate considering the standard criteria established by the WHO with a lethal concentration of 90% and 50% below 400 and 100 ppm respectively. The LC_{90} and LC_{50} values against adult *B. glabrata* snails of 1.02 and 0.61 ppm, respectively, are significantly lower than most of the well-characterized essential oils and similar to latex or nicosamide. Unlike the reference molluscicide, the lower toxicity of the essential oil from *E. triquetrum* to embryonated

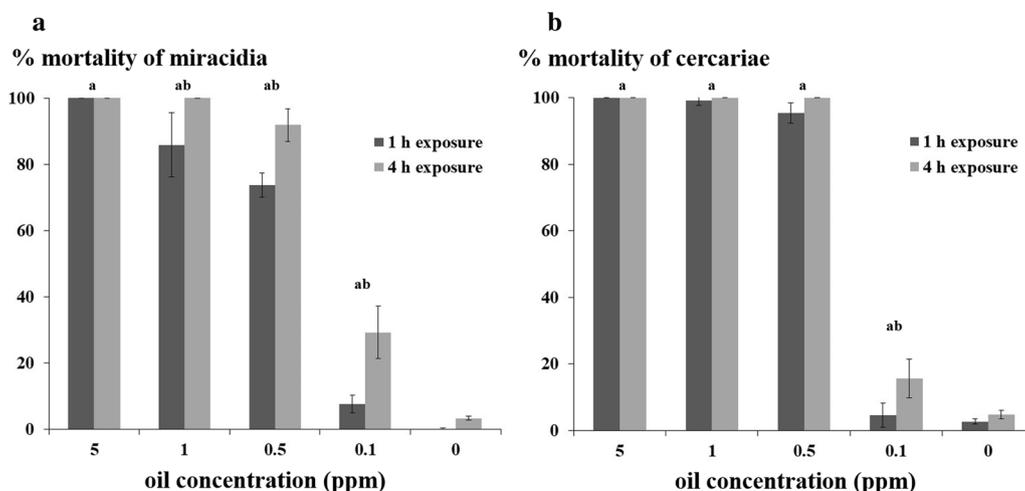


Fig. 4 Mortality of free-swimming larvae of *Schistosoma mansoni* exposed to essential oil from *Eryngium triquetrum*. Results are presented as the mean \pm standard deviation (SD) for at least 3 and 2 independent replicates for toxicity assays against miracidia and cercariae, respectively. About 300 miracidia and 100 cercariae were used for each independent experiment. The parasites (miracidia (a) and cercariae (b)) are considered dead if not mobile or motionless at the bottom of plates. Statistical significance was determined through Fisher exact test; “a” indicates a significant difference between the treated sample and the control, “b” indicates a significant difference between 1-h treated and 4-h treated parasites

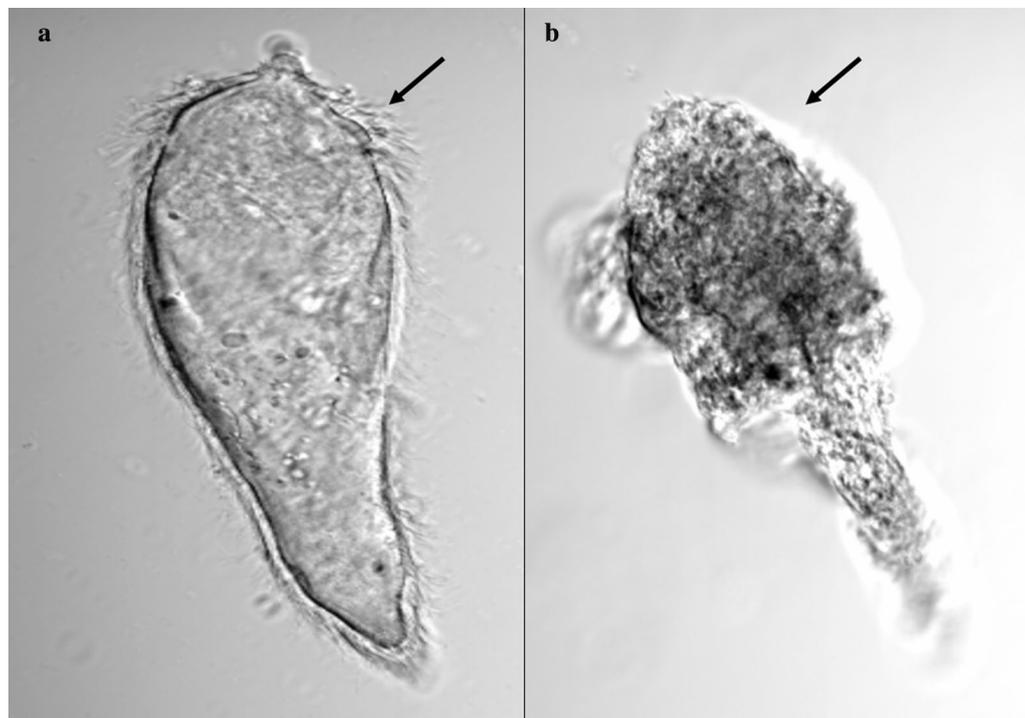
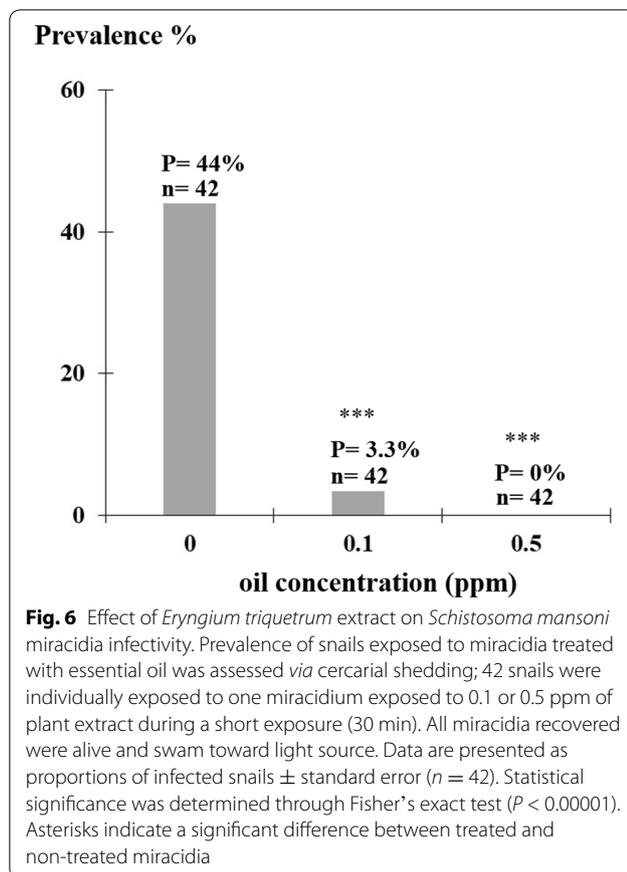


Fig. 5 Observation of parasiticidal activity on miracidia. **a** Miracidium not exposed to *E. triquetrum* essential oil. **b** Miracidium exposed to 0.5 ppm during 1 h. Note surface alterations on miracidium exposed to *E. triquetrum* extract with total loss of ciliated plates (arrows)

eggs potentially due to a low penetrating ability into egg masses, suggests a higher specificity of action towards adult snails. This toxic dichotomy can be useful to treat

the aquatic environment while reducing the side effects on non-target animals. The disruption of parasite’s life-cycle is more favored when snails are even early infected.



This higher mortality in infected snails could be linked to a broad dysregulation of signaling pathways involved in detoxification [63] and/or energy production metabolism [13, 64].

In a context of schistosomiasis elimination goal, the characterization of biological activities from plant-derived compounds mainly focuses on molluscicidal toxicity to break the parasite transmission cycle. However, some promising candidates present a dual activity by causing either the death of infective larvae [16, 17, 65–67] or developmental abnormalities leading to a low pathogenicity [68]. Mortality values after being exposed only for 24 h at 0.5 ppm were around 75% and 95% for miracidia and cercariae, respectively, and close to 100% for both after 4 h exposure. Interestingly, no snail death was observed under the same experimental conditions (Additional file 1: Figure S1). This falcariinol-enriched extract from *E. triquetrum* also prevents parasite infestation. Indeed, at low level concentrations during a short time exposure (30 min), the snail-parasite compatibility is strongly affected with no parasitized snails at 0.5 ppm. This significant loss of parasite virulence following treatment could be attributed to

the shedding of the ciliated plates used by parasites for locomotion and penetration into the snail host (Fig. 5).

Conclusions

We present a complete analysis of biological activities of a falcariinol-enriched extract from an Apiaceae ranging from molluscicidal and parasiticidal activities to the infection capacity of the exposed parasites. The extract from *E. triquetrum* has shown promising results as an alternative molluscicidal and parasiticidal environmentally compatible agent to reduce snail infections with schistosomes in transmission foci. Future research could investigate the biological activity of synthetic or natural falcariinol and its derivatives to develop new agents to prevent schistosomiasis transmission.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04367-w>.

Additional file 1: Figure S1. Effect of short-time exposure to the essential oil extracted from *Eryngium triquetrum* on uninfected snails. Data are summarised as the mean and standard deviation (SD). Statistical significance was determined through Fisher's exact test. P -value < 0.05 was considered statistically significant. A "a" indicates a significant difference between treated sample and control (Fischer's exact test; $P < 0.001$); and "b" indicates a significant difference between 1 h treated and 4 h treated snails (Fisher's exact test; $P < 0.001$).

Abbreviations

ET: *Eryngium triquetrum*; LC: lethal concentration; MS: mass spectrometry; RI: retention index; WHO: world health organization.

Acknowledgements

The authors want to thank Cindy Louvet and Nathalie Arancibia for all aspects concerning the maintenance of the life-cycle of *S. mansoni* in *B. glabrata*. We thank all team members for their advice and helpful discussions. Also, the authors thank Josie Harris for revising the English writing of this paper. Paradev company is also warmly thanked for its technical support. The spectroscopic experiments have been performed using the Biodiversity and Biotechnologies Marines (Bio2Mar, <http://bio2mar.obsbanyuls.fr/fr/index.html>) facilities at the University of Perpignan via Domitia.

Authors' contributions

ND, CB, RCA and DD designed the study. NM, AR, RCA and DD substantially participated in conception and improvement of research. NM and CB performed essential oil extraction and chemical characterization. RCA, AR, BG and DD performed all bioassays against snails and parasites. BG performed statistical analysis. RCA and DD carried out microscope observations. All authors contributed to the analysis and interpretation of the results. RCA, CB, ND and DD led the manuscript writing; all authors participated to manuscript writing, editing, and critical reviewing. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study is set within the framework of the "Laboratoires d'Excellence (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41) and CeMEB (ANR-10-LABX-04-01).

