



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMEN  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS



**Département de Biologie**  
**LABORATOIRE DE PRODUITS NATURELS**

**Thèse**

En vue de l'obtention du diplôme

**Doctorat L.M.D en Biologie**

**Option : Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques**

**Évaluation de l'activité antioxydante et  
antimicrobienne d'*Ammi visnaga* L. durant  
trois périodes de croissance**

Présentée par : **BRAHMI Fairouz**

**Jury**

---

M <sup>me</sup> ATIK BEKKARA F.	Présidente	Professeur à l'Université de Tlemcen
M <sup>me</sup> BEKHECHI C.	Examinatrice	Maitre de Conférences à l'Université de Tlemcen
M <sup>r</sup> LAZZOUNI H.	Examineur	Professeur à l'Université de Tlemcen
M <sup>r</sup> BAHRI F.	Examineur	Professeur à l'Université de Mostaganem
M <sup>r</sup> FOUJIL CHERIF Y.	Examineur	Professeur à U.S.T.H.B. d'Alger
M <sup>me</sup> KEBBOUCHE GANA S.	Directrice de thèse	Maitre de Conférences à l'Université de Boumerdes

*Année universitaire : 2014-2015*

## **Remerciements**

*Avant toute chose, Nous remerciant Dieu, le tout puissant, pour avoir données la force et la patience.*

Nombreux sont ceux qui n'ont épargné aucun effort pour mener à bien ce travail :

Je témoigne en premier lieu mon énorme gratitude à ma promotrice Madame **KEBBOUCHE GANA S.**, Maître de conférences au département de Biologie à l'Université de Boumerdes M'HAMED BOUGARA de m'avoir autorisé à travailler dans son laboratoire de recherche, pour m'avoir assisté et guidé, pour ses précieux conseils, pour ses encouragements permanents, pour sa patience et pour tout ce qu'elle a apporté directement et indirectement à ma formation.

J'exprime ma reconnaissance à Madame **ATIK BEKKARA F.**, Professeur au département de Biologie à l'Université de Tlemcen ABOU BAKR BELKAIED pour m'avoir donné l'occasion de poursuivre mes études de post graduation et pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

J'exprime toute ma gratitude à Madame **BEKHECHI C.**, Maître de conférences au département de Biologie à l'Université de Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait en examinant ce travail.

Je remercie vivement Monsieur **LAZZOUNI H.**, Professeur au département de Biologie à l'Université de Tlemcen pour l'honneur qu'il me fait en examinant ce travail.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Monsieur **BAHRI F.**, Professeur au département de Biologie de l'Université de Mostaganem, pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury.

Je remercie également Monsieur **FOUDIL C.Y.**, Professeur à l'U.S.T.H.B. d'Alger, pour l'honneur qu'il me fait en examinant ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à madame **CHAHBAR N.**, Maître de conférences au département de Biologie à l'Université de Boumerdes pour ses conseils, son aide et sa disponibilité malgré ses multiples tâches.

Enfin, j'exprime toute ma reconnaissance à l'égard de tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé d'une manière ou d'une autre dans l'élaboration de ce travail.

***Mes remerciements vont également***

***A ma très chère mère Hamida***

*Affable, honorable, aimable : vous représentez pour moi la lumière, le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.*

***A mon père Lounnas***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

***A mon cher mari Mohammed El- Hassen El-Maamoun***

*Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.*

***A ma très chère belle famille***

***A mes très chers sœurs : Imen et Zineb***

***A mon très cher frère : Mohammed Amine***

Fairouz

## المخلص

بغرض تقييم النباتات الطبية الجزائرية لقد اهتمنا بدراسة النشاطات البيولوجية للزيوت الأساسية والمستخلصات الفينولية لنبته الخلة (*Ammi visnaga*) (الأسرة الخيمية).

المعاينة الفيتوكيميائية أثبتت أن هذا النبات غني بالبوليفينول (الفلافونيدات ، تانا والكومارين). تم إجراء تحليل نوعي وكمي للزيوت الأساسية المستخرجة عن طريق التقطير بالبخار ، وهذا سمح لنا بتحديد وقياس مكونات هذه الزيوت عن طريق تحليلها ب GC/MS.

وفيما يتعلق بالمستخلصات الفينولية، وأظهر فحص كمية البوليفينول في مختلف أجزاء النبتة أن الساق المستخلص في مختلف أطوار نمو النبتة هو الأكثر غنى بمادة البوليفينول.

أظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة للزيوت الأساسية والمستخلصات الفينولية بواسطة طريقتين، إرجاع الحديد وتثبيط الجذور الحرة DPPH ، أن للزيوت الأساسية نشاط مضاد للأكسدة معتبر بالمقارنة مع المستخلصات الميثانولية لنبته ويرجع هذا لتركيبها الكيميائية. وأظهرت نتائج دراسة النشاط البكتيري للزيوت الأساسية والمستخلصات الفينولية لنبته الخلة درجة متفاوتة من الحساسية. أما بالنسبة للنشاط مضاد للحشرات فقد أثبتت التجارب أن مستخلص البذور هو الأكثر فعالية ضد قملة النبات *Toxoptera aurantii* .

**الكلمات المفتاحية:** نبتة الخلة (*Ammi visnaga*) ، زيوت أساسية ، مستخلصات فينولية ، نشاط أكسدي، نشاط بكتيري، مضاد للحشرات

## Résumé

Dans le but de la valorisation des plantes Algérienne. Nous nous sommes intéressés à l'étude des activités biologiques des huiles essentielles et des extraits phénoliques de la plante *Ammi visnaga* L. (*Apiaceae*).

Le screening chimique a montré que cette plante est riche en polyphénols (flavonoïdes et tanins). L'analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles extraite par hydrodistillation a été réalisée par CPG/SM, ceci nous a permis d'identifier et de quantifier les constituants de ces huiles. En ce qui concerne les extraits phénoliques, le dosage des polyphénols a montré que les tiges sont les plus riches en polyphénols.

L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits phénoliques par deux méthodes, le piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur a montré que les huiles essentielles possèdent un très bon pouvoir antioxydant qui est en relation avec leur composition chimique et que les extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* possèdent un pouvoir antioxydant plus faible que celui des huiles essentielles.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré une action et un degré de sensibilité variables. Alors que, l'évaluation de l'activité insecticide des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* a montré que l'extrait des graines est l'extrait le plus actif contre le puceron noir *Toxoptera aurantii*.

**Mots clés :** *Ammi visnaga* L., huiles essentielles, extraits méthanoliques, pouvoir antioxydant, activité antimicrobienne, activité insecticide.

## **Abstract**

The purpose of this study is the valorization of the Algerian medicinal plants. We sum interested in the study of biological activities of essential oils and methanol extracts of the plant *Ammi visnaga* L. (*Apiaceae*).

The phytochemical screening has shown that this plant is rich in polyphenols (flavonoids, tannins and coumarins). The qualitative and quantitative analysis of essential oils extracted by steam distillation was performed by GC / MS, this allowed us to identify and quantify the constituents of these oils. As regards methanol extracts, the total phenol content was varied. The stems extracts presented the higher total phenol contents.

The antioxidant activity of essential oils and methanol extracts was evaluated using two methods, reducing power and free radical scavenging activity. Essential oils presented an interesting antioxydant activity that is related to their chemical composition and was higher than the antioxydant activity of *Ammi visnaga* methanolic extracts. The results for the study of antimicrobial activity showed a variable degree of sensitivity.

The evaluation of the insecticide activity of *Ammi visnaga* methanol extracts showed that seeds extract was the most effective against the black aphid *Toxoptera aurantii*.

**Key words:** *Ammi visnaga* L., essential oils, methanolic extracts, antioxydant power, antimicrobial activity, insecticidal effect.

## Sommaire

Sommaire .....	I
Liste des figures .....	VI
Liste des photos .....	VII
Liste des tableaux .....	X
Liste d'abréviation .....	XII
Introduction générale .....	2

### 1ère Partie : Synthèse bibliographique

#### I. Généralités sur les plantes médicinales et substances actives

I.1 Métabolites primaires.....	5
I.2. Métabolites Secondaires .....	5
I.2.1 Alcaloïdes .....	5
I.2.2 Terpènes .....	5
I.2.3 Composés phénoliques .....	6
I.2.3.1 Classification des composés phénoliques .....	6
I.2.3.2 Rôles et intérêts des composés phénoliques .....	7
I.2.4 Huiles essentielles.....	9
I.2.4.1 Caractéristiques et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	9
I.2.4.2 Localisation des huiles essentielles.....	10
I.2.4.3 Composition chimique des huiles essentielles.....	10
I.2.4.4 Usage des huiles essentielles .....	10
I.2.4.5 Toxicité des huiles essentielles .....	11
I.2.4.6 Procédés d'extraction des huiles essentielles .....	12
I.2.4.7 Méthodes d'analyses de la composition chimique des huiles essentielles .....	12

#### II. Etude des activités biologiques

II.1 Activité antioxydante.....	13
II.1.1 Définition d'un antioxydant .....	13
II.1.2 Stress oxydatif et radicaux libres.....	13
II.1.3 Mécanisme d'action des antioxydants .....	14
II.1.4 Système antioxydant.....	15
II.1.4.1 Systèmes de défense endogènes .....	15
II.1.4.2 Systèmes de défense exogènes .....	16
II.1.5 Classification des antioxydants .....	16
II.1.5.1 Selon leur mode d'action .....	16

II.1.5.2 Selon leur nature chimique .....	17
II.2 Activité antimicrobienne .....	17
II.3 Effet insecticide .....	18

### **III. Méthodes d'analyse des activités biologiques**

III.1 Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	19
III.1.1 Piégeage du radical libre DPPH .....	19
III.1.2 Réduction de fer FRAP .....	20
III.1.2 Test de décoloration du $\beta$ carotène.....	21
III.2 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne .....	21
III.2.1 Contact direct .....	21
III.2.2 Dilution sur milieu solide ou liquide.....	21
III.2.3 Diffusion sur milieu gélosé (Aromatogramme) .....	22
III.2.4 Méthode de diffusion en puit ou en cylindre .....	23
III.2.5 Technique de microatmosphère.....	23
III.3 Méthodes de détermination de l'activité insecticide .....	24

### **IV. Etude botanique d' *Ammi visnaga***

IV.1 Généralités sur la famille des <i>Apiaceae</i> .....	25
IV.2 Intérêts de la famille des <i>Apiaceae</i> .....	26
IV.3 <i>Ammi visnaga</i> L .....	26
IV.3.1 Description morphologique.....	26
IV.3.2 Systématiques botanique et nomenclatures.....	29
IV.3.2.1 Noms scientifiques .....	29
IV.3.2.2 Noms vernaculaires.....	29
IV.3.2.3 Classification et systématique .....	30
IV.3.3 Origine et répartition géographique .....	30
IV.3.4 Utilisation thérapeutique et médicinale.....	31
IV.3.5 Composition chimique d' <i>A. visnaga</i> .....	32
IV.3.5.1 Les fruits .....	32
IV.3.5.1 Les huiles essentielles .....	33

## **2ème Partie : Partie expérimentale**

### **Matériel et méthodes**

I Matériel.....	37
I.2 Matériel biologique .....	37
I.2.1 Matériel animal .....	37
I.2.2 Matériel végétal.....	37
I.2.2.1 Zone de récolte.....	38
I.2.3 Souches microbiennes étudiées .....	40

II Méthodes .....	41
II.1 Préparation de l'échantillon végétal .....	42
II.1.1 Récolte .....	42
II.1.2 Séchage .....	42
II.1.3 Broyage.....	42
II.1.4 Conservation.....	42
II.2 Screening phytochimique .....	42
II.2.1 Préparation du filtrat (infusé).....	42
II.2.1.1 Tanins .....	42
II.2.1.2 Flavonoïdes.....	43
II.2.1.3 Anthocyanes .....	43
II.2.1.4 Alcaloïdes .....	43
II.2.1.5 Coumarines.....	43
II.2.1.6 Quinones.....	44
II.2.1.7 Amidon .....	44
II.2.1.8 Saponosides .....	44
II.2.1.9 Stérols et polyterpènes .....	44
II.3 Détermination de la teneur en eau .....	45
II.4 Extraction des huiles essentielles.....	45
II.4.1 Protocole d'extraction.....	45
II.4.2 Détermination des rendements d'extraction des huiles essentielles.....	46
II.4.3 Détermination des caractères organoleptiques des huiles essentielles .....	47
II.4.4 Caractérisation des huiles étudiées .....	47
II.4.5 Caractérisation des huiles essentielles par CPG/SM .....	48
II.5 Préparation des extraits bruts méthanoliques .....	49
II.5.1 Rendement en extraits méthanoliques .....	51
II.6 Dosage des composés phénoliques.....	51
II.6.1 Polyphénols totaux .....	51
II.6.2 Flavonoïdes .....	51
II.6.3 Tanins .....	52
II.7 Analyse qualitative des extraits méthanoliques par chromatographie sur couche mince ...	52
II.8 Activité antioxydante.....	54
II.8.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	54
II.8.2 Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power).....	54
II.9 Méthodes microbiologiques .....	55
II.9.1 Revivification des souches .....	55
II.9.1.1 Pré culture des souches bactériennes .....	55
II.9.1.2 Pré culture des levures et moisissures .....	55
II.9.2 Préparation de l'inoculum microbien .....	55
II.9.3 Activité antibactérienne.....	56
II.9.4 Antibiogramme des souches bactériennes .....	57
II.9.5 Activité antifongique .....	57
II.9.5.1 Activité antifongique des huiles essentielles.....	57