Availability of data and materials

The datasets used during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The laboratory and experimenters possessed an official certificate from the French Ministry of National Education, Research, and Technology, CNRS and DRAAF Languedoc Roussillon for experiments on animals, animal housing, and animal breeding (# A66040; decree # 87–848, October 19, 1987; and authorization # 007083).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹ University Perpignan Via Domitia, IHPE, UMR 5244, CNRS, IFREMER, Perpignan, France. ² University Montpellier, IHPE, UMR 5244, CNRS, IFREMER, Montpellier, France. ³ Faculté des Sciences, Département de Chimie, Université de Tlemcen, Laboratoire COSNA, Tlemcen, Algeria. ⁴ EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRILOBE, Université de Perpignan, Perpignan, France. ⁵ Laboratoire d'Excellence «CORAIL», Université de Perpignan, Perpignan, France. ⁶ S.A.S. AkiNaO, Perpignan, France.

Received: 9 July 2020 Accepted: 17 September 2020

Published online: 23 September 2020

References

- Batterman S, Eisenberg J, Hardin R, Kruk ME, Lemos MC, Michalak AM, et al. Sustainable control of water-related infectious diseases: a review and proposal for interdisciplinary health-based systems research. *Environ Health Perspect*. 2009;117:1023–32.
- WHO W. Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers. <https://www.who.int/schistosomiasis/resources/9789241511995/en>. Accessed 3 Jul 2018.
- Savioli L, Stansfield S, Bundy DA, Mitchell A, Bhatia R, Engels D, et al. Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections: forging control efforts. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96:577–9.
- Savioli L, Albonico M, Engels D, Montresor A. Progress in the prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Parasitol Int*. 2004;53:103–13.
- Augusto RC, Duval D, Grunau C. Effects of the environment on developmental plasticity and infection success of *Schistosoma* parasites—an epigenetic perspective. *Front Microbiol*. 2019;10:1475.
- Shiff C. Why reinvent the wheel? Lessons in schistosomiasis control from the past. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005812.
- Parker M, Allen T. Does mass drug administration for the integrated treatment of neglected tropical diseases really work? Assessing evidence for the control of schistosomiasis and soil-transmitted helminths in Uganda. *Health Res Policy Syst*. 2011;9:3.
- Lamberton PHL, Faust CL, Webster JP. Praziquantel decreases fecundity in *Schistosoma mansoni* adult worms that survive treatment: evidence from a laboratory life-history trade-offs selection study. *Infect Dis Poverty*. 2017;6:110.
- He P, Wang W, Sanogo B, Zeng X, Sun X, Lv Z, et al. Molluscicidal activity and mechanism of toxicity of a novel salicylanilide ester derivative against *Biomphalaria* species. *Parasit Vectors*. 2017;10:383.
- Sures B, Nachev M, Selbach C, Marcogliese DJ. Parasite responses to pollution: what we know and where we go in 'Environmental Parasitology'. *Parasit Vectors*. 2017;10:65.
- Oliveira-Filho EC, Paumgarten FJ. Toxicity of *Euphorbia millii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2000;46:342–50.
- Dai JR, Li YZ, Wang W, Xing YT, Qu GL, Liang YS. Resistance to niclosamide in *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of *Schistosoma japonicum*: should we be worried? *Parasitology*. 2015;142:332–40.
- de Carvalho Augusto R, Mello Silva CC. Phytochemical molluscicides and schistosomiasis: what we know and what we still need to learn. *Vet Sci*. 2018;5:94.
- Jia TW, Wang W, Sun LP, Lv S, Yang K, Zhang NM, et al. Molluscicidal effectiveness of Luo-Wei, a novel plant-derived molluscicide, against *Oncomelania hupensis*, *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. *Infect Dis Poverty*. 2019;8:27.
- Li H, Wang W. Apropos: critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infect Dis Poverty*. 2017;6:54.
- Matos JL, da Silva KR, de Lima Paula LA, Cunha WR, Ramos SB, Rodrigues V, et al. Molluscicidal and cercaricidal activities of curcumin on *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. Molluscicidal and cercaricidal activities of curcumin. *Pest Manag Sci*. 2020;76:1228–34.
- Silva H, Sa JLF, Siqueira WN, Lima MV, Martins MCB, Aires AL, et al. Toxicological effects of *Ramalina aspera* (lichen) on *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Acta Trop*. 2019;196:172–9.
- Ibrahim AM, Ghoname SI. Molluscicidal impacts of *Anagallis arvensis* aqueous extract on biological, hormonal, histological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Exp Parasitol*. 2018;192:36–41.
- Mandefro B, Mereta ST, Tariku Y, Ambelu A. Molluscicidal effect of *Achyranthes aspera* L. (Amaranthaceae) aqueous extract on adult snails of *Biomphalaria pfeifferi* and *Lymnaea natalensis*. *Infect Dis Poverty*. 2017;6:133.
- Bouzerboune F, Ciavatta ML, Bitam F, Carbone M, Aberkane MC, Gavagnin M. Phytochemical study of *Eryngium triquetrum*: isolation of polyacetylenes and lignans. *Planta Med*. 2016;82:1438–45.
- Nusair SD, Ahmad MI. Toxicity of *Vipera palaestinae* venom and antagonistic effects of methanolic leaf extract of *Eryngium creticum* lam. *Toxicol*. 2019;166:1–8.
- Paun G, Neagu E, Moreoanu V, Albu C, Savin S, Lucian Radu G. Chemical and bioactivity evaluation of *Eryngium planum* and *Cnicus benedictus* polyphenolic-rich extracts. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3692605.
- Medbouhi A, Merad N, Khadir A, Bendahou M, Djabou N, Costa J, et al. Chemical composition and biological investigations of *Eryngium triquetrum* essential oil from Algeria. *Chem Biodivers*. 2018;15:e1700343.
- Medbouhi A, Tintaru A, Beaufay C, Naubron JV, Djabou N, Costa J, et al. Structural elucidation and cytotoxicity of a new 17-membered ring lactone from Algerian *Eryngium campstre*. *Molecules*. 2018;23:3250.
- Sadiq A, Ahmad S, Ali R, Ahmad F, Zeb A, Ayaz M, et al. Antibacterial and antifungal potentials of the solvents extracts from *Eryngium caeruleum*, *Notholirion thomsonianum* and *Allium consanguineum*. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:478.
- Europe Co. European Pharmacopoeia. 3rd ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 1997.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation; 2007.
- NIST. PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Gaithersburg, MD, USA: National Institute of Standards and Technology (NIST); 1999.
- Rubiolo P, Liberto E, Sgorbini B, Russo R, Veuthey JL, Bicchi C. Fast-GC-conventional quadrupole mass spectrometry in essential oil analysis. *J Sep Sci*. 2008;31:1074–84.
- Djabou N, Paolini J, Desjobert J-M, Allali H, Baldovini N, Costa J, et al. Qualitative and quantitative analysis of volatile components of *Teucrium massiliense* L.—identification of 6-methyl-3-heptyl acetate as a new natural product. *Flavour Fragrance J*. 2010;25:475–87.
- WHO. Guidelines for laboratory and field testing of molluscicides for control of schistosomiasis. Geneva: World Health Organization; 2019.
- Mone Y, Mitta G, Duval D, Gourbal B. Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol*. 2010;125:70–5.
- Finney DJ. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
- Zerlotini A, Aguiar ER, Yu F, Xu H, Li Y, Young ND, et al. SchistoDB: an updated genome resource for the three key schistosomes of humans. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:D728–31.
- Adema CM, Hillier LW, Jones CS, Loker ES, Knight M, Minx P, et al. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nat Commun*. 2017;8:15451.
- Famakinde DO. Treading the path towards genetic control of snail resistance to schistosome infection. *Trop Med Infect Dis*. 2018;3:86.

37. Maier T, Wheeler NJ, Namigai EKO, Tycko J, Grewelle RE, Woldeamanuel Y, et al. Gene drives for schistosomiasis transmission control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13:e0007833.
38. Adekiya TA, Aruleba RT, Oyinloye BE, Okosun KO, Kappo AP. The effect of climate change and the snail-schistosome cycle in transmission and bio-control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;17:181.
39. Stensgaard AS, Vounatsou P, Sengupta ME, Utzinger J. Schistosomes, snails and climate change: current trends and future expectations. *Acta Trop*. 2019;190:257–68.
40. Le Govic Y, Kincaid-Smith J, Allienne JF, Rey O, de Gentile L, Boissier J. *Schistosoma haematobium-Schistosoma mansoni* hybrid parasite in migrant boy, France, 2017. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:365–7.
41. Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:932–5.
42. da Silva VBR, Campos B, de Oliveira JF, Decout JL, do Carmo Alves de Lima M. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: praziquantel and oxamniquine. *Bioorg Med Chem*. 2017;25:3259–77.
43. Coelho P, Caldeira RL. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infect Dis Poverty*. 2016;5:57.
44. King CH, Sutherland LJ, Bertsch D. Systematic review and meta-analysis of the impact of chemical-based mollusciciding for control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0004290.
45. Harrison AD. The effects of Bayluscid on gastropod snails and other aquatic fauna in Rhodesia. *Hydrobiologia*. 1966;28:371–84.
46. Souza CP. Molluscicide control of snail vectors of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90:165–8.
47. dos Santos AF, de Azevedo DP, dos Santos Mata Rda C, de Mendonça DI, Sant'Ana AE. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. *Bioresour Technol*. 2007;98:135–9.
48. Pereira L, Dias CN, Miranda MV, Firmo W, Rosa CDS, Santos PF, et al. Molluscicidal effect of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns latex on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host snail. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59:e85.
49. Jurberg P, Cabral Neto JB, Schall VT. Molluscicide activity of the “avelós” plant (*Euphorbia tirucalli* L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusc vector of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985;80:423–7.
50. de Vasconcellos MC, de Amorim A. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopianae* (“Christ’s Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae): 1- test in laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:557–63.
51. Pereira Filho AA, Franca CR, Oliveira Dda S, Mendes RJ, Goncalves Jde R, Rosa IG. Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56:505–10.
52. Ibrahim AM, Abdalla AM. Impact of *Moringa oleifera* seed aqueous extract on some biological, biochemical, and histological aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24:28072–8.
53. dos Santos AF, Fonseca SA, Cesar FA, de Azevedo Albuquerque MC, Santana JV, Santana AE. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol Res*. 2014;113:1077–84.
54. Radwan MA, El-Zemity SR, Mohamed SA, Sherby SM. Potential of some monoterpenoids and their new *N*-methyl carbamate derivatives against schistosomiasis snail vector, *Biomphalaria alexandrina*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;71:889–94.
55. Pereira L, Ribeiro ECG, Brito MCA, Silveira DPB, Araruna FOS, Araruna FB, et al. Essential oils as molluscicidal agents against schistosomiasis transmitting snails—a review. *Acta Trop*. 2020;209:105489.
56. Lahlou M, Berrada R, Hmamouchi M. Molluscicidal activity of thirty essential oils on *Bulinus truncatus*. *Therapie*. 2001;56:71–2.
57. Rai DK, Brunton NP, Koidis A, Rawson A, McLoughlin P, Griffiths WJ. Characterisation of polyacetylenes isolated from carrot (*Daucus carota*) extracts by negative ion tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011;25:2231–9.
58. Medbouhi A, Benbelaid F, Djabou N, Beaufay C, Bendahou M, Quetin-Leclercq J, et al. Essential oil of Algerian *Eryngium campestre*: chemical variability and evaluation of biological activities. *Molecules*. 2019;24:2575.
59. Landoulsi A, Hennebelle T, Bero J, Rivière C, Sahpaz S, Quetin-Leclercq J, et al. Antimicrobial and light-enhanced antimicrobial activities, cytotoxicity and chemical variability of all Tunisian *Eryngium* species. *Chem Biodivers*. 2020;17:e1900543.
60. Kikowska M, Kalembe D, Dlugaszewska J, Thiem B. Chemical composition of essential oils from rare and endangered species—*Eryngium maritimum* L. and *E. alpinum* L. *Plants (Basel)*. 2020;9:417.
61. Thiem B, Kikowska M, Kurowska A, Kalembe D. Essential oil composition of the different parts and *in vitro* shoot culture of *Eryngium planum* L. *Molecules*. 2011;16:7115–24.
62. Kobæk-Larsen M, Baatrup G, Khataei-Notabi M, El-Houry RB, Pipó-Ollé E, Christensen Arnsparng E, et al. Dietary polyacetylenic oxylipins falcariinol and falcariindiol prevent inflammation and colorectal neoplastic transformation: a mechanistic and dose-response study in a rat model. *Nutrients*. 2019;11:2223.
63. Zhang SM, Buddenborg SK, Adema CM, Sullivan JT, Loker ES. Altered gene expression in the *Schistosoma*-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to niclosamide, the active ingredient in the widely used molluscicide Bayluscide. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0004131.
64. el-Ansary A, Sammour EM, Soliman MS, Gawish FA. *In vivo*, attenuation of schistosome cercarial development and disturbance of egg laying capacity in *Biomphalaria alexandrina* using sublethal concentrations of plant molluscicides. *J Egypt Soc Parasitol*. 2001;31:657–69.
65. Rodrigues KA, Dias CN, do Amaral FM, Moraes DF, Mouchrek Filho VE, Andrade EH, et al. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. *Pharm Biol*. 2013;51:1293–7.
66. dos Santos AF, Fonseca SA, César FA, de Azevedo Albuquerque MC, Santana JV, Santana AE. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol Res*. 2014;113:1077–84.
67. Ibrahim AM, Abdel-Gawad MM, El-Nahas HA, Osman NS. Studies on the molluscicidal activity of *Agave angustifolia* and *Pittosporum tobira* on schistosomiasis transmitting snails. *J Egypt Soc Parasitol*. 2015;45:133–41.
68. Augusto RC, Tetreau G, Chan P, Walet-Balieu ML, Mello-Silva CC, Santos CP, et al. Double impact: natural molluscicide for schistosomiasis vector control also impedes development of *Schistosoma mansoni* cercariae into adult parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005789.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Article 3: Chemical Composition and Biological Investigations of *Eryngium triquetrum* Essential Oil from Algeria

A. Medbouhi, N. Merad, A. Khadir, M. Bendahou, N. Djabou, A. Muselli, J. Costa, « Chemical Composition and Biological Investigations of *Eryngium triquetrum* Essential Oil from Algeria », *Chem. Biodivers.*, vol. 15, no 1, 2018.

Chemical Composition and Biological Investigations of *Eryngium triquetrum* Essential Oil from Algeria

Ali Medbouhi,^{a,b} Nadjiya Merad,^a Abdelmounaim Khadir,^c Mourad Bendahou,^c Nassim Djabou,^a Jean Costa,^b and Alain Muselli*^b

^aLaboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen 13000, Algeria

^bUMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels (CPN), Université de Corse, Campus Grimaldi, BP 52, Corte 20250, France, e-mail: muselli@univ-corse.fr

^cLaboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, BP 119, Tlemcen 13000, Algeria

The chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil obtained from *Eryngium triquetrum* from Algeria were studied. The chemical composition of sample oils from 25 locations was investigated using GC-FID and GC/MS. Twenty-four components representing always more than 87% were identified in essential oils from total aerial parts of plants, stems, flowers and roots. Falcarinol is highly dominant in the essential oil from the roots (95.5%). The relative abundance of falcarinol in the aerial parts correlates with the phenological stages of the plant. Aerial parts of *E. triquetrum* produce an essential oil dominated by falcarinol during the early flowering stage, and then there is a decrease in falcarinol and rebalancing of octanal during the flowering stage. To our knowledge, the present study is the first report of the chemical composition of *E. triquetrum* essential oil. Evaluation of the antibacterial activity by means of the paper disc diffusion method and minimum inhibitory concentration assays, showed a moderate efficiency of *E. triquetrum* essential oil. Using the DPPH method, the interesting antioxidant activity of *E. triquetrum* essential oil was established. These activities could be attributed to the dominance of falcarinol. The outcome of our literature search on the occurrence of falcarinol in essential oils suggests that *E. triquetrum* from Algeria could be considered as a possible source of natural falcarinol.

Keywords: Falcarinol, *Eryngium triquetrum*, Essential oils, Antibacterial activity, Antioxidant activity.

Introduction

The genus *Eryngium* L. (*Apiaceae* family) comprises more than 250 species distributed in temperate regions of all continents, mainly in Eurasia, North Africa and South America.^[1] Among them, *E. triquetrum* VAHL is an endemic species of northern Africa, distributed in all parts of Algeria, along with other species such as *E. dichotomum* DESF, *E. maritimum* L., *E. campestre* L., and *E. tricuspdatum*. The green perennial plant becomes a bluish-purplish color when ripe. The stems are branched from 20 to 40 cm with angular branches. The radical leaves are in a rosette form, first oblong, toothed or lobed. The stem leaves are semiamplexicaul, palmatipartite, and thorny. The involucre display three triangular bracts and few flowers.^[2] The species grows particularly well in rocky pastures. It was considered as a ruderal species, which the local people call 'choukzerk'.^[3] No traditional use

for this thorny plant has been reported by the Algerian population. However, *Eryngium* species are used as a folk remedy for the treatment of various inflammatory disorders, and as an emetic infusion,^[4] antidote for poisons, hypoglycemic agent^[5] and stimulant, aphrodisiac, antitussive and diuretic.^[6]

Species of *Eryngium* genus have been subjects of many phytochemical studies. The following have been reported as the main constituents of the solvents extracts: triterpene saponin,^{[7][8]} acetylenic compounds,^{[9][10]} and polyphenols.^[11] The essential oils of 36 *Eryngium* species have already been studied and the sample oils can be divided into two main chemical compositions according to their main components. The first group is characterized by oxygenated compounds including sesquiterpenes such as γ -cadinen-15-al, spathulenol, sesquicineole, α -bisabolol, and *cis*-chrysanthenyl acetate,^[12–19] as well as nonterpenic compounds such as trimethylbenzaldehyde,

Table 1. Chemical compositions of the *Eryngium triquetrum* collective essential oil (EOcoll) and of individual samples oils (S1 – S25) prepared from plant material harvested in 25 locations of western Algeria

No. ^a	Component	<i>IRI</i> _a ^b	<i>RI</i> _a ^c	<i>RI</i> _p ^d	EOcoll ^e	Id. ^f	Sample oils ^g						
							Group I						
							S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
1	Heptane	700	703	700	0.5	<i>RI</i> , MS	0.1	0.2	0.3	tr	0.2	0.3	0.3
2	Hexanal	770	774	1055	0.3	<i>RI</i> , MS	0.2	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.2
3	Heptanal	876	877	1187	0.9	<i>RI</i> , MS	tr	0.4	tr	tr	tr	tr	tr
4	Octanal	980	979	1531	9.1	<i>RI</i> , MS	1	2.5	1.2	2	1.8	2	1.8
5	(<i>E</i>)-2-Octenal	1036	1039	1416	1.2	<i>RI</i> , MS	tr	0.1	0.2	0.1	tr	0.1	0.1
6	1-Octanol	1058	1063	1394	tr	<i>RI</i> , MS	0.1	0.1	0.1	0.7	0.3	tr	tr
7	Nonan-2-one	1070	1077	1388	0.4	<i>RI</i> , MS	0.1	0.1	tr	tr	tr	tr	tr
8	Nonanal	1083	1081	1394	2.5	<i>RI</i> , MS	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.2
9	(<i>E</i>)-2-Nonenal	1136	1133	1530	0.9	<i>RI</i> , MS	0.3	0.3	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2
10	(<i>Z</i>)-2-Nonen-1-ol	1158	1155	1688	0.1	<i>RI</i> , MS, Ref.	0.4	0.1	tr	tr	0.1	tr	tr
11	Octanoic acid	1173	1174	1866	1.1	<i>RI</i> , MS	tr	0.1	tr	0.2	0.1	tr	tr
12	1-Decen-3-ol	1172	1181	1643	1.7	<i>RI</i> , MS	tr	0.2	0.1	0.3	0.6	0.5	0.2
13	Decanal	1185	1183	1498	0.1	<i>RI</i> , MS	0.2	0.1	tr	tr	tr	tr	tr
14	3-Dodecen-1-yne	1120	1214	–	0.7	<i>RI</i> , MS	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.3	tr
15	Carvone	1222	1225	1739	0.2	<i>RI</i> , MS	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	tr
16	(<i>E</i>)-2-Decanal	1248	1251	1652	1.1	<i>RI</i> , MS	0.2	tr	0.2	tr	tr	0.2	tr
17	(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	1290	1289	1820	tr	<i>RI</i> , MS	0.3	0.1	0.1	tr	0.3	tr	tr
18	β -Ionone	1466	1454	1936	0.2	<i>RI</i> , MS	0.2	0.3	0.4	tr	0.2	0.1	tr
19	3,4-Dimethyl-5-pentyl-5H-furan-2-one	1481	1486	1495	1.1	<i>RI</i> , MS, Ref.	1.0	0.9	2.5	5.7	1.9	2.2	3
20	γ -Undecalactone	1533	1524	2266	0.7	<i>RI</i> , MS	0.2	tr	tr	tr	tr	tr	tr
21	Dodecanoic acid	1556	1547	2474	0.5	<i>RI</i> , MS, Ref.	tr	0.1	tr	tr	0.1	tr	tr
22	Hexadecanoic acid	1962	1968	2330	0.4	<i>RI</i> , MS	0.8	1.3	1.6	0.6	1.4	1.7	1.8
23	Falcarinol	2028	2026	3086	71.2	<i>RI</i> , MS, Ref.	90.6	87.1	83.6	84.6	86.9	86.9	85.1
24	α -Kaurene	2046	2049	2389	0.7	<i>RI</i> , MS	0.3	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr
	Total identification [%]				95.6		96.2	94.8	91.6	95.0	95.1	95.1	92.9
	Oxygenated compounds				92.6		90.3	94.8	88.6	89.3	92.8	92.2	89.6
	Hydrogenated compounds				3.0		2.2	1.4	3.0	5.7	2.3	2.9	3.3
	Nonterpenic compounds				94.5		91.9	95.7	91.0	95.0	94.8	94.9	92.9
	EO, yields [%] (<i>w/w</i>)						0.03	0.04	0.06	0.04	0.05	0.07	0.08