II.9.5.2	Activité antifongique des extraits méthanoliques.....	57
II.9.6	Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....	58
II.10	Détermination de l'activité insecticide des extraits méthanoliques .....	59
II.10.1	Matériel biologique.....	59
II.10.1.1	Matériel animal .....	59
II.10.1.2	Matériel végétal .....	59
II.10.2	Dispositif expérimental.....	59
II.10.3	Essais biologiques.....	60
II.10.4	Détermination des taux de mortalité.....	61
II.10.5	Analyses des données .....	61
II.11	Analyses statistiques.....	61
<b>Résultats et discussions</b>		
1	Screening phytochimique .....	63
2	Le taux d'humidité .....	64
3	Caractérisation des huiles essentielles.....	66
3.1	Rendement en huiles essentielles .....	66
3.2	Caractères organoleptiques .....	67
3.3	Caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles .....	67
3.4	Composition chimique des huiles essentielles analysées par CPG-SM.....	69
4	Caractérisation des extraits phénoliques .....	74
4.1	Rendement.....	74
4.2	Dosage des composés phénolique .....	76
4.3	Chromatographie sur couche mince CCM des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> L.....	79
5	Pouvoir antioxydant .....	84
5.1	Piégeage du radical DPPH' .....	85
5.2	Pouvoir réducteur de fer (FRAP) .....	92
6	Activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques.....	97
6.1	Etude qualitative de l'activité antimicrobienne.....	97
6.1.1	Antibiogramme des souches bactériennes .....	112
6.2	Etude quantitative de l'activité antimicrobienne(CMI) .....	113
7	Evaluation de la toxicité aigüe de contact des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> .....	113
7.1	Observation des symptômes .....	113
7.2	Toxicité de contact .....	113
7.2.1	Relation dose – mortalité .....	113
7.2.2	Cinétique de mortalité <sup>120</sup>	
7.3	DL <sub>50</sub> de contact des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> .....	122
<b>Conclusion générale</b> .....		128
<b>Références bibliographiques</b> .....		132
<b>Annexes</b> .....		i-XXVii

## Liste des figures

<b>Figure 01.</b> Réaction du DPPH• avec un antioxydant.....	20
<b>Figure 02.</b> Illustration de la méthode des aromagrammes .....	22
<b>Figure 03.</b> Illustration de la méthode de diffusion en puit .....	23
<b>Figure 04.</b> Illustration de la méthode de microatmosphère .....	24
<b>Figure 05.</b> Schéma représentatif de la plante d' <i>Ammi visnaga</i> L. pendant la période de fructification .....	27
<b>Figure 06.</b> Répartition géographique d' <i>Ammi visnaga</i> en Algérie .....	31
<b>Figure 07.</b> Structures chimiques de la khelline, visnagine et visnadine.....	34
<b>Figure 08.</b> Carte géographique des communes de la wilaya de Boumerdes (Algérie), illustrant Bordj-Menaiel la région de collecte .....	39
<b>Figure 09.</b> Schéma récapitulatif de l'ensemble des techniques réalisées .....	41
<b>Figure 10.</b> Étapes d'obtention des extraits bruts méthanoliques .....	50
<b>Figure 11.</b> Teneur en eau d' <i>Ammi visnaga</i> L. A : avant floraison, B: pleine floraison, C : période de fructification.....	65
<b>Figure 12.</b> Diagramme de rendement des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> .....	66
<b>Figure 13.</b> Rendements des extraits méthanoliques des différentes parties de la plante <i>Ammi visnaga</i> L. durant différentes périodes de croissance.....	75
<b>Figure 14.</b> Courbe d'étalonnages d'acide gallique .....	76
<b>Figure 15.</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	77
<b>Figure 16.</b> Courbe d'étalonnage de la catéchine .....	77
<b>Figure 17.</b> Piégeage du radical libre DPPH par : .....	85
A: L'acide ascorbique, B : L'huile essentielle de la partie aérienne d' <i>Ammi visnaga</i> durant la période d'avant floraison, C : L'huile essentielle de la partie aérienne d' <i>Ammi visnaga</i> durant la période de pleine floraison, D : L'huile essentielle de la partie aérienne d' <i>Ammi visnaga</i> durant la période de fructification.	

<b>Figure 18.</b> Piégeage du radical libre DPPH par les différentes tiges d' <i>Ammi visnaga</i> : .....	89
A:tige de la période d'avant floraison, B : tige de la période de pleine floraison, C : tige de la période de fructification	
<b>Figure 19.</b> Piégeage du radical DPPH par les extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> .....	90
A : les fleurs et B : les graines d' <i>Ammi visnaga</i> , C: feuilles de la période d'avant floraison, D : feuilles de la période de pleine floraison, E : feuilles de la période de fructification.	
<b>Figure 20.</b> Pouvoir réducteur des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> et d'acide ascorbique par la méthode de FRAP .....	93
<b>Figure 21.</b> Histogramme des valeurs des absorbances des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> et d'acide ascorbique à 700nm.....	93
<b>Figure 22.</b> Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> et d'acide ascorbique par la méthode de FRAP .....	95
<b>Figure 23.</b> Histogramme des valeurs des absorbances des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> et d'acide ascorbique à 700nm.....	95
<b>Figure 24.</b> Relation dose-mortalité après contact topique avec les différents extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> .....	118
<b>Figure 25.</b> Cinétique de la mortalité.....	121

## Liste des photos

- Photo 1.** *Ammi visnaga* (L.) Lam. (*Apiaceae*) (Ruščić et Nikolić, 2011)..... 28
- Photo 2.** Parties aériennes d'*Ammi visnaga* L. (échantillon collecté le mois de juin (Original)) .. 37
- Photo 3.** Extraction des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. par hydrodistillation (originale) .. 46
- Photo 4.** Evaluation de l'efficacité des extraits méthanoliques *Ammi visnaga* L. contre le puceron *Toxoptera aurantii*..... 60
- Photo 5.** Plaque CCM des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* et des standards ..... 80
- Photo 6.** Minis CCM des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* et des standards  
A: quercétine, B : acide gallique, C : acide phénolique, D: catéchol..... 81
- Photo 7.** Sensibilité de quelques bactéries vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*..... 99  
A : Sensibilité de *Serratia sp* vis-à-vis HE.Av d'*Ammi visnaga* L.  
B : Sensibilité de *Salmonella sp* vis-à-vis HE.F d'*Ammi visnaga* L.  
C : Sensibilité de *Escherichia coli* vis-à-vis HE.F d'*Ammi visnaga* L.
- Photo 8.** Sensibilité de quelques champignons vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* ..... 101  
A : Sensibilité de *Geotricum sp* vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (D =30µl) après 48h.  
B : Sensibilité de *Phoma sp* vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (D =30µl) après 96h.
- Photo 9.** Sensibilité de quelques bactéries vis-à-vis quelques extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* ..... 105
- Photo 10.** Sensibilité de quelques levures vis-à-vis quelques extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* ..... 107
- Photo 11.** Sensibilité de quelques champignons vis-à-vis quelques extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* ..... 109-110

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Quelques composés phénoliques et leurs activités biologiques.....	8
<b>Tableau 2</b> : Synonymes d' <i>Ammi visnaga</i> L.....	29
<b>Tableau 3</b> : Noms vernaculaires d' <i>Ammi visnaga</i> L.....	29
<b>Tableau 4</b> : Classification et systématique de la plante étudiées .....	30
<b>Tableau 5</b> : Périodes de récolte, période de croissance et parties récoltées de la plante <i>Ammi visnaga</i> L.....	38
<b>Tableau 6</b> : Données géographiques de Bordj-Menaiel.....	38
<b>Tableau 7</b> : Souches microbiennes utilisées.....	40
<b>Tableau 8</b> : Evaluation de la teneur en saponosides.....	44
<b>Tableau 9</b> : Conditions opératoires de la CPG/SM.....	49
<b>Tableau 10</b> : Systèmes de migration des polyphénols testés .....	53
<b>Tableau 11</b> : Nom, classes et doses d'antibiotiques testés.....	56
<b>Tableau 12</b> : Résultats de screening phytochimique des différentes parties de la plante <i>Ammi visnaga</i> L.....	63
<b>Tableau 13</b> : Les caractères organoleptiques des huiles essentielles <i>Ammi visnaga</i> L.....	67
<b>Tableau 14</b> : Caractéristiques physicochimiques des HE d' <i>Ammi visnaga</i> et de quelques plantes de la famille des ombellifères durant différentes périodes de croissance .....	68
<b>Tableau 15</b> : Composition chimique des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> L .....	69
<b>Tableau 16</b> : Rendement en composées phénoliques de plante étudiée pour 1g pendant 72h .....	75
<b>Tableau 17</b> : Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et des tanins des extraits étudiés .....	78
<b>Tableau 18</b> : Comparaison entre les teneurs des polyphénols totaux (PT) et de flavonoïdes (F) contenant dans les extraits méthanoliques de quelques <i>Apiaceae</i> .....	78
<b>Tableau 19</b> : Couleurs des taches observées sur les plaques CCM et les rapports frontaux (Rf.) des différents standards utilisés .....	82

<b>Tableau 20 :</b> Couleurs des taches observées sur les plaques CCM et les rapports frontaux (Rf.) des différents extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> L. et standards .....	82
<b>Tableau 21:</b> Couleurs et significations des taches observées sur les plaques CCM .....	83
<b>Tableau 22:</b> Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les HE d' <i>Ammi visnaga</i> .....	84
<b>Tableau 23:</b> Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des tiges d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant différentes périodes de croissance .....	86
<b>Tableau 24:</b> Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits méthanoliques des différentes tiges d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant trois périodes de croissance .....	87
<b>Tableau 25:</b> Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits méthanoliques des différentes feuilles d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant trois périodes de croissance .....	87
<b>Tableau 26:</b> Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits méthanoliques des fleurs et des graines d' <i>Ammi visnaga</i> .....	88
<b>Tableau 27:</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> L .....	88
<b>Tableau 28:</b> Comparaison entre les valeurs d'IC <sub>50</sub> des extraits phénoliques de quelques épices appartenant à la famille des <i>Ombellifères</i> .....	92
<b>Tableau 29:</b> Pouvoir réducteur des trois huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> L. et d'acide ascorbique .....	92
<b>Tableau 30 :</b> Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des feuilles d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant différentes périodes de croissance .....	94
<b>Tableau 31:</b> Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des tiges d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant différentes périodes de croissance .....	94
<b>Tableau 32:</b> Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des fleurs et des graines d' <i>Ammi visnaga</i> L .....	94
<b>Tableau 33:</b> Activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> L .....	98
<b>Tableau 34:</b> Activité antifongique des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> L .....	100

<b>Tableau 35:</b> Activité antibactérienne des différents extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> L.....	104
<b>Tableau 36:</b> Effet des différents extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> L. sur les levures.....	106
<b>Tableau 37:</b> Activité antifongique des différents extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> L.....	108
<b>Tableau 38 :</b> Diamètres d'inhibitions des antibiotiques testés.....	113
<b>Tableau 39:</b> Valeurs de CMI des trois huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> L .....	114
<b>Tableau 40:</b> Valeurs de CMI des extraits méthanoliques d' <i>Ammi visnaga</i> L.....	115
<b>Tableau 41 :</b> Variation des valeurs de DL <sub>50</sub> en fonction des extraits administrés chez <i>Toxoptera aurantii</i> .....	124

## Liste des abréviations

<b>ABTS•</b>	Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
<b>AFNOR</b>	Association Française de normalisation.
<b>AH</b>	Composés phénoliques
<b>ALCL<sub>3</sub></b>	Chlorure d'aluminium
<b>ATCC</b>	American Type Culture Cells
<b>BHA 320</b>	3-Tertiobutyl-4-hydroxyanisole
<b>BHT 321</b>	3,5-Ditertiobutyl-4-hydroxytoluène
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CONV</b>	Composé organique non volatiles
<b>COV</b>	Composé organique volatiles
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DMSO</b>	Diméthyl sulfoxyde
<b>EAG</b>	Equivalent d'acide gallique
<b>DPPH</b>	2,2-Diphényl-1-picryl-hydrazyl
<b>DPPH•</b>	Diphénylpicrylhydrazyl
<b>EC</b>	Equivalent de catéchine
<b>EQ</b>	Equivalent de quercétine
<b>ERO (ROS)</b>	Espèce réactive oxygénée
<b>FAO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Chlorure de Fer
<b>Feuille Av.</b>	Feuilles d' <i>Ammi visnaga</i> collectées avant la période de floraison
<b>Feuille F.</b>	Feuilles d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant la période de fructification
<b>Feuille Pl.</b>	Feuilles d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant la période de floraison
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Antioxydant Parameter
<b>GSH</b>	Glutathion peroxydase
<b>GPX</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Le peroxide d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Acide sulfurique
<b>H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub></b>	Acide phosphomolybdique
<b>H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub></b>	Acide phosphotungstique
<b>HE</b>	Huile essentielle
<b>HE Av.</b>	Huile essentielle de la période d'avant floraison
<b>HE Pl.</b>	Huile essentielle de la période de pleine floraison
<b>HE F.</b>	Huile essentielle de la période de fructification
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration permettant d'inhiber 50 % du radical DPPH
<b>IPP</b>	Isopentyl pyrophosphate
<b>IRAC</b>	Insecticide Resistance Action Comite
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose limite pour tuer 50% de la population teste
<b>LDL</b>	Lipoprotéine de faible densité
<b>MVS</b>	Matière végétale sèche
<b>MVF</b>	Matière végétale fraiche
<b>NCCLS</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hydroxyl
<b>OMS</b>	Organisation Mondial de santé
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxynitrite
<b>PDA</b>	Agar dextrose pomme de terre
<b>RH</b>	Acide gras libre
<b>RMN</b>	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
<b>ROH</b>	Radical alcoxyle
<b>ROOH</b>	Hydroperoxyde
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SM</b>	Spectrométrie de masse
<b>Tige Av.</b>	Tiges d' <i>Ammi visnaga</i> collectées avant la période de floraison
<b>Tige F.</b>	Tiges d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant la période de fructification
<b>Tige Pl.</b>	Tiges d' <i>Ammi visnaga</i> collectées durant la période de floraison
<b>UFC:</b>	Unité Formant des Colonies

*Introduction*  
*générale*

Pour se soigner, l'utilisation des plantes date depuis très longtemps et tous les peuples sur tous les continents ont cette vieille tradition (Damintoti *et al.*, 2005). Malgré les efforts des chimistes pour synthétiser de nouvelles molécules, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes (Newman *et al.*, 2000). Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être nocifs ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (Duraffourd *et al.*, 1997).