^a Order of elution is given on apolar column (*Rtx-1*). Bold types refer to main compounds. ^b Retention indices of literature on the apolar column (*IRI*_a). ^c Retention indices on the apolar *Rtx-1* column (*RI*_a). ^d Retention indices on the polar *Rtx-Wax* column (*RI*_p). ^e EOcoll: Collective oil sample of *E. triquetrum*. Quantification was carried out using *RFs* relative to tridecane as internal standard. %: Normalized Percentages are given on the apolar column except for components with identical *RI*_a (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). ^f *RI*: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode. ^g Sample oils: List maximal normalized percentages abundances from the 25 sample oils are given on the apolar column except for components with identical *RI*_a (percentages are given on the polar column), tr = trace (< 0.05%). The oils of samples S1 – S25 as minimum content (*S*_{min}), maximum content (*S*_{max}). Ref.: comparison with literature data. All compounds were identified by comparing their E the in-house library, except falcarinol (**23**), dodecanoic acid (**21**), 3,4-dimethyl-5-pentyl-5H-furan-2-one (**19**), and 3-undecen-1-yne (**12**), identified from MS literature data.^[52]

(*E*)-2-dodecenal, linear acids,^{[12][19–33]} and polyacetylenes.^{[20][21][29]} The second group includes sample oils with terpenic hydrocarbon compounds such as germacrene D, bicyclogermacrene, γ -muurolene, and *trans*-caryophyllene.^{[22][23][32][34–41]}

To our knowledge, *E. triquetrum* essential oil has not yet been investigated. However, two studies deal with the occurrence, in solvent extracts of

E. triquetrum from Algeria, of flavonol glycosides,^[42] lignans, and polyacetylenes.^[3] Polyacetylenes and especially falcarinol is known as highly bioactive compound exhibiting remarkable cytotoxic activity,^{[43][44]} anti-inflammatory,^[45] antibacterial,^[46–48] and a very strong antifungal potential.^{[49][50]} It has also a protective effect on the Amyloid β protein, the central constituent of senile plaques in *Alzheimer's* disease.^[51] As

																	S _{min}	S _{max}	
Group II									Group III										
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25		
0.9	1.2	0.4	0.8	1.4	1.2	1.1	0.5	0.6	1.4	1.0	1.4	1.3	1.1	0.1	0.9	0.7	0.9	0.1	1.4
0.2	0.2	tr	tr	tr	0.1	0.4	0.2	0.5	0.2	0.3	tr	1.0	0.6	0.2	0.6	1.6	0.2	0.1	1.6
tr	0.6	0.3	0.6	0.4	0.6	tr	tr	tr	0.8	1.1	1.0	tr	1.1	0.9	1.3	tr	0.6	0.2	1.3
3.7	7.3	3.9	5.4	7.7	7.7	5.6	4.1	5.6	10.4	12.1	11.9	11.6	12.1	10.3	10.5	12.6	12.8	1	12.8
0.3	tr	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.5	0.2	0.2	0.3	tr	tr	0.2	0.5	tr	tr	tr	0.1	0.5
0.1	0.1	0.5	0.1	0.2	0.1	tr	0.2	tr	0.3	2.0	0.3	tr	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	2
tr	0.2	0.1	tr	0.3	tr	0.3	0.3	0.3	tr	tr	0.1	0.3							
0.3	0.6	0.7	0.5	0.6	0.9	0.7	0.4	0.8	1.1	1.7	1.2	1.4	1.2	0.9	1.4	1.6	tr	0.2	1.7
0.4	0.5	0.7	0.4	0.7	0.6	0.8	0.4	0.5	0.8	1.4	1	0.9	1.2	0.7	1	1.1	1	0.2	1.4
tr	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.2	tr	0.2	tr	0.6	0.9	tr	1.0	0.9	0.4	0.1	0.3	0.1	1.0
tr	0.2	0.2	0.2	0.3	tr	0.2	tr	tr	0.4	tr	0.5	tr	0.5	0.4	0.4	tr	tr	0.1	0.5
0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.3	0.5	0.6	0.7	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.4	0.1	0.1	0.7
tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	tr	1.0	0.1	1.0						
0.4	0.4	0.1	0.7	0.7	0.4	0.4	0.2	0.5	0.7	0.6	0.6	0.7	0.4	0.8	0.4	tr	0.9	0.1	0.9
0.4	0.1	0.1	0.1	0.2	tr	tr	tr	0.5	0.7	0.4	0.8	tr	0.2	0.7	tr	tr	tr	0.1	0.8
tr	0.1	0.4	0.1	0	0.2	0.5	tr	tr	0.2	0.3	tr	tr	0.3	0.2	0.7	tr	1	0	1
0.1	0.1	0.4	0.1	0.7	tr	0.2	tr	tr	tr	tr	0.1	0.7							
0.2	0.1	0.3	0.1	0.3	tr	0.5	tr	0.3	0.4	0.4	0.5	0.6	0.2	0.5	0.4	tr	tr	0.1	0.6
2	1.1	1.0	1.2	1.4	1.5	2.2	1.4	2.7	1.9	2.6	2.0	3.8	1.1	1.1	1.9	1.0	1.2	0.9	5.7
tr	0.1	tr	tr	0.1	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	0.1	0.1							
tr	0.1	0.2	tr	tr	tr	0.5	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	0.1	0.5
2.6	0.1	2.0	2.5	3.7	2.8	2.9	0.5	1.9	2.8	2.4	2.8	1.7	3.2	2.8	2.6	2.3	2.0	0.1	3.7
78.4	78.2	79.9	78.3	71.4	73.2	73.4	78.2	74.8	67.7	63.5	65.5	68.1	65.7	69.7	66.7	69	68.9	63.5	90.6
0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1	tr	tr	0.3	0.3	0.3	0.4	tr	0.2	0.3	0.3	tr	tr	0.1	0.4
90.4	92.1	92.2	92.1	91.3	90.5	90.0	87.2	90.1	90.8	91.2	90.9	91.2	91.4	91.7	90.6	90.7	91.0	87.2	96.2
86.9	89.3	90.5	89.2	87.5	87.3	86.3	85.1	86.0	86.5	86.7	86.5	85.4	88.6	89.4	87.1	89	88.0	85.1	93.5
3.5	2.8	1.7	2.9	3.8	3.2	3.7	2.1	4.1	4.3	4.5	4.4	5.8	2.8	2.3	3.5	1.7	3.0	1.3	5.8
89.6	91.8	91.6	91.7	90.5	90.4	89.5	87.2	89.0	89.4	90.1	89.2	90.6	90.8	90.2	89.9	90.7	91.0	87.2	95.0
0.04	0.10	0.02	0.08	0.08	0.05	0.03	0.03	0.02	0.06	0.06	0.11	0.03	0.03	0.06	0.04	0.04	0.04	0.02	0.11

falcarinol have been produced by multi-steps enantioselective synthesis,^[52] identifying possible valuable natural sources of this phytochemical from plant essential oils presents an interesting challenge. In the *Eryngium* genus, only once has falcarinol been identified as the main component, in *E. planum* essential oil from Poland (64%).^[21] The occurrence of falcarinol (never more than 10%) has been mentioned in the essential oils of *E. barrelieri* and *E. glomeratum* from Tunisia,^[12] *E. foetidum* from Vietnam^[20] and *E. yuccifolium* from Algeria.^[10]

In the present study, the chemical composition of the essential oil of *E. triquetrum* harvested in north-west Algeria was investigated using GC-FID and GC/MS analyses. The normalized percentage abundance of falcarinol was particularly pointed in the essential oils prepared from the total aerial parts and from the separated organs (stems, flowers and roots) of the

plant. The occurrence of falcarinol was also studied in the essential oils prepared from plants harvested consecutively during the plant vegetative cycle. The study was complemented by a study of the variability of 25 sample oils obtained from different locations in north-west Algeria. Finally, the antibacterial and antioxidant activities of the falcarinol-rich essential oil of *E. triquetrum* were evaluated.

Results and Discussion

Composition of *E. triquetrum* Essential Oils

The sampling of plant material in the 25 locations of north-west Algeria has allowed the determination of the species with large availability. Hydrodistillation from the fresh aerial parts of the 25 Algerian samples yielding (*w/w*) 0.02 – 0.11% (means 0.05%) of the red essential oils. The yields of essential oils

were given for all analysed samples in *Tables 1* and *2*. All essential oils were first analysed by both GC-FID and GC/MS, then a collective oil sample (EOColl) obtained from a pool of all *E. triquetrum* sample oils were produced. GC-FID and GC/MS analyses of the EOColl sample and subsequent fractions obtained by column chromatography allowed the identification of 24 components, accounting for 93.2% of the total composition. The essential oil contains mostly linear oxygenated compounds (92.6%), dominated by falcariinol (71.2%), followed by octanal (9.1%), and nonanal (2.5%). Twenty components were identified by comparison of their retention indices and mass spectra with those in a 'home-made' mass spectral library. Four other compounds were identified by comparison of their retention indices and mass spectra with those of literature mass spectral libraries.^{[53][54]}

The chemical compositions of 25 individual essential oils obtained from plant specimens harvested from different locations in western Algeria, were investigated to identify the environmental parameters (weather, soil composition...) involved in the chemical variability of the essential oils. The normalized percentage abundances of the components of the 25 sample oils are tabulated in *Table 1*. An analysis of the results revealed that quantitative variations in the oil components were not linked to the geographical locations of harvest. Indeed, the very close chemical compositions of the sample oils obtained from plant material harvested from different locations at the same vegetative stages (S1 – S9, S10 – S17 and S18 – S25, respectively) demonstrated that parameters such as altitude, soil composition and climatic conditions were weakly involved in the chemistry of the plant. Conversely, analysis of the chemical data acquired during the total vegetative cycle showed that the chemical composition of the plant essential oil seems to be linked to the phenological state of the plant. As seen in *Tables 1* and *3*, the oil samples were distributed in three groups according to the maturity of the plant. Group I includes seven sample oils (S1 – S7) with the highest amounts of falcariinol (83.6 – 90.6%) and lowest amounts of octanal (1.0 – 2.5%). Groups II and III include 18 sample oils (S8 – S16 and S17 – S25, respectively). They differed from Group I in that they had lower amounts of falcariinol (means 76.2% and 67.2%) and higher amounts of octanal (means 5.7% and 11.6%), respectively. The seven sample oils of the Group I were obtained from plant material harvested before the flowering stage, while all the other essential oils were prepared from plant material harvested during the flowering stage.

Composition of E. triquetrum Essential Oils during the Complete Vegetative Cycle and from Separate Plant Organs

In efforts to gain more knowledge about the plant ecology, the seasonal variation of *E. triquetrum* essential oil and the essential oil compositions from separate plant organs were investigated. The chemical compositions of four sample oils obtained during the vegetative cycle of the specimen harvested in the S1 location were investigated (*Table 2*).

The yield of essential oil was lower at the beginning of the vegetative cycle (0.02%, w/w) and it is higher during the flowering stage (0.09%, w/w). Falcariinol (90.6%) dominated in the sample oil produced before the flowering stage (May 05); this was coupled with decreased levels in the three other essential oils, produced when the plant was in full bloom.

During the full bloom period, a decrease in falcariinol was coupled with an increase in octanal (maximum 34.0%) in the essential oil obtained at the end of the study period (July 01), *i.e.*, just before the total disappearance of the plant. The secondary metabolite production of *E. triquetrum* seems to be linked to the plant ecology. As falcariinol is known to be a natural pesticide,^[55] its production during the early flowering stage could be considered as a means of defence. Then, during the flowering period, the plant produces volatile compounds such as octanal, hexyl acetate, (*Z*)-3-hexenyl acetate, and (*Z*)-3-hexen-1-ol, which act as insect attractants during the pollination process.^[56]

The chemical compositions of the essential oils produced by separate plant organs harvested during full bloom and before plant death were also investigated (see *Table 2*). The flowers were the most aromatic organs, with an essential oil yield of 0.1%, against 0.05% for the stems and roots, respectively. Concerning the plant chemistry, two types of essential oils are produced by *E. triquetrum*. Falcariinol (39.6% and 36.5%) and octanal (28.5% and 32.7%) were the two main components of the stems' and flowers' essential oils, respectively. Falcariinol (91.5%) was the main component of the root oil.

Falcariinol-rich Essential Oil: Comparison with Literature Data

Except for the essential oil of *E. planum* from Poland (64% falcariinol), the essential oils from the *Eryngium* species are not a good source of falcariinol. As *E. triquetrum* from Algeria is a falcariinol-rich essential oil, a literature study that focused on the abundance of falcariinol in the essential oils was carried out (see

Table 2. Chemical compositions of *Eryngium triquetrum* collective essential oil (EOcoll), minimal and maximal contents (S_{\min} , S_{\max}) of components from 25 individual sample oils, seasonal variation of the oil-component contents during the studied period (May and June) and essentials oils from the separated plant organs (flowers, stems, and roots) of *E. triquetrum* sample S1

No. ^a	Component	$ RI_a^b $	RI_a^c	RI_p^d	EOcoll ^e	AP ^f (S1 – S25)		Seasonal variations ^g				Plant organs ^h			Identification ⁱ
						S_{\min}	S_{\max}	1st	2nd	3rd	4th	Flowers	Stems	Roots	
1	Heptane	700	703	700	0.5	0.1	1.4	0.1	1.4	2.1	2	tr	tr	0.1	RI, MS
2	Hexanal	770	774	1055	0.3	0.1	1.6	0.2	0.3	tr	0.1	0.6	0.4	–	RI, MS
3	Heptanal	876	877	1187	0.9	0.2	1.3	tr	0.9	0.9	tr	1.7	2.3	0.1	RI, MS
4	Octanal	980	979	1531	9.1	1.2	12.8	1.0	14.1	22.8	34.0	28.5	32.7	0.6	RI, MS
5	(E)-2-Octenal	1036	1039	1416	1.2	0.1	0.5	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	RI, MS
6	1-Octanol	1058	1063	1394	tr	0.1	2	0.1	1.1	tr	tr	tr	tr	tr	RI, MS
7	Nonan-2-one	1070	1077	1388	0.4	0.1	0.3	0.1	tr	0.2	0.1	tr	tr	tr	RI, MS
8	Nonanal	1083	1081	1394	2.5	0.2	1.7	0.2	1.4	1.3	1.7	5.9	2.3	0.1	RI, MS
9	(E)-2-Nonenal	1136	1133	1530	0.9	0.2	1.4	0.3	1.1	1.3	4	1.5	2	0.2	RI, MS
10	(Z)-2-Nonen-1-ol	1158	1155	1688	0.1	0.1	1.0	0.4	1.4	2.2	1.8	1.5	tr	tr	RI, MS, Ref.
11	Octanoic acid	1173	1174	1866	1.1	0.1	0.5	tr	0.5	0.5	0.3	tr	tr	0.4	RI, MS
12	1-Decen-3-ol	1172	1181	1643	1.7	0.1	0.7	tr	0.2	0.3	0.1	tr	tr	tr	RI, MS
13	Decanal	1185	1183	1498	0.1	0.1	1.0	0.2	tr	0.1	0.5	1.0	0.5	tr	RI, MS
14	3-Dodecen-1-yne	1120	1214	–	0.7	0.1	0.9	tr	0.6	1.0	2.5	3.7	0.9	0.5	RI, MS
15	Carvone	1222	1225	1739	0.2	0.1	0.8	tr	1.0	1.6	1.7	tr	tr	tr	RI, MS
16	(E)-2-Decanal	1248	1251	1652	1.1	Tr	1.0	0.2	0.3	0.4	0.8	2.0	2.2	0.3	RI, MS
17	(E,E)-2,4-Decadienal	1290	1289	1820	tr	0.1	0.7	0.3	0.4	tr	tr	tr	tr	tr	RI, MS
18	β -Ionone	1466	1454	1936	0.2	0.1	0.6	0.2	0.2	0.6	0.9	2.3	0.2	0.1	RI, MS
19	3,4-Dimethyl-5-pentyl-5H-furan-2-one	1481	1486	1495	1.1	0.9	5.7	1.0	1.6	1.7	2.2	2.3	8.5	0.3	RI, MS, Ref.
20	γ -Undecalactone	1533	1524	2266	0.7	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	tr	0.2	tr	0.2	RI, MS
21	Dodecanoic acid	1556	1547	2474	0.5	0.1	0.5	tr	0.4	0.1	0.3	tr	0.1	tr	RI, MS, Ref.
22	Hexadecanoic acid	1962	1968	2330	0.4	0.1	3.7	0.8	3.9	3.6	4.1	0.6	0.2	1.4	RI, MS
23	Falcarinol	2028	2026	3086	71.2	63.5	90.6	90.6	59.6	49.5	39.2	39.6	36.5	91.5	RI, MS, Ref.
24	α -Kaurene	2046	2049	2389	0.7	0.1	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.1	RI, MS
	Total identification %														
	Oxygenated compounds				95.6	87.2	96.2	96.2	91.0	90.9	96.7	91.6	89.2	95.9	
	Hydrocarbon compounds				92.6	85.1	93.5	94.8	87	85.7	89.6	85.4	79.4	94.9	
	Non-terpene compounds				3.0	1.3	5.8	1.4	4.0	5.2	7.1	6.2	9.8	1.0	
	EO yields [%] (w/w)				94.5	87.2	95	95.7	89.4	88.3	93.7	89.1	88.6	95.7	
					0.02	0.11	0.02	0.02	0.05	0.04	0.09	0.1	0.05	0.05	

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). Bold types refer to main compounds. ^b Retention indices of literature on the apolar column (RI_a). ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI_a). ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p). ^e EOcoll: Standard sample of *E. triquetrum* essential oil. Quantification was carried out using RI s relative to tridecane as internal standard. %: Normalized Percentages are given on the apolar column except for components with identical RI_a (percentages are given on the polar column). tr = trace (< 0.05%). ^f AP: Essential oils obtained from aerial parts from specimens harvested in 25 locations (S1 – S25). S_{\min} : minimum content and S_{\max} : maximum content. ^g Essential oils obtained during vegetative cycle (sample S1): Dates of harvest: 1st: 05/05/2016. 2nd: 20/05/2016. 3rd: 15/06/2016. 4th: 01/07/2016. ^h Essential oils obtained from separate plant organs (sample S1). ⁱ RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; Ref. comparison with literature data. All compounds were identified by comparing their EI-MS and retention indices with references compiled in the in-house library, except falcarinol (**23**), dodecanoic acid (**21**), 3,4-dimethyl-5-pentyl-5H-furan-2-one (**19**) and 3-undecen-1-yne (**12**).^[52]

Table 3. Geographical distribution and periods of harvest of *Eryngium triquetrum* samples (S1 – S25) from western Algeria

No. ^a	Plant-vegetative stages & Period of harvest ^b	Locations of harvest ^c	GPS ^d		Alt. ^e
			Latitude	Longitude	
S1	Before flowering beginning, 2016/5/5 – 9	Bouhanak	35°08'16.22"N	1°25'20.67"O	313
S2		Ouled bouayad	35°13'24.16"N	1°28'33.50"O	189
S3		Bni boublène	34°51'58.21"N	1°23'28.45"O	806
S4		El abed	34°28'17.03"N	1°40'51.06"O	1304
S5		Souk lethinin	35°10'52.87"N	1°32'50.97"O	291
S6		Ouled bouayad	35°11'49.55"N	1°27'13.03"O	60
S7		Ain leftouch	34°40'40.15"N	1°31'14.91"O	654
S8		Ain fezza	34°52'37.96"N	1°14'07.62"O	853
S9		Souk lekhmiss 1	35°10'52.87"N	1°32'50.97"O	289
S10		Ouchba	34°52'23.11"N	1°10'12.52"O	788
S11	Early-flowering, 2016/5/14 – 23	El khmiss	34°38'02.70"N	1°33'53.48"O	848
S12		Borj arima	35°04'59.59"N	1°33'19.41"O	251
S13		Sidi 3mar	35°07'27.99"N	1°36'47.82"O	533
S14		Boukio	34°59'45.07"N	1°33'45.00"O	225
S15		Maifrouch	34°50'59.19"N	1°17'46.06"O	1125
S16		Mefrouch	34°50'59.19"N	1°17'46.06"O	1108
S17		Bensekrane	35°04'34.44"N	1°13'33.81"O	319
S18		Remchi	35°04'05.16"N	1°25'41.41"O	175
S19	Flowering, 2016/5/28 – 2016/6/4	Bab elaassa	34°58'04.95"N	2°02'04.08"O	395
S20		Bab el aassa	34°58'48.03"N	2°01'58.04"O	1380
S21		Nedroma	35°00'38.53"N	1°45'11.01"O	356
S22		Amir abdekader	35°12'25.18"N	1°23'39.01"O	94
S23		Bni aad	34°52'01.31"N	1°11'03.84"O	858
S24		Sekkak	35°06'18.69"N	1°05'49.63"O	288
S25		Ain el kbira	35°02'32.70"N	1°40'09.43"O	437

^a Sample codes. ^b Sampling by phenological state. ^c Harvest localities. ^d GPS coordinates. ^e Altitudes (m).

Supporting Information and attached references). Falcarinol has been found in nine botanical families, including 53 genera and 71 species. It is predominant (up to 70%) in the root essential oils of Serbian *Seseli rigidum* and Chinese *Panax vietnamensis*. Falcarinol has also been found in the essential oils prepared from the total aerial parts of plants, but always in lower amounts.

Our literature study revealed the occurrence of falcarinol as the main oil component in several species, however, only the root essential oils of *S. rigidum* and, to a lesser extent, *P. vietnamensis* could be considered as natural sources of falcarinol. As the essential oils of both the aerial parts and the roots of *E. triquetrum* from Algeria were dominated by falcarinol, this plant seems to be a good candidate to produce natural falcarinol.

Biological Activities

Growth Inhibition of Bacteria by the Essential Oil. Results of the determination of the susceptibility of Algerian *E. triquetrum* essential oil, using the agar diffusion method, and minimum inhibitory concentrations (MIC) against five Gram-positive and three Gram-negative strains are presented in Table 4. The sample oil (S1) used for this test contained 90.6% of falcarinol. As seen in the table 4, the diameters of the inhibition zones of the studied sample oil ranged from 6 to 22 mm (10 – 21 mm for the antibiotic used as reference). *E. triquetrum* essential oil has a moderate activity against *S. aureus* ATCC 25923 (Gram-positive) and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negative) with inhibition diameters of 18 and 22 mm respectively, vs. 10 and 21 mm for the antibiotic gentamicin, respectively. The other strains showed a resistance against *E. triquetrum* essential oil. With inhibition diameter of 6 vs. 18 mm for the antibiotic of reference, *B. cereus* ATCC 11778 was the most resistance Gram-positive strain.