Par ailleurs, le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un exemple concret illustrant la problématique liée à l'usage abusive de ces produits dans la médication animale et humaine. Face à cette situation préoccupante, d'énormes efforts sont consentis dans le domaine de la recherche médicale en vue de trouver de nouvelles molécules naturelles actives, efficaces et non toxiques pouvant substituées les antibiotiques (Hemaiswarya *et al.*, 2008).

De plus, le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des radicaux libres (molécules extrêmement réactifs ayant un ou plusieurs électrons non appariés (Vansant, 2004) qui sont produits par divers mécanismes physiologiques comme l'inflammation, l'oxydation lipidique, le cycle de redox,...etc.) (Favier, 2003) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999), ce qui favorise l'apparition de plusieurs maladies tels que : L'asthme, l'inflammation, l'arthrite, la neuro-dégénérescence, la maladie de Parkinson, diabète et plusieurs types de cancers (Perry *et al.*, 2000).

Toute fois, les antioxydants sont définis comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Favier, 2003). Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004). L'intérêt accru des antioxydants d'origine naturelle est du à leur utilisation dans plusieurs domaines industriels (pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire) et par le fait que certains antioxydants synthétiques comme le butylhydroxytoluène (BHT) et terbutylhydroxyanisol (BHA) ont des effets nocifs sur la santé humaine (Farag *et al.*, 1986).

La biomasse végétale en particulier les plantes médicinales peuvent constituer un réservoir de molécules bioactives tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles pourvues de propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Epifano *et al.*, 2007). Bien évidemment, la flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale:

Méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces végétales appartenant à plusieurs familles botaniques (Benkiki et *al.*, 2006).

En effet, l'espèce *Ammi visnaga* L., famille des *Apiaceae* est connue par ses propriétés diurétiques, spasmolytiques, appétantes, eupeptiques, carminatives et antilithiastiques ainsi par ses effets hypoglycémiques. Reconnu également pour son utilisation dans le traitement des maladies des voies urinaires et respiratoires (Greiner et *al.*, 1950; Paloma, 2012). C'est pourquoi, cette plante a attiré l'attention de plusieurs chercheurs. La composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* ainsi que son effet antimicrobien et antifongique a déjà été le sujet de recherches des équipes tunisiennes (Khadhri et *al.*, 2011 et Sellami et *al.*, 2011), des équipes algériennes (khalfallah et *al.*, 2011) et marocaines (Satrani et *al.*, 2004) mais l'évaluation de son activité antioxydante n'a jamais été élucidée. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de la plante *Ammi visnaga* L. poussant à l'état spontané dans la région de Boumerdes et d'évaluer ainsi, ses activités biologiques.

Notre manuscrit est divisé en trois parties ; nous aborderons dans la première partie une étude bibliographique qui regroupe quatre chapitres dont le premier concerne des généralités sur les plantes médicinales et leurs substances actives: huiles essentielles et composés phénoliques. Le deuxième chapitre détaille les différentes activités biologiques. Le troisième chapitre est consacré à l'étude botanique de la plante *Ammi visnaga* (description détaillée, classifications et propriétés pharmacologiques). Nous expliquons dans le quatrième chapitre quelques méthodes d'évaluations des activités biologiques.

La deuxième partie décrit les protocoles expérimentaux utilisés dans ce travail, elle comporte: les tests phytochimiques des différentes parties de la plante; récoltées durant différentes périodes de croissance, l'extraction des huiles essentielles et des composés phénoliques, la détermination des caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles ainsi que leur analyse par CPG/SM, chromatographie sur couche mince des composés phénoliques des différentes parties analysées, dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins, étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits bruts de cette plante, par deux méthodes, la réduction de fer et le piégeage du radical libre DPPH, ensuite nous entamerons l'étude de l'activité antimicrobienne et antifongique des huiles essentielles et des extraits bruts de cette plante, suivi de l'étude de l'effet insecticide des extraits bruts.

La troisième partie est consacrée aux résultats et discussions. Et enfin, nous terminerons avec une conclusion et quelques perspectives.

Partie I :

*Synthèse*

*bibliographique*

## **I : Généralités sur les plantes médicinales et substances actives**

L'utilisation des plantes pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne (Svoboda *et al.*, 2000). Elles possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques grâce à sa richesse en composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. Les propriétés de ces composés sont maintenant reconnues et répertoriées, et donc mises à profit, dans plusieurs domaines (pharmacie humaine et vétérinaire, cosmétologie et industrie alimentaire) (Bahorun *et al.*, 1996 ; Khothe, 2007).

On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Hopkins, 2003).

**I.1 Métabolites primaires :** Ce sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Macheix *et al.*, 2005).

**I.2 Métabolites secondaires :** Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Leur mode d'action et leur signification physiologique ne sont pas encore suffisamment clairs. Ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante, cependant, ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures (les infections microbiennes et les herbivores) (Hopkins, 2003).

Parmi les principales métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue : les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques et les huiles essentielles (Lutge *et al.*, 2002; Abderrazak et Joël, 2007):

**I.2.1 Alcaloïdes :** Un alcaloïde est un composé organique hétérocyclique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. Représentant un groupe fascinant de produits naturels, les alcaloïdes constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 structures différentes (Bruneton, 1999).

**I.2.2 Terpènes :** Ce sont des hydrocarbures de structure très diverses : acycliques, monocycliques, bicycliques..., portant parfois différentes fonctions. Ils sont formés de l'assemblage de deux ou plusieurs unités d'isoprène ou 2-méthyle-buta-1,3-diène (Abed et Kambouche, 2003).

**I.2.3 Composés phénoliques :** La désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Macheix *et al.*, 2005). Ils sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans leur squelette de base. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside (Boizot et Charpentier, 2006).

Les polyphénols sont considérés comme étant les principaux composés antibactériens des plantes. Ils peuvent affecter la croissance et le métabolisme des microorganismes (Modesto *et al.*, 2004; Viswanath *et al.*, 2009).

Ils participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes.

Malgré leur petite quantité, ces composés participent de manière très efficace à la protection contre des stress variés ainsi que dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Macheix *et al.*, 2005).

Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers etc.) (Lanzmann-Petthory et Odile, 2002).

#### **I.2.3.1 Classification des composés phénoliques**

On peut classer les composés phénoliques en deux catégories : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (Muanda, 2010).

##### **a) Non flavonoïdes**

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines, les tanins et les xanthones (Muanda, 2010).

## **b) Flavonoïdes**

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ces composés ont en commun la structure du diphényl propane ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Mamyrbékova-Békro *et al.*, 2008); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B, forment généralement un hétérocycle oxygéné C (De Rijke *et al.*, 2006). On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes et leur nombre ne cesse d'accroître.

Par ailleurs, De Rijke *et al.* (2006) ont classé les flavonoïdes en 6 familles : les flavonols, les flavones, les flavanes, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols.

### **I.2.3.2 Rôles et intérêts des composés phénoliques**

#### **a) Chez les végétaux**

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...).

Ainsi, ils interviennent dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV) (Macheix *et al.*, 2005).

#### **b) Chez l'homme**

On attribue aux flavonoïdes des propriétés variées: veinotonique, antitumorale, antiradicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et / ou anti-estrogénique (Macheix *et al.*, 2005). Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires.

Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques, protègent nos artères contre l'athérosclérose et réduisent la thrombose (caillots dans les artères). Quelques composés phénoliques et leurs activités biologiques sont récapitulés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Quelques composés phénoliques et leurs activités biologiques.

Polyphénols	Activités biologiques	Auteurs
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, antiulcéreuses, antiparasitaires antifongiques, antioxydantes	(Sannomiya <i>et al.</i> , 2005 ; Gurbuz <i>et al.</i> , 2009)
Coumarines	Protectrices vasculaires, anti-inflammatoires, antiparasitaires, antibactériennes, analgésiques et antioedémateuses	(Soine, 1964 ; Ito <i>et al.</i> , 2005 ; Smyth <i>et al.</i> , 2006)
Flavonoïdes	Antitumorales, antiparasitaires, vasodilatoires, antibactériennes, anticarcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène, antioxydantes, anti- atherogéniques, antithrombotique, anti- allergique	(Wollgast <i>et al.</i> , 2000; Shon <i>et al.</i> , 2004; Tripoli <i>et al.</i> , 2007; Hitara <i>et al.</i> , 2009)
Anthocyanes	Protectrices capillaro- veineux, antioxydant	(Bruneton, 1999)
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, antitumorales, antifongiques et anti-inflammatoires	(Masquelier <i>et al.</i> , 1979)
Tannins galliques et caté- chiques	Antioxydantes	(Okamura <i>et al.</i> , 1993 ; Kubata <i>et al.</i> , 2005)
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
Saponines	Antitumorale, anticancérigène,...	(Nebeling, 2002)

**I.2.4 Huiles essentielles:** Ce sont des produits odorants, volatiles du métabolisme secondaire d'une plante aromatique, normalement formées dans des cellules spécialisées (Sanon *et al.*, 2002).

Elles peuvent être extraites par différentes méthodes (soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques ou bien par des distillations à sec) (AFNOR, 2000), à partir de différentes parties d'un végétal: les feuilles (eucalyptus), les fleurs (camomille), l'écorce (la cannelle), le bois (le cèdre), le zeste (le citron), les graines, les baies, les fruits et les bulbes (Garnéro, 1996 ; Burt, 2004). Elles diffèrent des huiles fixes et des graisses végétales par leur caractère volatil et leur composition chimique (Balz, 1986).

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les plantes. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10 % seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essences aromatiques (Sallé, 2004; Teuscher *et al.*, 2005). Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences en particulier les *Ombellifèreae*, les *Myrtaceae* et les *Lauraceae* (Robert *et al.*, 1993).

#### **I.2.4.1 Caractéristiques et propriétés physico-chimiques des huiles essentielles**

Eu égard à l'importance industrielle des huiles essentielles, leur qualité s'impose depuis le producteur, en passant par l'industriel jusqu'au consommateur. Cette exigence se traduit nécessairement par l'établissement de normes de qualité, élaborées pour des considérations de santé et de sécurité dans différents domaines d'applications des huiles essentielles. Normalement, les normes de qualité sont établies par les instances gouvernementales et servent de référence. Dans le cas des huiles essentielles, ces normes ont été définies par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et " Essential Oil Association" (EOA). Ainsi l'analyse des huiles essentielles porte sur les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique (AFNOR, 1999).

##### **a) Propriétés physiques**

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire. Elles possèdent un indice de réfraction généralement élevé. Leur point d'ébullition varie en générale entre 170°C et 205°C. Elles sont généralement liquides à température ambiante, volatiles et d'odeur très forte. Elles peuvent être incolores, jaunes ou jaunes pale, leur densité est inférieure à celle de l'eau et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants, les huiles et la vaseline. Elles sont très altérables et s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (Bruneton, 2009).

## **b) Propriétés chimiques**

Les huiles essentielles possèdent certaines propriétés communes (Degryse *et al.*, 2008; Bruneton, 2009). Elles possèdent un pourcentage en acide ; cétone ; aldéhyde et alcool. De plus, chaque classe chimique est étroitement liée à une réponse thérapeutique précise et les composés aromatiques ne sont pas immuables pour une même plante.

### **I.2.4.2 Localisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme de cellules sécrétrices qui peuvent se trouver dans toutes les parties de plantes : les fleurs, feuilles, graines, tiges, bois, racines et écorces (Paris et Moysé, 1965).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : dans des cellules isolées aux huiles essentielles caractéristiques de la famille des *Lauraceae* ou de *Zingiberaceae* , des poils secteurs épidermiques sont rencontrés dans les feuilles des *Lamiaceae*, les poches sécrétrices chez les *Myrtaceae* et les canaux sécréteurs, qu'on les trouve chez les *Apiaceae* et les *Rutaceae* (Bruneton, 2009).

### **I.2.4.3 Composition chimique des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont constituées de mélanges complexes de composés organiques. Elles possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses. Ces constituants appartiennent de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes (Lahlou, 2004): le groupe des terpénoïdes (isoprène, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Buronzo, 2008).

La composition et le rendement des huiles essentielles peuvent être influencé par plusieurs facteurs : les facteurs climatiques (la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement), pédologiques (la nature du sol, son aération et sa richesse en micro et macronutriments), analytiques (les procédés d'extraction), génétiques et physiologiques (stade de développement) (Regnault-Roger, 2005; Bishr *et al.*, 2014) .

### **I.2.4.4 Usage des huiles essentielles**

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques, selon leurs propriétés ; elles sont utilisées dans plusieurs domaines:

**a) Phytothérapie et pharmacologie**

Les huiles essentielles sont recommandées en usage antibiotique, antiviral, antiseptique, fongicide, cicatrisant, digestif, anti-inflammatoire et sédatif (Bruneton, 1999). Ces essences issues des plantes sont utilisées en grande partie sous forme de préparations galéniques (Sallé, 1999). De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisantes de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale.

**b) Ecologie**

Les huiles essentielles jouent un rôle dans les interactions végétaux-animaux et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de messages biologiques sélectifs (Richard, 1992). En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et les insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs (Richard, 1992).

**c) Cosmétologie et parfumerie**

Les essences de certaines plantes constituent des bases de parfums (Rose, Jasmine, etc.). Elles rentrent dans la composition de plusieurs produits cosmétiques (shampooings, gels, crèmes, déodorants), ainsi que dans les produits d'entretien (savons, détergents, lessives, assouplissants de textile) et dans tout autre produits comme les désodorisants d'ambiance, les diffuseurs et les bougies (Seu-Saberno et Blakway, 1987).

**d) Agroalimentaire**

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatiques, les huiles essentielles sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym...). Elles sont également employées en liquoristerie (boissons anisées) et en confiserie (bonbons, chocolat) (Teissière, 1977). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures (Bustaf et Foegeding, 1983 ; Conner, 1993).

**I.2.4.5 Toxicité des huiles essentielles**

La toxicité des huiles essentielles varie selon leur composition qui, elle-même varie selon la plante source qui, elle-même, peut varier selon le terrain ou elle est cultivée (Libbey, 2009). En règle générale, les huiles essentielles ne présentent pas un danger pour la santé malgré leur composition en substances chimiques actives (Degryse *et al.*, 2008). En outre, l'ingestion accidentelle ou volontaire d'une quantité importante avec une DL<sub>50</sub> comprise entre 2 et 5

g/kg peut être dangereuse pour la majorité des huiles essentielles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle, etc.) (Bruneton, 1999).

La toxicité peut être dermique et ceci est dû au large usage des huiles essentielles en parfumerie et en cosmétique, par exemple le thym, l'origan et la sarriette sont connues pour leur pouvoir irritant (Maihebiau, 1994). L'angélique et la bergamote sont photosensibilisantes alors que la cannelle est dermocaustique et allergisante pour les peaux sensibles. Les huiles essentielles à thuyones (thuya, absinthe, sauge officinale), menthones et verbénones sont neurotoxiques et ne doivent être administrées ni aux femmes enceintes, ni aux enfants (Roux et Kluwer, 2008).

L'inhalation de 450 mg/m<sup>3</sup> d'essence de térébenthine entraîne une gêne au niveau de la gorge au moment de l'exposition et une augmentation des résistances des voies respiratoires (Libbey, 2009).

#### **I.2.4.6 Procédés d'extraction des huiles essentielles**

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales (Festy et Pacchioni, 2014). Les techniques d'extraction les plus répandues sont les techniques d'extraction par solvants, techniques d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (hydrodistillation, hydrodiffusion, distillation à la vapeur saturée), extraction par expression des épicarpes de citrus (AFNOR, 2000), techniques d'extraction par fluides supercritiques (Reverchon et De Marco, 2006) et l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Ferhat *et al.*, 2006).

#### **I.2.4.7 Méthodes d'analyses de la composition chimique des huiles essentielles**

Les huiles essentielles se présentent en général sous forme d'un mélange complexe de plusieurs dizaines de composés en proportions variables. Leur identification est généralement obtenue par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique : chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec une technique spectroscopique : spectroscopie de masse (SM) et l'utilisation des indices de rétention sur deux colonnes (polaire et apolaire). Cependant, il est nécessaire soit de combiner plusieurs techniques, incluant la RMN, soit de purifier les produits avant de les identifier par comparaison de leurs données spectrales, avec celles des composés de référence (Tomi et Casanova, 2000).

## II Etude des activités biologiques

### II.1 Activité antioxydante

#### II.1.1 Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui présente à faibles concentrations par rapport au substrat oxydable, est capable de retarder ou empêcher l'oxydation de ce substrat (Fontaine *et al.*, 2002).

#### II.1.2 Stress oxydatif et radicaux libres

Au niveau moléculaire, les espèces réactives oxygénées (ROS) sont constamment générés en faible quantité dans tous les organismes aérobie, pendant aux stimulants internes et externes. Le rôle physiologique de ces composés n'est pas totalement connu, mais certaines de ces molécules pourraient être bénéfique même essentielle pour certains processus comme : les processus de signalisation intracellulaire, phénomène de phagocytose bactérien et dans certain mécanismes de défense contre les microorganismes (Neuzil et Stocker, 1993; Pincemail *et al.*, 2001; Gadjeva *et al.*, 2005). ROS ou espèces réactives oxygénées est une appellation qui inclue les radicaux libres de l'oxygène comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical alcoxyle ( $RO^{\cdot}$ ), l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ) et le radical hydroperoxyde  $HOO^{\cdot}$  et les dérivés oxygénés non radicalaire :  $H_2O_2$  et  $ONOO^-$  (Fontaine *et al.*, 2002).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe ce qui leur confère une grande réactivité. En raison de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme (protéines, lipides, ADN et glucides), les dérivés réactifs de l'oxygène ont été impliqués dans un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Valko *et al.*, 2004).

Dans certaines situations, la production des radicaux libres augmente fortement entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule. En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies plurifactorielles telles que le diabète de type 1 et 2, la maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, les rhumatismes, les cancers, les accidents vasculaires cérébraux, vieillissement cellulaire et les maladies coronariennes soit comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Desport et Couratier, 2002; Nève, 2002; Gitenay *et al.*, 2007; Subhash *et al.*, 2007).

### II.1.3 Mécanisme d'action des antioxydants

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques, c'est le cas de dérivés du phénol. En plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire (Berset et Cervelier, 1996).

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention qui bloquent l'initiation de l'oxydation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capable de dévier ou de piéger les radicaux libres. Certains antioxydants agissent en formant des produits finis non radicalaires alors que d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Berset et Cervelier, 1996).

### II.1.4 Système antioxydant

Pour se protéger contre l'effet toxique des radicaux libres, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de réguler la production des ERO. On distingue le système de défense endogène et le système de défense exogène.

#### II.1.4.1 Systèmes de défense endogènes

Face à la production d'espèces actives de l'oxygène, l'organisme dispose de deux systèmes de défense antioxydants: les systèmes enzymatiques (Pincemail *et al.*, 2002; Scandalios, 2005; Said *et al.*, 2008) et non enzymatiques (Nordman *et al.*, 1992 ; Sergent *et al.*, 2002).

##### a) Défenses enzymatiques :

- **Superoxydes dismutases**

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions peroxydes en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène. Ces derniers sont des composés stables et moins toxiques selon la réaction suivante (Comhair et Erzurum, 2002) :



- **Catalases**

La catalase (CAT) présente une activité peroxydase puissante, lui permettant de décomposer très rapidement le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et l'eau selon la réaction suivante (Wanasundara et Shahidi, 1994):



- **Glutathions peroxydases**

Les glutathions peroxydases (GSX) sont capables de réduire les composés hydroperoxydes en leurs composés hydroxydes correspondants, en utilisant du glutathion comme substrat selon la réaction suivante (Claude *et al.*, 2004) :



Avec :

GSH : Glutathions peroxydases

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

ROOH : Hydroperoxyde

GSH : Glutathion réduit.

GSSG: Glutathion sous forme oxydé.

### b) Défenses non enzymatiques

Ce système renferme de nombreuses substances endogènes dont les plus importants sont le glutathion, l'acide urique, vitamine E ( $\alpha$  tocophérol), l'acide ascorbique, l'albumine, la bilirubine, les hormones sexuelles et la mélanine (Goudable et Alain, 1997 ; Favier, 2003).

L' $\alpha$ -tocophérol piège les radicaux peroxydes d'acides gras bloquant ainsi la phase de propagation de la peroxydation lipidique. Il forme ainsi des hydroperoxydes lipidiques qui sont ensuite éliminés par la glutathion peroxydase. Aussi, en plus de piéger des radicaux libres, la vitamine C et le glutathion interviennent dans le processus de régénération de l' $\alpha$ -tocophérol (Miller *et al.*, 1996).

En plus, le glutathion est utilisé comme substrat par la glutathion peroxydase pour l'élimination des lipides peroxydés (Nordman *et al.*, 1992 ; Neuzil et Stocker, 1993).

### II.1.4.2 Systèmes de défense exogènes

Une alimentation saine et équilibrée constituée essentiellement de fruits et de légumes doit théoriquement être suffisante pour apporter à notre organisme les vitamines (C, E), les oligoéléments (Se, Zn) et des non-nutriments (polyphénols), nécessaires pour limiter au maximum l'effet nocif des radicaux libres (Nève, 2002; Gitenay *et al.*, 2007; Leccia, 2008).

### II.1.5 Classification des antioxydants

#### II.1.5.1 Selon leur mode d'action

Les antioxydants peuvent être classés selon leurs mode d'action en deux types ; soit en prévenant la formation des ROS (antioxydants primaires) ou en épurant les ROS (les antioxydants secondaires) (Fontaine *et al.*, 2002).

##### a) Antioxydants primaires

L'action des antioxydants primaire repose sur leur capacité à inactiver les radicaux libres. Ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents (Legrand, 2007).



Avec :

$\text{ROO}^\circ$ : Radical libre,  $\text{AH}$  : antioxydant et  $\text{A}^\circ$  : radical de l'antioxydant

Les radicaux  $\text{A}^\circ$  sont stables et ne possèdent pas l'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides, donc la propagation s'arrête.

##### b) Antioxydants secondaires

Les composés de ce groupe sont considérés comme préventifs. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation.

Ce groupe inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, des inhibiteurs d'enzymes pro-oxydative, des enzymes antioxydantes et des destructeurs des hydro-peroxydes (El Kalamouni, 2010).

### II.1.5.2 Selon leur nature chimique

Les antioxydants peuvent être classés selon leurs natures chimiques en deux types : les antioxydants naturels et les antioxydants synthétiques.

#### a) Antioxydants naturels

Des recherches intensives sur plusieurs plantes ont été entreprises, plusieurs composés actifs ont été isolés et évalués comme étant des antioxydants (Namiki, 1990 ; Larson, 1997; Pietta, 2000). Dans la majorité des cas, le composé actif est un composé phénolique (Cuvelier *et al.*, 1992; Marinova et Yanishlieva, 1992; Chen et Ho, 1997). Autres substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo*, comme le  $\beta$  carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique et la vitamine E (Svoboda et Hampson, 1999).

Les composés actifs des plantes se trouvent sous forme de mélange complexe, qui assure la protection de la plante contre le stress oxydant dû aux effets synergiques ou additifs (Pratt, 1980; Moure *et al.*, 2001). L'utilisation des extraits de plantes ou de fractions enrichies est devenue une façon très attractive pour préserver les aliments. De plus, il a été démontré que plusieurs produits naturels (antioxydants) avaient des propriétés médicinales (anti-cancérogène, anti-inflammatoire) (Madhavi *et al.*, 1996).

#### b) Antioxydants synthétiques

Ce sont des molécules stériquement encombrées, solubles dans les lipides et résistent bien à la chaleur comme : le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène) et le BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole). Ils ont une action synergique et présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement (Pibiri, 2005).

## II.2 Activité antimicrobienne

En raison de leur efficacité et de leur application facile et pratique, les antibiotiques sont largement utilisés pour lutter contre les microorganismes nuisibles (Magan et Olsen, 2004). Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué l'apparition des microorganismes résistants. Pour cette raison, la recherche de nouvelles molécules naturelles à effet antimicrobien est devenue indispensable. Les métabolites secondaires des plantes aromatiques peuvent constituer une alternative (Maihebiau, 1994). De nombreux travaux ont confirmé l'effet antimicrobien des huiles essentielles sur les bactéries Gram+ et Gram- (Cox *et al.*, 2001; Delaquis *et al.*, 2002; Rhayour *et al.*, 2003) ainsi que celui des polyphénols (Bassole *et al.*, 2001; Meddour *et al.*, 2013).

### II.3 Effet insecticide

Les insectes peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et la quantité des produits agricoles. En raison de leurs efficacités et de leurs applications faciles et pratiques, l'utilisation des insecticides chimiques constitue la technique la plus pratiquée pour lutter contre les insectes et les acariens (Pavela, 2009).

Cependant, en plus du coût souvent élevé, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué une contamination de la chaîne alimentaire (présence de résidus dans les produits traités) et de l'environnement, l'apparition d'insectes résistants (Pavela, 2008) et risque d'intoxication pour l'utilisateur (Hoyaux, 2002), ce qui fait que les produits naturels attirent plus d'attention (Pirali-Kheirabadi et Da Silva, 2010).

Au fil de leur évolution, les plantes ont compensé leur immobilité en déployant une multitude de mécanismes de défense afin de pouvoir survivre soit aux conditions climatiques hostiles, soit à leurs prédateurs (Benhamou *et al.*, 2009). Cette course évolutionnaire a abouti à l'élaboration de systèmes de défense directe.

En premier lieu, on trouve les défenses par protection mécanique, avec les différents obstacles structurels qui émaillent la surface des plantes (épines, poils, feuilles durcies par une cuticule épaisse, trichomes, raphides) et les mouvements thigmonastiques (comme le mouvement de repli des feuilles).

Les plantes ont également élaboré une stratégie de défense complémentaire consistant à sécréter des composés chimiques, appelés métabolites secondaires car ils sont non-essentiels à la croissance et à la reproduction (Benhamou *et al.*, 2009). Enfin, d'autres plantes ont élaboré des systèmes de défense indirectes, qui consistent à attirer les ennemis naturels de leurs propres ravageurs par la libération d'un mélange de substances volatiles.

Les huiles essentielles sont classées parmi les meilleurs bio-insecticides testées (Pitasawat *et al.*, 2007). Ces composés agissent comme des fumigants (Choi *et al.*, 2006), des insecticides de contact (Tang *et al.*, 2007), repoussants (Islam *et al.*, 2009) et affectent probablement quelques paramètres biologiques comme la durée de vie et la reproduction (Isikber *et al.*, 2006).