The MIC values of the essential oil were measured at 125 µg/ml for two Gram-positive and two Gram-negative bacteria, such as *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *K. pneumoniae* ATCC 70603, respectively. Results of disk diffusion experiments indicated that *B. cereus* ATCC 11778 exhibited the strongest resistance.

The present results may be explained by the high incidence of falcarinol (90.6%) in the essential oil tested. As reported in the literature, the falcarinol-rich essential oil produced by the roots of *S. rigidum* exhibits significant antimicrobial activity against *S. aureus*,

S. epidermidis, *Micrococcus luteus*, and *Enterococcus faecalis*. Activity against *S. aureus* can be attributed to falcarinol.^[47] In the same way, falcarinol is responsible for the good antibacterial activity against *S. aureus*, *Bacillus lentus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* and *Morganella morganii* of the *Calycotome villosa* methanol extract.^[57]

Antioxidant Activity

The BuOH extract of *E. triquetrum* has been shown to have good radical scavenging activity.^[42] In the present study, the antioxidant activity of *E. triquetrum* essential oil was evaluated using the DPPH method, for the first time. The DPPH scavenging ability of the essential oil was expressed as IC₅₀ values, defined as the concentrations providing 50% scavenging of the free radicals, with lower IC₅₀ values reflecting better antioxidant activity. *E. triquetrum* essential oil exhibited interesting DPPH scavenging ability with an IC₅₀ value of 28.68 µg/ml, which is close to the reference BHT, IC₅₀ 17.90 µg/ml. As reported in literature,^{[58][59]} the radical scavenging ability of the essential oil could be attributed to the occurrence of falcarinol which was the predominant oil component.

Conclusions

The present study describes the chemical composition of Algerian *E. triquetrum* essential oil dominated by falcarinol, a C₁₇ polyacetylene with interesting biological activities. GC-FID and GC/MS analyses identified variations in the oil compositions among plant organs and according to the vegetative state of the plant. Our study of 25 individual sample oils showed that the chemical composition of *E. triquetrum* is essentially related to the phenological state of the plant. *E. triquetrum* during the early flowering stage produces an essential oil dominated by falcarinol, then during the flowering stage there is a decrease in falcarinol and rebalancing of octanal. The root essential oil is clearly dominated by falcarinol. The highest occurrence of falcarinol confers to *E. triquetrum* essential oil biological activities such as moderate antimicrobial activity and interesting antioxidant activity.

The present study describes the chemical composition of the *E. triquetrum* essential oil for the first time. Our studies have produced further knowledge about the secondary metabolite production that occurs during the plant life; thus, our data could be relevant for possible further use. Algerian *E. triquetrum* essential oil could be considered as a possible source of natural falcarinol.

Table 4. Antimicrobial activities of *E. triquetrum* essential oil expressed by the diameter inhibition zones and MIC values ($\mu\text{g/ml}$)

Strain	Diameters [mm]		MIC [$\mu\text{g/ml}$]	
	Essential oil	ATB GENT	Essential oil	ATB GENT
<i>Gram-positive</i>				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	14	19	250	4
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	6	18	ND	4
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	17	20	125	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	15	20	250	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	22	21	125	2
<i>Gram-negative</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18	10	125	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	17	20	125	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13	21	250	4

^a MIC, minimum inhibitory concentration (given as $\mu\text{g/ml}$); ATB, antibiotics; GENT, gentamycin (15 μg); ND, not determined.

Experimental Section

Plant Material

The fresh aerial parts of *E. triquetrum* were harvested from May to June 2016, during the vegetative cycle of the plant, from 25 localities of northwest Algeria (Samples S1 – S25). Stems and flowers were separated from the total aerial parts, to study their specific essential oils. For the study of seasonal variations, the fresh aerial parts were harvested each 2 weeks (from early May until early July 2016) from plants growing in Bouhanak (S1). The botanical identification was performed by the botanic department of the University of Tlemcen (Algeria), and voucher specimens have been deposited in the same institution. The sample numbers, their geographical origins, the dates of harvest, and the voucher codes of each specimen analyzed are listed in Table 3.

Essential Oil Isolation

The essential oil extractions were performed using a Clevenger-type apparatus according to the method recommended in the European Pharmacopoeia.^[60] 200 – 500 g of fresh plant was subjected to hydro-distillation. The yields of essential oils were given for all analysed samples in Tables 1 and 2.

Oil Fractionation

E. triquetrum collective oil was obtained by the mixture of individual essential oils prepared from plant material harvested in 25 Algerian locations. A portion of 920 mg of essential oil was submitted to chromatography on a silica gel column (200 – 500 μm , 12 g, Clarisep® Bonna Agela Technologies, Willington,

USA) using an Automatized Combi Flash apparatus (Teledyne ISCO, Lincoln, USA) equipped with a fraction collector monitored by an UV detector. Solvents of elution were hexane (A) and diisopropyl ether (B) allowed to obtain five fractions (a – e) with a gradient of elution: a (A: 100%; B: 0%), b (A: 98%; B: 2%), c (A: 95%; B: 5%), d (A: 90%; B: 10%), e (A: 0%; B: 100%).

GC Analysis

The GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 apparatus (Walton, MA, USA) equipped with a single injector and two flame-ionization detectors (FIDs) for simultaneous sampling to two fused-silica cap. columns (60 m \times 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm ; Restek, Bellefonte, PA, USA) with stationary phases of different polarity, i.e., a nonpolar Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and a polar Rtx-Wax (polyethylene glycol) column. The oven temperature was programmed rising from 60 $^{\circ}\text{C}$ to 230 $^{\circ}\text{C}$ at 28 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then held isothermal at 230 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min; injector temperature, 280 $^{\circ}\text{C}$; detector temperature, 280 $^{\circ}\text{C}$; carrier gas, H_2 (0.7 ml/min); split ratio, 1:80; injection volume, 0.1 ml. The retention indices (RIs) of the compounds were determined rel. to the retention times (t_R) of a series of *n*-alkanes (C_5 – C_{30}); commercial soln. obtained from Restek, Bellefonte, PA, USA) using the equation of Van den Dool and Kratz.^[59]

GC/MS Analysis

The essential oils and the fractions obtained by columns chromatography (CC) were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole detector

directly coupled to a *Perkin Elmer AutoSystem XL* (Walton, MA, USA) equipped with the two same fused-silica capillary columns as described above. Both columns were used with the same MS detector. The analyses were consecutively carried out on the nonpolar and the polar column. Hence, for each sample, two reconstructed ionic chromatograms (RIC) were provided, which were investigated consecutively. The GC conditions were the same as described above, and the MS parameters were as follows: ion-source temperature, 150 °C; ionization energy, 70 eV; EI-MS spectra acquired over a mass range of 35 – 350 amu during a scan time of 1 s. The injection volumes for the oil and the fractions were 0.1 and 0.2 ml, respectively.

Compound Identification

The identification of individual components was based i) on the comparison of the retention indices (RIs) determined on the polar and nonpolar columns with those of authentic compounds or literature data,^[54] ii) on computer matching of the mass spectra with commercial mass-spectral libraries and on the comparison of the mass spectra with those listed in our home-made library built of mass spectra of authentic compounds or literature data.^[60]

Compound Quantification

Quantification of the oil components was performed using the methodology reported by *Bicchi et al.*,^[61] and adapted in our laboratory.^[62] Briefly, the compound quantification was carried out using peak normalization, including FID response factors (RFs) rel. to tridecane (0.7 g/100 g) used as internal standard, and expressed as normalized contents (% abundances).

Microbial Strains

Eight reference strains were used, including five *Gram*-positive bacteria: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Three *Gram*-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Preparation of Inoculum

The pure strains were inoculated into tubes containing 5 ml of Brain Heart Infusion (*CondaPronadisa*TM, Spain)

and then incubated at 37 °C for 18 h. A concentration of 0.5 *McFarland* has been adjusted and which corresponds to 10⁷ CFU/ml according to the Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI.^[63]

Sensitivity Tests – Disc Diffusion Method

The susceptibility of strains to the essential oil was tested according to the method described by *Bauer and Kirby*.^[64] A culture of 18 – 24 h of the tested strains on *Müller–Hinton* broth was prepared at a concentration of 10⁷ CFU/ml and then seeded on *Müller–Hinton* agar (*FlukaBioChemika*, Spain) as recommended by CLSI.^[65] A sterile disc of 6 mm diameter impregnated with 5 µl of essential oil was aseptically deposited in the center of the inoculated plate. For positive control a standard disk of antibiotic (ATB) gentamicin (15 µg) (*Sigma–Aldrich*) was used.

Minimum Inhibitory Concentration

The minimum inhibitory concentration was performed by the method of microplate (96 wells) round bottom using as reported in literature.^[65] Briefly, 10 concentrations of essential oils ranged from 80 to 0.156 mg/ml were made by 1/2 dilutions in sterile glass tubes. Dilution was performed using a blank solution constituted by *Mueller–Hinton* broth (*FlukaBioChemika*, Spain) with 1% *Tween 80* to keep the concentration of that emulsifier constant. Then, microplates were prepared by filling 180 µl of 5.10⁵ CFU/ml inocula (prepared by 1/200 dilution of 10⁸ CFU/ml inocula) with 20 µl of each concentration. The final concentration in wells was ranging from 8 to 0.0156 mg/ml, and the final concentration of *Tween 80* was 1% in each well. After incubation at 37 °C for 24 h, MICs were determined as the lowest concentration of extract for which no microbial growth was observed by visual inspection of the media. A range of concentrations of ATB (*Sigma–Aldrich*) gentamicin from 1 to 5 µg/ml were prepared for positive control.

Inocula of 10⁷ CFU/ml were diluted by 1/100 for a concentration of 10⁵ CFU/ml. On microplate, 180 µl of bacterial suspension 10⁵ CFU/ml were deposited inside the wells. Then 20 µl of the solution of the essential oil was added. The final concentration of *Tween 80* is 0.1% (v/v) to each well and the final concentrations of the essential oil ranged from 0.0078% to 4%.

Supplementary Material

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700343>.

Acknowledgements

The authors are grateful to *Fayçal Hassani* and *Tawfik Ferouani* from Université de Tlemcen, Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Département d'Ecologie & Environnement, to botanical identification.