Beaucoup de plantes sont dotées d'huiles essentielles à effets insecticides, à titre d'exemple on cite *Juniperus phoenicea* (Bouzouita *et al.*, 2008), *A. campestre*, *A. cissifolium*, *A. negundo*, *A. platanoides*, *A. pseudoplatanus*, *A. millefolium* et *Ammi visnaga* (Pavela, 2008).

Plusieurs molécules bioactives, non dénuées d'instabilité ou de toxicité pour les mammifères, ont été extraites des extraits de plantes pour lutter contre les insectes nuisibles : la nicotine du tabac, la roténone des *Papilionaceae* ou les pyrèthres du chrysanthème. Après la mise au point des pyrèthrine de synthèse, plus stables, mais qui provoquent de nombreux cas de résistance d'insectes, la recherche de nouvelles molécules insecticides issues des végétaux est devenue une nécessité dont l'azadirachtine extraite d'un arbuste tropical, *Azadirachta indica* ou neem, est le composé le plus remarqué (Arnason *et al.*, 1989). Ce volet innovateur a fait l'objet de nombreuses études mettant en exergue l'action insecticide d'une multitude d'espèces végétales (Ho *et al.*, 1995; Boeke *et al.*, 2004).

### III Méthodes de détermination des activités biologiques

#### III.1 Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise.

Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (De Gaulejac *et al.*, 1999 ; Hua *et al.*, 2008; Tabart *et al.*, 2009).

L'activité antioxydante peut être mesurée par piégeage de différents radicaux, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo da Silva *et al.*, 1991) et le radical ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re *et al.*, 1999).

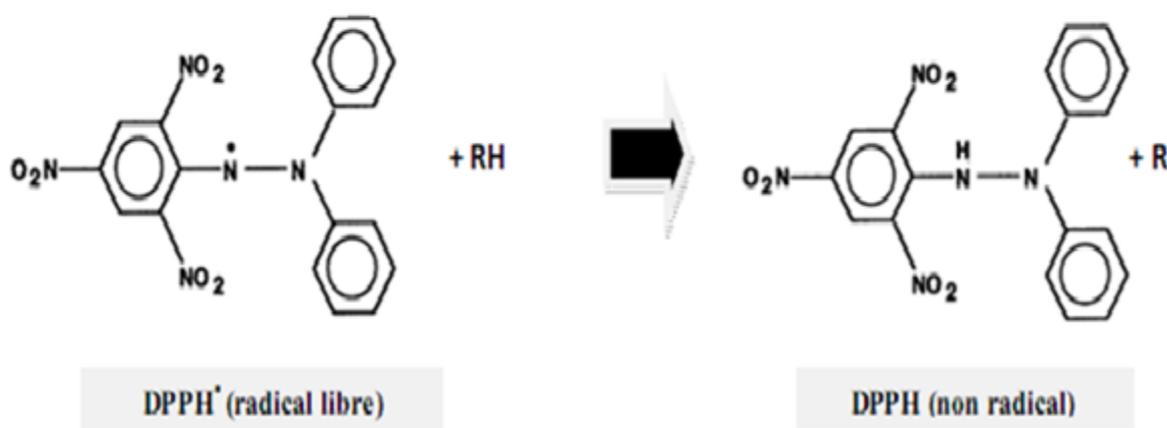
Ainsi, d'autres méthodes utilisent le radical libre DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle) (Sharma Om et Bhat, 2009) et les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie et Strain, 1996).

##### III.1.1 Test de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams *et al.*, 1995).

De point de vue méthodologique, ce test est recommandé pour des composés contenant les groupes SH, NH et OH (Salah *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (Fig.1).

Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH, ce qui conduit au 1,1-diphényl -2-picrylhydrazine (DPPH-H) et au radical R<sup>•</sup>. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue bien caractéristique de la solution de DPPH<sup>•</sup>, due a une recombinaison des radicaux DPPH<sup>•</sup>, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.



**Fig.1** Réaction du DPPH<sup>•</sup> avec un antioxydant (Prakash, 2001; Molyneux, 2004)

RH : Antioxydant ; R<sup>•</sup> : Radical libre

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2-diphényl 1-picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006).

### III.1.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant power)

C'est un test direct et rapide, utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques et des extraits dans un milieu neutre. Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant.

Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) présent dans le complexe K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

### **III.1.3 Test de décoloration du $\beta$ -carotène**

Le blanchiment du  $\beta$ -carotène dans l'acide linoléique est une méthode efficace, simple, reproductible et rapide pour évaluer les propriétés antioxydantes des huiles essentielles. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du  $\beta$ -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. (Mayachiew et Devahastin, 2008; Hussain, 2008).

## **III.2 Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne**

Pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne, plusieurs méthodes sont mises en œuvre. Les différents protocoles peuvent être classés soit selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de la substance active (liquide ou solide) ou selon la nature de contact de la substance active avec le germe (diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant).

### **III.2.1 Contact direct**

Cette technique consiste à mélanger directement la substance active en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide sans oublier que les techniques de dilution exigent une dispersion homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes.

Après incubation, on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique, car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Bendjilali *et al.*, 1986).

### **III.2.2 Dilution sur milieu solide ou liquide**

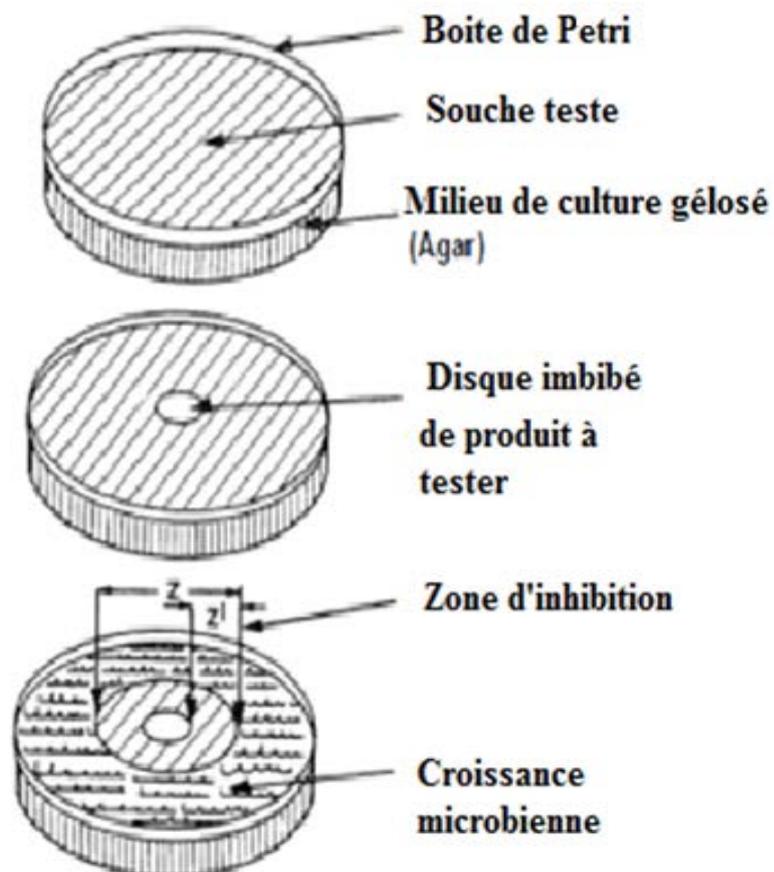
Cette technique qui vise à déterminer le seuil de l'effet microbicide avec des concentrations décroissantes qui permettront dans le cas d'une réaction positive de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour chaque extrait (Belaiche, 1999).

### III.2.3 Diffusion sur milieu gélosé (Aromatogramme)

Appelée aussi «Méthode Pasteur » rapportée par Malan *et al.* (1986); Maruenda *et al.* (1987) et Menghini *et al.* (1987). Il s'agit d'un examen simple et facile à réaliser qui consiste tout simplement à imprégner des pastilles avec les substances à tester. Ces pastilles seront par la suite déposées sur la gélose des boîtes de Petri préalablement ensemencées avec le germe choisi.

Les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones claires autour de certains disques (Fig.2). Celles-ci révèlent les produits auxquels le germe est sensible. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (Valnet *et al.*, 1978).

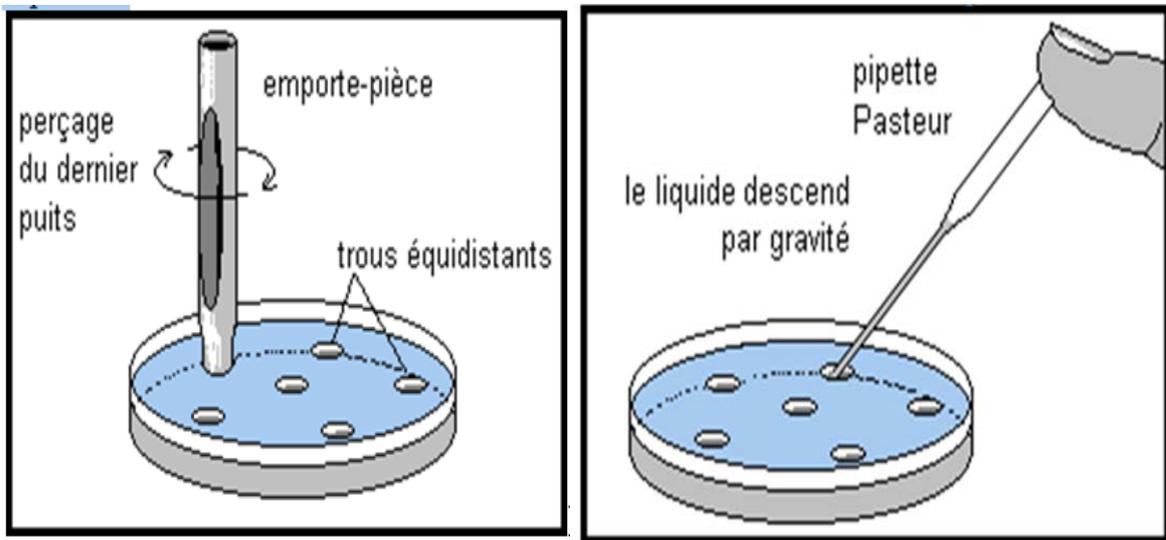
Elle est dite qualitative car elle permet d'identifier l'existence ou non d'une éventuelle propriété bactéricide.



**Fig.2** Illustration de la méthode des aromatogrammes (Zaika, 1988)

### III.2.4 Méthode de diffusion en puit ou en cylindre

C'est une méthode qui assure une diffusion radiale du produit testé à partir d'un puit (cylindre circulaire découpé verticalement dans la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne) (Fig.3) en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable (Dorman et Deans, 2000).



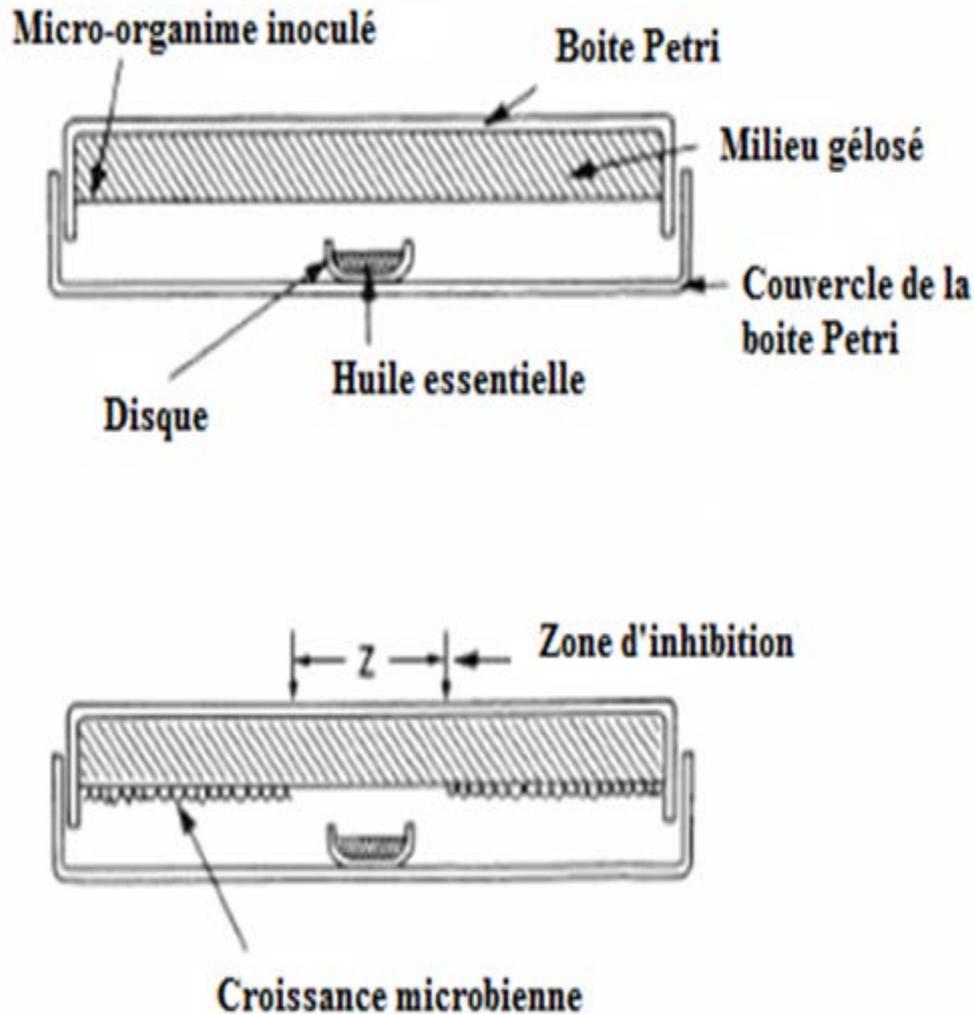
**Fig.3** Illustration de la méthode de diffusion en puit

### III.2.5 Technique de microatmosphère

Le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes, la différence réside principalement dans la position du disque imprégné.

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Petri, renversée pendant la durée de l'expérience (Fig.4). Le disque n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance.

L'intérêt de cette méthode repose sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des composés volatils des huiles essentielles à une température d'incubation donnée (Baser et Buchbauer, 2010).



**Fig.4** Illustration de la méthode de micro-atmosphère (Zaika, 1988)

### III.3 Méthodes d'évaluation de l'activité insecticide

Les insecticides sont une gamme de produits utilisés pour lutter contre les insectes et les acariens (Hoyaux, 2002). Ils agissent indépendamment du système de défense de la plante elle-même et qui sont généralement spécifiques à l'insecte contre lequel ils agissent.

La plupart des insecticides sont des produits de synthèse, ces derniers regroupent les organochlorés (dichloro-diphényl-trichloréthane ou D.D.T), les organophosphorés et les carbamates. Alors que, les insecticides d'origine végétales sont représentés par la nicotine, les pyrétroïdes (dérivés du chrysanthème) et la réténone.

La plupart de ces produits agissent en tant que neurotoxiques et endomagent le système nerveux de l'insecte pour aboutir à sa mort. C'est notamment le cas des organophosphorés ou

des pyréthrinoides. D'autres, comme la pymetrozine, inhibent la faim de l'insecte ce qui causera sa mort. D'autres encore, agissent par asphyxie, interférence dans le métabolisme ou encore comme poison (Vallée et Bilodeau, 1999).

Les insecticides se distinguent selon leur mode d'action en quatre voies d'intoxication: l'ingestion, le contact, l'inhalation et la voie systémique (Renault-Roger, 2014).

***Insecticides d'ingestion*** : Détruisent les insectes broyeurs qui s'alimentent sur les végétaux traités, après pénétration du produit dans leurs tubes digestifs.

***Insecticides de contact*** : Provoquent la mort immédiate des insectes et des acariens touchés par le produit qui traverse leurs cuticules pour atteindre les tissus internes de l'insecte.

***Insecticides agissant par inhalation*** : Appliqués sous forme de gaz ou de vapeurs, pénètrent dans les voies respiratoires de l'insecte et le tuent.

***Insecticides systémiques*** : Après leur pénétration dans la plante traitée, les toxines sont véhiculées par la sève élaborée. De ce fait, les insectes piqueurs, suceurs et broyeurs sont empoisonés.

#### **IV Etude botanique d'*Ammi visnaga***

##### **IV.1 Généralités sur la famille des *Apiaceae***

*Apiaceae* ou *Ombellifereae* est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence en ombelles composées (Kothe, 2007). Elle comprend environ 3000 espèces regroupées en 420 genres qui sont réparties dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord. En Algérie, les *Ombellifereae* sont représentées par 55 genres, 130 espèces et 27 sous espèces. Le genre *Ammi* est représenté par 3 espèces (Quezel et Santa, 1963).

Il s'agit de plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, parfois arbustives. Les feuilles sont alternes, composées, rarement simples. Souvent, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres (Deysson, 1979; Dupont et Guignard, 2007). Leur classification est basée sur des caractères tirés de l'organisation des ombelles et du fruit (Paloma, 2012).

## IV.2 Intérêts de la famille des *Apiaceae*

Certaines plantes de la famille des *Apiaceae* sont utilisées comme des aliments comme les racines de la carotte (*Daucus carota* L.), du panais (*Pastinaca sativa* L.) et du maceron (*Smyrniolum olusatrum* L.) ainsi que les feuilles de persil (*Petroselinum crispum* L.). Le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium* L.) et le cumin (*Cuminum cyminum*) sont utilisés en tant que condiment. Les pétioles d'angélique (*Angelica archangelica* L.) sont utilisés en confiserie (sous forme confite) car sont riches en glucides (Botineau, 2010). En effet, cette famille renferme également des plantes médicinales (El-khella : *Ammi visnaga* et le fenouil : *Foeniculum vulgare*) ainsi que des plantes toxiques (la grande ciguë : *Conium maculatum*) (Bruneton, 2009).

En plus, les *Apiaceae* sont riches en métabolites secondaires (flavonoïdes, coumarines, sesquiterpènes et huiles essentielles) (Paloma, 2012).

## IV.3 *Ammi visnaga* L.

### IV.3.1 Description morphologique

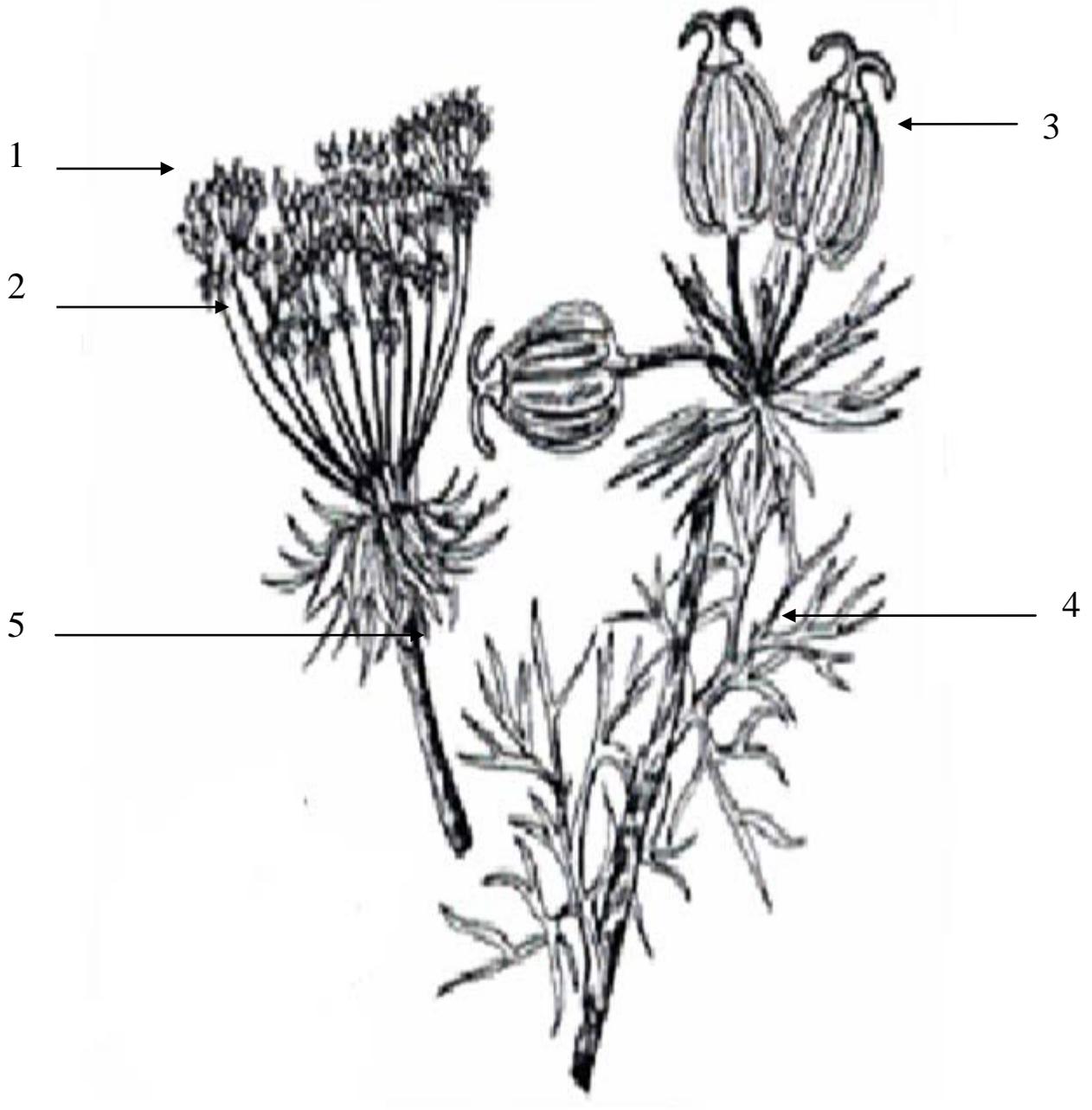
*Ammi visnaga* L. est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle à tige élevée (80 à 120 cm), robuste, verte, ramifiée, à racine pivotante, toute couverte de feuilles petites, bi ou tri-pennatiséquées.

Les fleurs sont petites, nombreuses et blanches, rassemblées en ombelles composées de très nombreux rayons inégaux (plus de 60) dégageant un parfum puissant et produisent un nectar abondant attirant de nombreux insectes.

La floraison est très longue puisqu'elle s'étale de l'été à l'automne. Après la floraison, elles s'insèrent sur un réceptacle dilaté en disque à maturité. Lors de la maturation des fruits, les rayons se resserrent les uns contre les autres (Gattefossé, 1952; Hammouda *et al.*, 2005).

Les fruits (graines) sont de petits diakènes oblongues à ovoïdes. Ils atteignent une largeur de 1,7 mm et une longueur de 2,5 mm au moment de la maturation (Hammouda *et al.*, 2005).

Le-khella est d'une sexualité hermaphrodite, la pollinisation est de type entomogame (Robert et Wilson, 1989) (Fig.5 et Photo 1).



**Fig.5** Schéma représentatif de la plante d'*Ammi visnaga* L. pendant la période de fructification.

- 1 : Graines.
- 2 : Ombelle en début de la période de fructification.
- 3 : Ombelle (sèche) en fin de la période de fructification.
- 4 : Feuilles.
- 5 : Tige.



**Photo 1.** *Ammi visnaga* (L.) Lam. (*Apiaceae*)  
(Ruščić et Nikolić, 2011)

1 : Tige.

2 : Feuilles.

3 : Ombelle durant la période de floraison.

### IV.3.2 Systématique botanique et nomenclature

#### IV.3.2.1 Noms scientifiques

D'après la littérature, *Ammi visnaga* L. porte plusieurs noms botaniques (Tableau 2) (Anonyme, 2007; Le Floc'h *et al.*, 2010; Al-Snafi, 2013).

**Tableau 2** : Synonymes d'*Ammi visnaga* L.

<i>Ammi dilatatum</i> St.-Lag
<i>Sium visnaga</i> Stokes
<i>Daucus visnaga</i> L.
<i>Selinum visnaga</i> E.H.L. Krause
<i>visnaga daucoides</i> Gaertn
<i>Daucus laevis</i> Salisb.
<i>Apium visnaga</i> L.

#### IV.3.2.2 Noms vernaculaires :

*Ammi visnaga* L. est connue sous plusieurs noms vernaculaires (Tableau 3).

**Tableau 3** : Noms vernaculaires d'*Ammi visnaga* L.

	Noms vernaculaires	Auteurs
<b>Arabe</b>	khelal, khillal, killah Baladi , Cazar Sheitani, Kammoun Habashi	Hammouda <i>et al.</i> , 2005
<b>Berbère</b>	Tihirsout, Tabellaout	Hammouda <i>et al.</i> , 2005
<b>Français</b>	Ammi visnage, herbe aux cures dents, fenouil annuel	Hammouda <i>et al.</i> , 2005
<b>Anglais</b>	Toothpick ammi, Bishop's weed	Robert et Wilson, 1989; Hammouda <i>et al.</i> , 2005; Sellami <i>et al.</i> , 2011; Al-Snafi, 2013
<b>Turc</b>	Disotu, Kilir et Hiltan.	Günaydin et Beyazit., 2004
<b>Marocain</b>	Noukha ou Bachnikha	Charafi <i>et al.</i> , 2012
<b>Tunisien</b>	Guabeba	Khadhri <i>et al.</i> , 2011
<b>Algérien (Boumerdes)</b>	Mataina	-

### IV.3.2.3 Classification et systématique

La plante *Ammi visnaga* fait partie de la famille des *Apiaceae* L. Elle provient de l'embranchement des *Spermaphytes* (Tableau 4). Elle est classée dans le sous-embranchement des *Angiospermes* qui se caractérisent par des graines renfermées dans des cavités closes (à l'intérieur du fruit).