Author Contribution Statement

A. M.^{1,2} and N. M. performed in collection plant and HD extractions. A. M.^{1,2} participated in the data analysis. A. K. and M. B. performed the microbial experiments. A. M.^{1,2}, M. B., N. D., J. C. and A. M.² conceived the study and helped draft the manuscript. N. D., J. C. and A. M.² performed the coordination of the study, worked on the data analysis and interpretation. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] J. M. Turmel, 'Répartition Géographique des *Eryngium*. I. Ancien Monde', *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. (Paris)* **1948**, *20*, 395 – 401.
- [2] P. Quézel, S. Santa, 'Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales', *CNRS* **1962**, 650 – 651.
- [3] F. Bouzergoune, M. L. Ciavatta, F. Bitam, M. Carbone, M. C. Aberkane, M. Gavagnin, 'Phytochemical Study of *Eryngium triquetrum*: Isolation of Polyacetylenes and Lignans', *Planta Med.* **2016**, *82*, 1438 – 1445.
- [4] A. El Abbouyi, N. Filali-Ansari, S. El Khyari, H. Loukili, 'Inventory of Medicinal Plants Prescribed by Traditional Healers in El Jadida City and Suburbs (Morocco)', *Int. J. Green Pharm.* **2014**, *8*, 242 – 251.
- [5] M. Jaghabir, 'Hypoglycemic Effects of *Eryngium creticum*', *Arch. Pharm. Res.* **1991**, *14*, 295 – 297.
- [6] M. Kartal, A.-C. Mitaine-Offer, T. Paululat, M. Abu-Asaker, H. Wagner, J.-F. Mirjolet, N. Guillaud, M.-A. Lacaille-Dubois, 'Triterpene Saponins from *Eryngium campestre*', *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1105 – 1108.
- [7] E. M. Anam, 'A Novel Triterpenoid Saponin from *Eryngium foetidum*', *Indian J Chem Sect. B* **2002**, *41*, 1500 – 1503.
- [8] M. Kartal, A.-C. Mitaine-Offer, M. Abu-Asaker, T. Miyamoto, I. Calis, H. Wagner, M.-A. Lacaille-Dubois, 'Two New Triterpene Saponins from *Eryngium campestre*', *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2005**, *53*, 1318 – 1320.
- [9] J. Lam, L. P. Christensen, T. Thomasen, 'Acetylenes from Roots of *Eryngium bourgatii*', *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2881 – 2882.
- [10] N. Ayoub, M. Al-Azizi, W. König, K.-H. Kubeczka, 'Essential Oils and a Novel Polyacetylene from *Eryngium yuccifolium* Michx. (Apiaceae)', *Recent Prog. Med. Plants* **2006**, *11*, 237 – 245.
- [11] E. Le Claire, S. Schwaiger, B. Banaigs, H. Stuppner, F. Gafner, 'Distribution of a New Rosmarinic Acid Derivative in *Eryngium alpinum* L. and Other Apiaceae', *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4367 – 4372.
- [12] A. Landoulsi, V. Roumy, N. Duhal, F. H. Skhiri, C. Rivière, S. Sahpaz, C. Neut, J. Benhamida, T. Hennebelle, 'Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Aerial Parts and Roots of *Eryngium barrelieri* Boiss. and *Eryngium glomeratum* Lam. from Tunisia', *Chem. Biodiversity* **2016**, *13*, 1720 – 1729.
- [13] A. R. Abd-Elmonem, N. G. Shehab, 'Study of the Volatile oil of *Eryngium campestre* L. Growing in Egypt', *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **2008**, *44*, 3379 – 3388.
- [14] C. Cavaleiro, M. J. Gonçalves, D. Serra, G. Santoro, F. Tomi, A. Bighelli, L. Salgueiro, J. Casanova, 'Composition of a Volatile Extract of *Eryngium duriaei* subsp. *juresianum* (M. Lainz) M. Lainz, Signalised by the Antifungal Activity', *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 619 – 622.
- [15] C. Capetanos, V. Saroglou, P. D. Marin, A. Simić, H. D. Skaltsa, 'Essential Oil Analysis of Two Endemic *Eryngium* Species from Serbia', *J. Serb. Chem. Soc.* **2007**, *72*, 961 – 965.
- [16] D. Merghache, Z. Boucherit-Otmani, S. Merghache, I. Chikhi, C. Selles, K. Boucherit, 'Chemical Composition, Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activities of Algerian *Eryngium tricuspidatum* L. Essential Oil', *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 795 – 807.
- [17] L. C. Klein-Junior, C. dos S. Passos, T. J. Tasso de Souza, F. Gobbi de Bitencourt, J. Salton, S. A. de L. Bordignon, A. T. Henriques, 'The Monoamine Oxidase Inhibitory Activity of Essential Oils Obtained from *Eryngium* Species and Their Chemical Composition', *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 1071 – 1076.
- [18] J. J. Brophy, R. J. Goldsack, L. M. Copeland, J. Palá-Paúl, 'Essential Oil of *Eryngium* L. Species from New South Wales (Australia)', *J. Essent. Oil Res.* **2003**, *15*, 392 – 397.
- [19] J. A. Pino, A. Rosado, V. Fuentes, 'Composition of the Leaf Oil of *Eryngium foetidum* L. from Cuba', *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 467 – 468.
- [20] D. T. T. Nguyen, T. H. Anh, L. N. Thach, 'The Essential Oil Composition of *Eryngium foetidum* L. in South Vietnam Extracted by Hydrodistillation Under Conventional Heating and Microwave Irradiation', *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2008**, *11*, 154 – 161.
- [21] B. Thiem, M. Kikowska, A. Kurowska, D. Kalemba, 'Essential Oil Composition of the Different Parts and *In vitro* Shoot Culture of *Eryngium planum* L.', *Molecules* **2011**, *16*, 7115 – 7124.
- [22] A. Celik, N. Aydınlik, I. Arslan, 'Phytochemical Constituents and Inhibitory Activity Towards Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of *Eryngium* Species (Apiaceae)', *Chem. Biodiversity* **2011**, *8*, 454 – 459.
- [23] J. Palá-Paúl, J. J. Brophy, M. J. Pérez-Alonso, J. Usano, S. C. Soria, 'Essential Oil Composition of the Different Parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain', *J. Chromatogr. A* **2007**, *1175*, 289 – 293.
- [24] J. U. Chowdhury, N. C. Nandi, M. Yusuf, 'Chemical Constituents of Essential Oil of the Leaves of *Eryngium foetidum* from Bangladesh', *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* **2007**, *42*, 347 – 352.
- [25] K. C. Wong, M. C. Feng, T. W. Sam, G. L. Tan, 'Composition of the Leaf and Root Oils of *Eryngium foetidum* L.', *J. Essent. Oil Res.* **1994**, *6*, 369 – 374.
- [26] R. Chandrika, K. J. T. Saraswathi, G. R. Mallavarapu, 'Constituents of the Essential Oils of the Leaf and Root of *Eryngium foetidum* L. from Two Locations in India', *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2015**, *18*, 349 – 358.

- [27] B. C. Thakuri, C. S. Chanotiya, R. C. Padalia, C. S. Mathela, 'Leaf Essential Oil of *Eryngium foetidum* L. from Far Western Nepal', *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2006**, *9*, 251 – 256.
- [28] N. Dehghanzadeh, S. Ketabchi, A. Alizadeh, 'Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Eryngium caeruleum* Grown Wild in Iran', *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2014**, *17*, 486 – 492.
- [29] M. Marcetic, S. Petrovic, M. Milenkovic, L. Vujisic, V. Tesovic, M. Niketic, 'Composition and Antimicrobial Activity of Root Essential Oil of Balkan Endemic Species *Eryngium palmatum*', *Chem. Nat. Compd.* **2014**, *49*, 1140 – 1142.
- [30] M. Mohammadhosseini, 'Hydrodistilled Volatile Oil from Stems of *Eryngium creticum* Lam. in the Marginal Brackish Regions of Semnan Province by Using Gas Chromatography Combined with Mass Spectrometry', *Asian J. Chem.* **2013**, *25*, 390 – 392.
- [31] M. I. Cobos, J. L. Rodriguez, A. Petre, E. Spahn, J. Casermeiro, A. G. Lopez, J. A. Zygodlo, 'Composition of the Essential Oil of *Eryngium paniculatum* Cav', *J. Essent. Oil Res.* **2002**, *14*, 82 – 83.
- [32] J. Pala-Paul, J. Usano-Aleman, A. C. Soria, M. J. Perez-Alonso, J. J. Brophy, 'Essential Oil Composition of *Eryngium campestre* L. Growing in Different Soil Types. A Preliminary Study', *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1121 – 1126.
- [33] K. Morteza-Semnani, 'Essential Oil Composition of *Eryngium bungei* Boiss', *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 485 – 486.
- [34] K. Cianfaglione, E. E. Blomme, L. Quassinti, M. Bramucci, G. Lupidi, S. Dall'Acqua, F. Maggi, 'Cytotoxic Essential Oils from *Eryngium campestre* and *Eryngium amethystinum* (Apiaceae) Growing in Central Italy', *Chem. Biodiversity* **2017**, *14*, e1700096.
- [35] F. Sefidkon, M. Dabiri, A. Alamshahi, 'Chemical Composition of the Essential Oil of *Eryngium billardieri* F. Delarochae from Iran', *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 42 – 43.
- [36] D. Hashemabadi, B. Kaviani, 'Chemical Constituents of Essential Oils Extracted from the Leaves and Stems of *Eryngium caucasicum* Trautv. from Iran', *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2011**, *14*, 693 – 698.
- [37] J. Pala-Paul, J. Usano-Aleman, J. J. Brophy, M. J. Perez-Alonso, A.-C. Soria, 'Essential Oil Composition of the Different Parts of *Eryngium aquifolium* from Spain', *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 817 – 821.
- [38] M. Saedi, K. Morteza-Semnani, 'Effect of the Essential Oil of *Eryngium caeruleum* on Percutaneous Absorption of Piroxicam Through Rat Skin', *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **2008**, *11*, 485 – 495.
- [39] F. Assadian, S. Masoudi, F. Nematollahi, A. Rustaiyan, K. Larijani, H. Mazloomifar, 'Volatile Constituents of *Xanthogalum purpurascens* Ave-Lall., *Eryngium caeruleum* MB and *Pimpinella aurea* DC. Three Umbelliferae Herbs Growing in Iran', *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 243 – 245.
- [40] J. Palá-Paúl, M. J. Pérez-Alonso, A. Velasco-Negueruela, J. Vadaré, A. M. Villa, J. Sanz, J. J. Brophy, 'Essential Oil Composition of the Different Parts of *Eryngium bourgatii* Gouan from Spain', *J. Chromatogr. A* **2005**, *1074*, 235 – 239.
- [41] J. Palá-Paúl, M. J. Pérez-Alonso, A. Velasco-Negueruela, J. Varadé, A. M. Villa, J. Sanz, J. J. Brophy, 'Analysis of the Essential Oil Composition from the Different Parts of *Eryngium glaciale* Boiss. from Spain', *J. Chromatogr. A* **2005**, *1094*, 179 – 182.
- [42] A. Khalfallah, D. Berrehal, A. Kabouche, A. Karioti, A.-R. Bilia, Z. Kabouche, 'Flavonoids, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Eryngium triquetrum*', *Chem. Nat. Compd.* **2014**, *50*, 130 – 131.
- [43] T. Fujioka, K. Furumi, H. Fujii, H. Okabe, K. Mihashi, Y. Nakano, H. Matsunaga, M. Katano, M. Mori, 'Antiproliferative Constituents from Umbelliferae Plants. V. A New Furanocoumarin and *Falcarindiol* Furanocoumarin Ethers from the Root of *Angelica japonica*', *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 96 – 100.
- [44] C. Zidorn, K. Jöhrer, M. Ganzera, B. Schubert, E. M. Sigmond, J. Mader, R. Greil, E. P. Ellmerer, H. Stuppner, 'Polyacetylenes from the Apiaceae Vegetables Carrot, Celery, Fennel, Parsley, and Parsnip and Their Cytotoxic Activities', *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2518 – 2523.
- [45] R. M. Prior, N. H. Lundgaard, M. E. Light, G. I. Stafford, J. van Staden, A. K. Jäger, 'The Polyacetylene *falcarindiol* with COX-1 Activity Isolated from *Aegopodium podagraria* L.', *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 176 – 178.
- [46] A. Schinkovitz, M. Stavri, S. Gibbons, F. Bucar, 'Antimycobacterial Polyacetylenes from *Levisticum officinale*', *Phytother. Res. PTR* **2008**, *22*, 681 – 684.
- [47] M. Marcetić, D. Bozić, M. Milenković, B. Lakusić, N. Kovacević, 'Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Different Parts of *Seseli rigidum*', *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 1091 – 1094.
- [48] D. Lechner, M. Stavri, M. Oluwatuyi, R. Pereda-Miranda, S. Gibbons, 'The Anti-Staphylococcal Activity of *Angelica dahurica* (Bai Zhi)', *Phytochemistry* **2004**, *65*, 331 – 335.
- [49] J. Lutomski, T. C. Luan, T. T. Hoa, 'Polyacetylenes in the Araliaceae Family. Part IV. The Antibacterial and Antifungal Activities of Two Main Polyacetylenes from *Panax vietnamsis* Ha et Grushv. and *Polyscias fruticosa* (L.) Harms.', *Herba Pol.* **1992**, *38*, 137 – 140.
- [50] A. Maxia, D. Falconieri, A. Piras, S. Porcedda, B. Marongiu, M. A. Frau, M. J. Goncalves, C. Cabral, C. Cavaleiro, L. Salgueiro, 'Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils and Supercritical CO₂ Extracts of *Apium nodiflorum* (L.) Lag', *Mycopathologia* **2012**, *174*, 61 – 67.
- [51] B.-M. Nie, X.-Y. Jiang, J.-X. Cai, S.-L. Fu, L.-M. Yang, L. Lin, Q. Hang, P.-L. Lu, Y. Lu, 'Panaxydol and Panaxynol Protect Cultured Cortical Neurons Against A β 25–35-Induced Toxicity', *Neuropharmacology* **2008**, *54*, 845 – 853.
- [52] Y.-Q. Yang, S.-N. Li, J.-C. Zhong, Y. Zhou, H.-Z. Zeng, H.-J. Duan, Q.-H. Bian, M. Wang, 'Total Synthesis of Each Enantiomer of *Falcarinol* and *Panaxjapyne* A via Asymmetric Catalytic Alkynylation of an Aldehyde', *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 361 – 366.
- [53] W. A. Kçnig, D. Joulain, D. H. Hochmuth, 'Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of Mass Finder 2.1', Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg, Hamburg, 2001.
- [54] R. P. Adams, 'Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry', Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- [55] L.-L. Xu, T. Han, J.-Z. Wu, Q.-Y. Zhang, H. Zhang, B.-K. Huang, K. Rahman, L.-P. Qin, 'Comparative Research of Chemical Constituents, Antifungal and Antitumor Properties of Ether Extracts of *Panax ginseng* and Its Endophytic Fungus', *Phytomedicine* **2009**, *16*, 609 – 616.