**Tableau 4:** Classification et systématique de la plante étudiées (Paloma, 2012) :

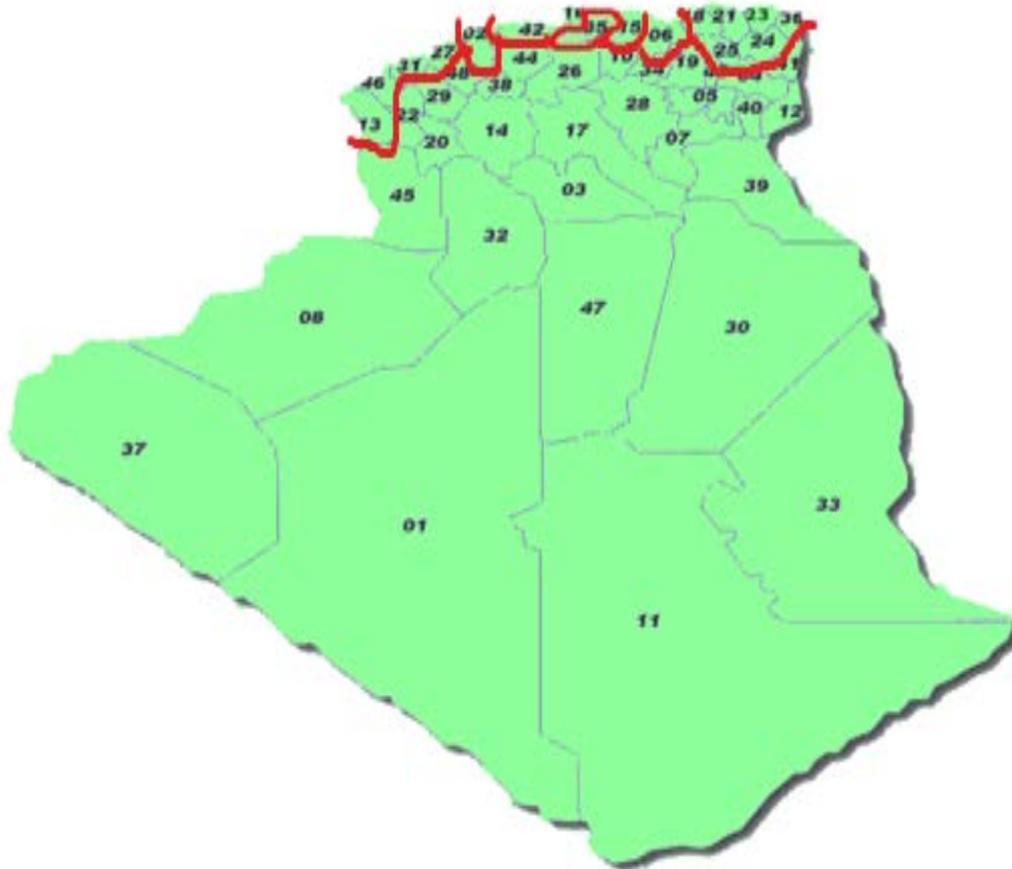
<b>Règne</b>	<i>Plantea</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes (phanérogames)</i>
<b>Sous embranchement</b>	<i>Angiospermes</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida (dicotylédones).</i>
<b>Ordre</b>	<i>Apiale</i>
<b>Famille</b>	<i>Apiaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Ammi</i>
<b>Espèce</b>	<i>Ammi visnaga</i>

### IV.3.3 Origine et répartition géographique

Originaire d'Égypte, le khella pousse spontanément autour du bassin méditerranéen, jusqu'au proche orient, l'Ouest de l'Asie, l'Australie le Sud des Etats-Unis (Chili, Mexique et l'Argentine) ainsi que dans les pays de l'ancienne URSS.

Il est particulièrement cultivé dans la vallée du Nil en Égypte (Iserin *et al.*, 2001; Hammouda *et al.*, 2005). Bien installé dans tout le pourtour méditerranéen, le khella s'est ensuite naturalisé en Europe. Le khella affectionne les champs et les lieux sablonneux rocailleux et secs et s'adapte parfaitement aux sols argileux (Anonyme, 2007; Sellami *et al.*, 2011 ).

En Algérie, *Ammi visnaga* pousse spontanément dans les régions méditerranéennes (Fig.6), couramment trouvé dans les champs, aux bords des oueds et des chemins.



**Fig.6** Répartition géographique d'*Ammi visnaga* en Algérie (en rouge)

#### IV.3.4 Utilisation thérapeutique et médicinale

Il agit particulièrement sur les muscles lisses des bronches, du tractus gastro-intestinal, du système urogénital et coronaires (Anrep *et al.*, 1946; Günaydin et Erim, 2002; Bencheraiet *et al.*, 2011; Al-Snafi, 2013). Cette plante présente aussi des propriétés diurétiques, spasmolytiques, appétante, carminatives (Paloma, 2012) et antilithiastiques (Meiouet *et al.*, 2011).

Le Khella est utilisé pour le traitement des problèmes respiratoires comme : l'asthme, bronchite, toux, toux coqueluche (Anonyme, 2007), pour les problèmes et les douleurs urinaires (calculs et coliques rénaux) et la photochemo-thérapie de vitiligo et de psoriasis (Abdelfattah *et al.*, 1982 ; Abdelfattah *et al.*, 1983, Ashour *et al.*, 2013). Ainsi, il est utile dans la guérison des blessures et des morsures vénéneuses. Il est également recommandé dans le traitement de quelques problèmes cardiovasculaires comme: l'hypertension, l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie, l'arythmie cardiaque (Rose *et al.*, 1992; Satrani *et al.*, 2004).

Au Maroc, les décoctions d'ombelles de Khella sont traditionnellement prescrites pour les soins de bouche (soin de gencives et abcès), les maux de dents, règles douloureuses, le diabète, les douleurs des reins et de la vessie (Zaid *et al.*, 1992; Bnouham *et al.*, 2002; Charafi *et al.*, 2012).

Les ombelles de Khella qui durcissent à maturité, servent ainsi de cure-dents dans certaines régions du monde (Hammouda *et al.*, 2005). Les préparations à partir des graines sont traditionnellement prescrites pour décongestionner la prostate. En fumigation, les fruits et les ombelles servent à dissiper les vertiges et les céphalées. Alors que les feuilles amères et aromatiques sont utilisées pour parfumer les aliments. Le Khella détient une agréable saveur anisée, il est utilisé sans danger en aromathérapie et en industrie pharmaceutiques (Iserin *et al.*, 2001).

### **IV.3.5 Composition chimique d'*Ammi visnaga***

#### **IV.3.5.1 Les fruits**

Les coumarines, les flavonoïdes (flavonols et flavonones) et les glycosides sont les composés majoritaires du khella (Le Floc'h *et al.*, 2010; Bencheraiet *et al.*, 2011). Cette dernière contient en plus des huiles essentielles et des huiles fixes (Anonyme, 2007).

Les coumarines et ses dérivés : Les plus importants sont la Khelline ou visammine (2-méthyle-5,8-dimethoxy furanochromone), visnagine (monomethoxy methyl furanochromone) et visnadine (coumarine) (Fig.7) (Kilicaslan et Coskun, 2012).

Les flavonoïdes: Plusieurs chercheurs ont rapportés la composition d'*Ammi visnaga* en flavonoïdes (Akačić et Kuštrak, 1964; Thukaa *et al.*, 2010; Al-Snafi, 2013).

Deux flavonols ont été isolés à partir d'*Ammi visnaga* en Iraq (la quercétine et le kaempferol) (Abdul-Jalil *et al.*, 2010). Alors que, onze flavonols ont été isolés des parties aériennes d'*A. visnaga*, dont quatre aglycones (un hydroxylé (quercétine) et trois méthoxylés (rhamnetine, isorhamnetine et rhamnazine), quatre monoglycosides (trois 3-O-glucosides liés respectivement a rhamnetine, isorhamnetine et rhamnazine et un 7-O-glucoside de isorhamnetine), deux diglycosides (3-O-rutine de quercétine et 3-O-rutine de isorhamnetine) et un triglycoside (quercétine 7,3,3'-O-triglycoside) (Bencheraiet *et al.*, 2011).

Cependant, présente à l'état pur, la Khelline est incolore, inodore, cristalline et insoluble dans l'eau froide mais soluble dans l'eau bouillante et l'alcool (l'acétone et le chloroforme). Elle

est modérément soluble dans l'éther. L'action de la khelline administrée à des êtres humains et à des animaux expérimentaux est assez longue (prolongée) car elle a un effet cumulative (Anrep *et al.*, 1947 ; Hammouda *et al.*, 2005).

Sa capacité à produire une relaxation des muscles lisses explique son effet antispasmodique dans un certain nombre de maux ainsi que son effet sur les maladies cardiaques (Angina pectoris, thrombose coronaire) (Anrep *et al.*, 1946 ; Hammouda *et al.*, 2005). Ainsi, la khelline peut diminuer le mauvais cholestérol (LDL ou Low Density Lipoprotein) (Hudsin et Tower, 1999). Visnadine et visnagine ont un effet cardiovasculaire et dilatent la périphérie de la vessie (Altinterim, 2012).

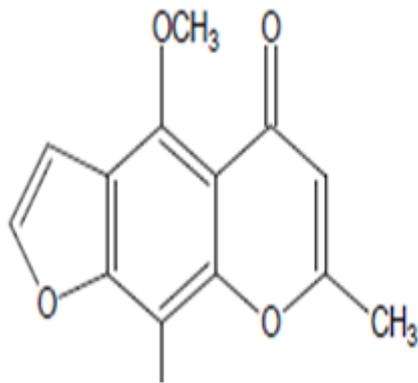
D'après Vanachayangkul (2008), les composés du Khella (Kelline et visnagine) protègent l'endommagement des cellules rénales par les cristaux d'oxalate de calcium (CaOx) et inhibent leur formation.

#### **IV.3.5.2 L'huile essentielle**

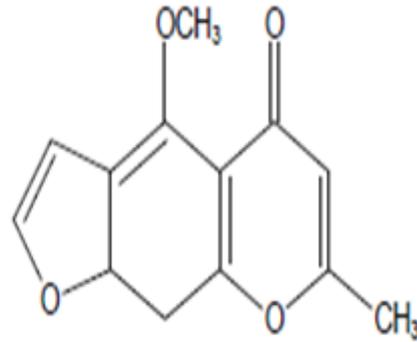
L'huile essentielle du Khella extraite par hydrodistillation est un liquide limpide, fluide et ayant une odeur particulièrement anisée et âcre, un goût amer et une couleur jaune. Sa composition chimique dépend de la partie de la plante et de son stage de développement (Sellami *et al.*, 2011).

Cette huile essentielle est connue par sa richesse en non-terpènes esters, non-terpènes hydrocarbonés, non-terpènes aldéhydes, les monoterpènes oxygénés et les monoterpènes hydrocarbonés. Parmi ses constituants les plus importants, on a le linalool (mono-terpène oxygéné très connu par son activité antimicrobienne et antifongique), le methyl-2-isoamyl butyrate (non-terpène ester),  $\alpha$  pinène,  $\alpha$  terpinène et  $\alpha$  terpinol (Satrani *et al.*, 2004; Anonyme, 2007 ; Khadhri *et al.*, 2011; Al-Snafi, 2013).

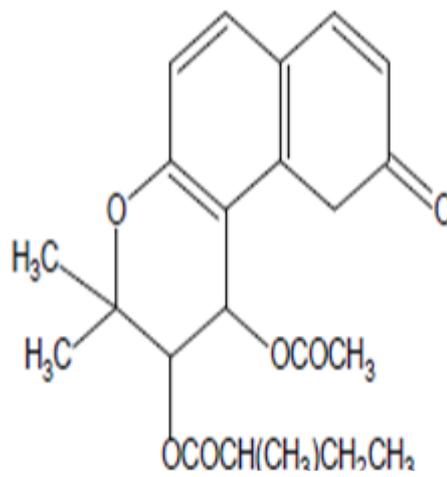
Quant à l'utilisation, l'huile essentielle du Khella possède des propriétés diaphorétiques, carminatives, antispasmodiques, antiseptiques, fongicides, bactéricides, insecticides et antiparasitaires (vermifuge). Elle est aussi un bon tonique respiratoire, dans le cas de l'asthme ou en cas de congestion pulmonaire (Rose *et al.*, 1992; Lamiri *et al.*, 2001; Khalfallah *et al.*, 2011).



Khelline



Visnagine



Visnadine

**Fig.7** Structures chimiques de khelline, visnagine et visnadine (Anrep *et al.*, 1948; Günaydin et Erim, 2002; Vanachayangkul, 2008)

*Partie II :*  
*Partie*  
*expérimentale*

*Matériel et  
méthodes*

## I Matériel

### I.1 Matériel non biologique

Les produits chimiques et les milieux de culture utilisés dans cette étude sont présents dans les annexes.

### I.2 Matériel biologique

#### I.2.1 Matériel animal

Le matériel animal est constitué des pucerons adultes aptères de l'espèce *Toxoptera aurantii*, prélevés des plantes de l'oranger (*Citrus sinensis*) de la variété Thomson sur une parcelle expérimentale d'une station d'expérimentation privée se trouvant dans la wilaya d'Alger.

#### I.2.2 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de différentes parties aériennes de la plante *Ammi visnaga* L. (Tableau 5), collectées de la Wilaya de Boumerdes (Bordj-Menaïel) durant la période allant du mois de mai au mois de juillet de l'année 2012. La récolte a été faite durant trois périodes de croissance : Avant floraison, pleine floraison et pendant la période de fructification. L'identification botanique de la plante a été réalisée au niveau de l'Institut National d'Agronomie "INA" par le professeur Abd Elkrim. La photo 2 montre l'aspect de la plante *Ammi visnaga* L.



**Photo 2.** Parties aériennes d'*Ammi visnaga* L. (échantillon collecté le mois de juin 2012 (Original)).

**Tableau 05:** Périodes de récolte, périodes de croissance et parties récoltées de la plante *Ammi visnaga* L.

Périodes de récolte	Périodes de croissance	Parties récoltées
1 <sup>ère</sup> période : 15 avril 2013	Avant floraison	Feuilles et tiges
2 <sup>ème</sup> période : 24 juin 2013	Pleine floraison	Feuilles, fleurs et tiges
3 <sup>ème</sup> période : 20 juillet 2013	Fructification	Feuilles, graines et tiges

### I.2.2.1 Zone de récolte

Bordj-Menaïel est la commune la plus vaste de la Wilaya de Boumerdes (Fig.8), elle est située à 30 km à l'Est du chef-lieu et à 32 km de Tizi Ouzou, à l'Ouest de la Kabylie, 28 mètres au-dessus du niveau de la mer. Elle s'étend sur une superficie de 97,80 km<sup>2</sup>. Généralement, les terres sont cultivables. Les couches très-multiples dans les plaines sont argileuses; à mesure qu'on s'approche de la mer, la terre devient sablonneuse. D'autres informations géographiques sont résumées dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Données géographiques de Bordj-Menaïel (Boumerdes).