- [56] J. Brodmann, R. Twele, W. Francke, G. Hölzler, Q.-H. Zhang, M. Ayasse, 'Orchids Mimic Green-Leaf Volatiles to Attract Prey-Hunting Wasps for Pollination', *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 740 – 744.
- [57] G. Loy, F. Cottiglia, D. Garau, D. Deidda, R. Pompei, L. Bon-signore, 'Chemical Composition and Cytotoxic and Anti-microbial Activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link Leaves', *Il Farm.* **2001**, *56*, 433 – 436.
- [58] Council of Europe, 'European Pharmacopoeia', Ed. Strasbourg, 1997.
- [59] H. van Den Dool, P. Dec Kratz, 'A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography', *J. Chromatogr. A* **1963**, *11*, 463 – 471.
- [60] 'National Institute of Standards and Technology (NIST), PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library', Perkin Elmer Corp, Norwalk, CT, 1999.
- [61] C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. d'Acampora Zellner, R. Costa, P. Rubiolo, 'Quantitative Analysis of Essential Oils: A Complex Task', *Flavour Fragrance J.* **2008**, *23*, 382 – 391.
- [62] S. Andreani, T. Barboni, J. M. Desjobert, J. Paolini, J. Costa, A. Muselli, 'Essential Oil Composition and Chemical Variability of *Xanthium italicum* Moretti from Corsica', *Flavour Fragrance J.* **2012**, *27*, 227 – 236.
- [63] CLSI, 'Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement', 2011.
- [64] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck, 'Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method', *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493 – 496.
- [65] I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock, 'Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances', *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163 – 175.

Received July 24, 2017
Accepted October 26, 2017

Résumé

L'objectif principal de cette thèse est une meilleure connaissance et une valorisation de la richesse floristique de l'Ouest Algérien qui reste, à ce jour, grandement méconnue. Ces travaux constituent une initiation à des projets d'investissement dans le domaine des PPAM sur la base de résultats scientifiques élaborés dans des laboratoires spécialisés dans la valorisation chimique et biologique des huiles essentielles.

Ainsi, l'étude portée sur une caractérisation chimique et sur une évaluation des activités biologiques des métabolites secondaires de la fraction volatile de trois espèces d'Apiacées (famille des Umbellifères) (*E. triquetrum*, *S. olusatrum*, *D. crinitus*) poussant à l'état spontané dans l'Ouest Algérien et la synthèse des composés majoritaires de ces fractions volatils comme décrit dans l'intitulé, la finalité est donc la recherche de nouveaux extractibles, c'est à dire de nouvelles molécules susceptibles d'être actives vis à vis de pathologies, des parasites ou encore des ravageurs de l'agriculture.

L'utilisation de techniques chromatographiques (CPG-DIF, CPG-SM, Chromatographie Flash) a permis une meilleure connaissance des huiles essentielles des espèces étudiées. Elles ont apporté d'importantes informations de la composition chimique en constituants volatils de la plante au cours du cycle végétatif et en fonction de sa localisation géographique. Ainsi une bonne séparation des composés dominant dans les huiles essentielles. Ces huiles essentielles sont riches en composés dotés de propriétés thérapeutiques très intéressante.

Ces travaux ont, aussi, été l'occasion pour mener des investigations structurales (SM. RMN 1D) qui ont abouti à l'identification de la molécule synthétisée dénommée « isochavicol isobutyrate » qui est le composé majoritaire de l'huile essentielle de *D. crinitus* partie aérienne. Ces matrices volatiles ont été l'objet d'une évaluation biologique qui ont montré une certaine réactivité vis-à-vis les différents agents testés. En particulier, les huiles essentielles testé ont montré une activité antimicrobienne contre *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*, ainsi des activités bioherbicides, insecticides et molluscicides intéressantes. Ces huiles essentielles peuvent être des agents de biocontrol qui remplace les produits de synthèse contre les ravageurs de l'agriculture. L'huile d'*E. triquetrum* possède un pouvoir molluscicide contre les parasites elle possède un comportement efficace et sélectif vis-à-vis les schistosomes.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الأطروحة هو معرفة أفضل و تقييم للثراء النباتي للغرب الجزائري الذي لا يزال حتى يومنا هذا غير معروف. هذا العمل هو بداية لمشاريع استثمارية في مجال على أساس النتائج العلمية التي تم تطويرها في المختبرات المتخصصة في التقييم الكيميائي و البيولوجي للزيوت الأساسية النباتات العطرية والطبية

، (E. triquetrum) (عائلة Umbellifera) Apiaceae وهكذا ، ركزت الدراسة على التوصيف الكيميائي وتقييم الأنشطة البيولوجية للمستقلبات الثانوية للجزء المتبخر ثلاثة أنواع من التي تنمو في الحالة العفوية في غرب الجزائر وتوليف غالبية مركبات هذه الكسور المتطايرة كما هو موضح في العنوان ، فإن الغرض (D. crinitus) ، (S. olusatrum) هو البحث عن مستخلصات جديدة ، أي جزيئات جديدة من المحتمل أن تكون نشطة تجاه ضد الأمراض الطفيليات أو حتى الآفات الزراعية

أفضل بالزيوت الأساسية لأنواع المدروسة لقد قدموا (Flash chromatography و CPG-MS و CPG-DIF) أتاح معرفة استخدام تقنيات الكروماتوغرافيا معلومات مهمة عن التركيب الكيميائي للمكونات المتطايرة للنبات خلال الدورة الخضري واعتمادا على موقعه الجغرافي. وبالتالي فصل جيد للمركبات السائدة في الزيوت الأساسية.

وهو المركب "isochavicol isobutyrate" التي أدت إلى تحديد الجزيء المركب المسمى (MS. 1D NMR) كان هذا العمل أيضا فرصة لإجراء التحقيقات الهيكلية كانت هذه المصفوفات المتطايرة موضوع تقييم بيولوجي أظهر تفاعلا معينا تجاه العوامل المختلفة التي تم اختبارها. على وجه crinitus. الجزء الجوي D. الرئيسي للزيت الأساسي لـ ، بالإضافة إلى أنشطة مبيدات Staphylococcus aureus و Enterococcus faecalis الخصوص ، أظهرت الزيوت الأساسية التي تم اختبارها نشاطا مضادا للميكروبات ضد الحشرات الحيوية ومبيدات الحشرات ومبيدات الرخويات المثيرة للاهتمام. يمكن أن تكون هذه الزيوت الأساسية عوامل مكافحة الحيوية التي تحل محل المنتجات الاصطناعية ضد لديه قوة مبيدات الرخويات ضد الطفيليات وله سلوك فعال وانتقائي تجاه الطفيليات E. Triquetrum الآفات الزراعية. زيت

Abstract

The main objective of this thesis is a better knowledge and a valuation of the flora richness of the Algerian West which remains, to this day, largely unknown. This work constitutes an initiation to investment projects in the field of PPAM on the basis of scientific results developed in laboratories specializing in the chemical and biological valuation of essential oils.

Thus, the study concerns a chemical characterization and an evaluation of the biological activities of the secondary metabolites of the volatile fraction of three species of Apiaceae (family of Umbellifera) (*E. triquetrum*, *S. olusatrum*, *D. crinitus*) growing in the spontaneous state in western Algeria and the synthesis of the majority compounds of these volatile fractions As described in the title, the purpose is therefore the search for new extractables, i.e. new molecules likely to be active vis against pathologies, parasites or even agricultural pests.

The use of chromatographic techniques (CPG-DIF, CPG-MS, Flash chromatography) allowed a better knowledge of the essential oils of the species studied. They have provided important information on the chemical composition of volatile constituents of the plant during the vegetative cycle and depending on its geographical location. Thus a good separation of the dominant compounds in essential oils. These essential oils are rich in compounds with very interesting therapeutic properties.

This work was also an opportunity to carry out structural investigations (MS. 1D NMR) which led to the identification of the synthesized molecule called "isochavicol isobutyrate" which is the major compound of the essential oil of *D. crinitus* aerial part. These volatile matrices were the subject of a biological evaluation which showed a certain reactivity towards the different agents tested. In particular, the essential oils tested showed antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, as well as interesting bioherbicidal, insecticidal and molluscicidal activities. These essential oils can be biocontrol agents that replace synthetic products against agricultural pests. The oil of *E. triquetrum* has a molluscicidal power against the parasites it has an effective and selective behavior vis-à-vis the schistosoma.