<b>Altitude de la municipalité</b>	33 mètres
<b>Coordonnées géographiques décimales</b>	Latitude: 36.7417 Longitude: 3.72306
<b>Coordonnées géographiques sexagésimales</b>	Latitude: 36° 44' 30" Nord Longitude: 3° 43' 23" Est
<b>Climat</b>	Climat méditerranéen avec été chaud. Classification de Köppen: Csa



**Fig.8** Carte géographique des communes de la Wilaya de Boumerdes (Algérie), illustrant la région de collecte (Bordj-Menaïel).

### I.2.3 Souches microbiennes étudiées

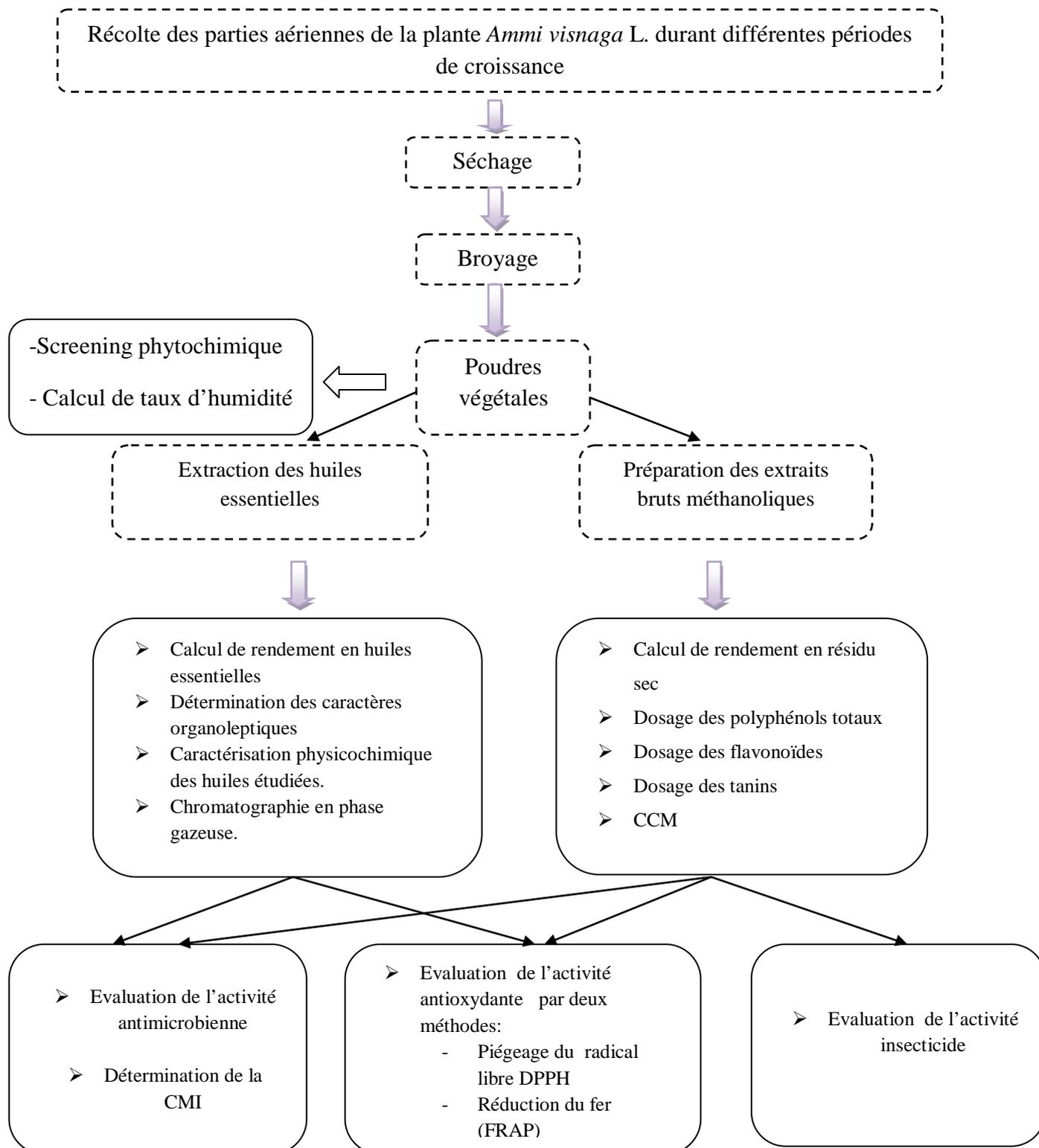
Le support microbien utilisé dans cette étude est composé de bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, des levures et des moisissures (Tableau 7).

**Tableau 7:** Souches microbiennes utilisées.

Souches Microbiennes	Provenance
<p><b>Les bactéries</b></p> <p><i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633  <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300  <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923  <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC33495  <i>Proteus mirabilis</i> ATCC49565  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853  <i>Escherichia coli</i> ATCC25922</p> <p><i>Salmonella sp.</i>  <i>Salmonella H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> sp.</i>  <i>Serratia sp.</i>  <i>Enterobacter sp.</i>  <i>Enterococcus sp.</i></p>	<p>- Institut Pasteur d'Alger</p> <p>- Hôpital de Thenia (Boumerdes)</p>
<p><b>Les moisissures</b></p> <p><i>Aspergillus niger</i>  <i>Fusarium sp.</i>  <i>Geotrichum sp.</i>  <i>Monellia sp.</i>  <i>Phoma sp.</i>  <i>Rhizoctonia solani</i>  <i>Thielaviopsis sp.</i></p>	<p>Institut national de protection des végétaux  El-Harrach (Alger) (INPV)</p>
<p><b>Levures</b></p> <p><i>Candida albicans</i> (prélèvement d'angle)  <i>Candida albicans</i> (prélèvement urinaire)  <i>Candida albicans</i> (prélèvement vaginal)  <i>Candida tropicalis</i> (prélèvement urinaire)</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i>  <i>Saccharomyces bulgari</i></p>	<p>- Hôpital de Thenia (Boumerdes)</p> <p>(INPV)</p>

## II Méthodes

Dans cette étude, nous avons utilisé un protocole constitué de plusieurs étapes englobant des méthodologies décrites ultérieurement, il est résumé dans ce schéma récapitulatif (Fig.9).



**Fig.9** Schéma récapitulatif des différentes étapes du travail.

## II.1 Préparation de l'échantillon végétal

### II.1.1 Récolte

Les différentes parties aériennes de la plante *Ammi visnaga* L. représentant un poids d'environ 20kg ont été récoltées de la région de Bordj-Menaiel à des dates différentes et précises (Tableau 5). Une fois récoltées, les différentes parties de la plante sont par la suite séparées les une des autres avant le séchage.

### II.1.2 Séchage

Les différentes parties aériennes de la plante *Ammi visnaga* L. ont été séchées à l'air libre dans des plateaux en inox à température ambiante et à l'abri de lumière pendant deux semaines.

### II.1.3 Broyage

A fin d'augmenter la surface de contact solvant- échantillon et d'optimiser ainsi l'extraction des substances bioactives, les différentes parties aériennes de la plante *Ammi visnaga* L. ont été broyées dans un broyeur électrique type Waring : Commercial-Blender.

### II.1.4 Conservation

Les différentes poudres obtenues ont été conservées dans des bocaux en verre brun, à température ambiante et à l'abri de lumière et d'humidité.

## II.2 Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble de tests qualitatifs basés sur des réactions de coloration et/ou de précipitation qui permet de mettre en évidence les composés chimiques se trouvant dans un produit végétal ou autres. Ces tests ont été effectués selon la méthodologie décrite par Ronchetti et Russo (1971), Hegnauer (1973), Wagner (2001) et Békro *et al.* (2007).

### II.2.1 Préparation du filtrat (infusé)

5g de la poudre végétale sèche est introduite dans 100 ml d'eau distillée bouillante contenue dans un erlenmeyer de 250 ml. Après 15 min d'infusion; nous avons filtré sur papier et rincé avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100 ml de filtrat (infusé à 5%).

#### II.2.1.1 Tanins

5 ml d'infusé à 5% est ajouté à 1 ml d'une solution aqueuse diluée de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. Le développement d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre indique la présence des tanins

totaux. La différenciation des tanins (catéchiques et galliques) est obtenue par la réaction de Stiasny :

15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40 % plus 5 ml HCl concentré) sont ajoutés à 30 ml d'infusé à 5 %, le mélange est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 mn.

L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter ensuite 1 ml d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1 %. Le développement d'une teinte bleu noire indique la présence des tanins galliques.

#### **II.2.1.2 Flavonoïdes**

A 5 ml d'infusé à 5 %, 3 ml de réactif de Shinoda (réaction à la cyanidine) sont additionnés avec quelques fragments de magnésium. On y ajoute ensuite 1ml d'alcool iso-amylque, l'apparition d'une coloration orange, rouge ou violette, rassemblée dans la couche surnageant d'alcool iso amylique, indique la présence de flavonoïdes.

#### **II.2.1.3 Anthocyanes**

Quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) ou ammoniacque sont ajoutées à 5 ml d'infusé. La formation d'une coloration rouge avec l'HCl et bleu avec l'ammoniacque, indique la présence d'anthocyanes.

#### **II.2.1.4 Alcaloïdes**

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilué au 1/10 à la température ambiante du laboratoire. Après filtration sur un papier lavé à l'eau distillée et de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat, 1 ml du macéré est introduit dans deux tubes à essai puis 5 gouttes de réactif de Mayer (5 g de KI et 1,358 g de  $\text{HgCl}_2$  solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) ont été ajoutés dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner (2 g de KI et 1,27g d' $\text{I}_2$  solubilisé dans 100 ml d'eau distillée) ont été ajoutés dans le deuxième. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes.

#### **II.2.1.5 Coumarines**

Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et placer le dans un bain-marie pendant quelques minutes. Ajouter 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10 %. Mettre deux tâches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des tâches confirme la présence des coumarines.

### II.2.1.6 Quinones

A 1 ml de l'infusé, on ajoute 2 ml d'hydroxyde de sodium 10 M, puis agiter énergiquement. L'apparition rapide ou lente d'une coloration rouge orange indique la présence des quinones.

### II.2.1.7 Amidon

Chauffer 5 ml de l'infusé avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ; puis ajouter le réactif d'amidon (1,2 g I<sub>2</sub> + 50 ml d'eau distillée + 2,5 g KI<sub>2</sub> dilué jusqu'à 50 ml d'eau). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu violacée.

### II.2.1.8 Saponosides

Une petite quantité d'eau est ajoutée à 2 ml d'infusé, puis la solution est fortement agitée. Le mélange est laissé pendant 20 mn et la teneur en saponosides est évaluée dans le tube comme suit (Tableau 8):

**Tableau 8** : Evaluation de la teneur en saponosides

Absence de mousse	Test négatif
Mousse moins de 1 cm	Test faiblement positif
Mousse de 1-2 cm	Test positif
Mousse plus de 2 cm	Test fortement positif

### II.2.1.9 Stérols et polyterpènes

Les différentes poudres végétales sont macérées dans l'éthanol à 5% durant 24h.

**Test 1** : Après évaporation de 10 ml d'extrait éthanolique, le résidu sec obtenu est traité avec 10 ml de chloroforme anhydride. Ensuite, 5 ml de la solution chloroformique est mélangée avec 5 ml d'anhydride acétique. Après l'ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, le mélange est fortement agité puis laisser reposer. L'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert confirme la présence des hétérosides stéroïdiques.

**Test 2** : 5 ml d'extrait est mélangé avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marron de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques.

### II.3 Détermination de la teneur en eau :

Elle est déterminée par la méthode gravimétrique qui consiste à la détermination de la perte de masse par dessiccation dans une étuve réglée à 105°C.

5 g  $\pm$ 0,01g de matière végétale fraîche été séchée dans une étuve à 105 °C pendant 24 heures (jusqu'à un poids constant). La masse de la plante séchée (MVS) a été déterminée à l'aide d'une balance précise à 0,01g et la teneur en eau est donnée par la formule ci-dessous (Bourkhiss *et al.*, 2009):

$$H\% = (MVF - MVS) / MVF \times 100$$

MVF: Poids de la plante fraîche

MVS: Poids de la plante séchée

### II.4 Extraction des huiles essentielles

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles obéissent à des normes comme celle de l'AFNOR NF T 75-006 qui précise que seul l'entraînement à la vapeur, les procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus* et la distillation à sec peuvent produire une huile essentielle. L'extraction des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. a été effectuée par hydrodistillation (Bocchio, 1985).

#### II.4.1 Protocole d'extraction

100 g de matière végétale constituée de la partie aérienne de l'espèce étudiée est introduite dans un ballon de 1 litre rempli d'eau aux 2/3 de son volume, l'ensemble est porté à ébullition pendant trois heures.

Les vapeurs chargées d'huile essentielle, provenant du ballon chauffé à l'aide d'un chauffe ballon se condensent au contact du réfrigérant.

Le condensat est recueilli dans une ampoule à décanter où la phase aqueuse (l'eau) et la phase organique (l'huile essentielle) se séparent par différence de densité. Les traces d'eau sont éliminées avec du sulfate de sodium anhydre.

Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons en verre bruns fermés à une température de 4°C jusqu'à leur analyse. Le dispositif de l'extraction est représenté dans la photo 3.



**Photo 3.** Extraction des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. par hydrodistillation (originale)

#### II.4.2 Détermination des rendements d'extraction des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction (AFNOR, 2000).

$$R_{HE}(\%) = M_{HE} / MVS \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle.

MHE : Quantité d'extrait récupérée exprimée en g.

MVS: Quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

### II.4.3 Détermination des caractères organoleptiques des huiles essentielles

L'appréciation des propriétés organoleptiques des huiles essentielles nécessite l'utilisation de nos sens afin d'évaluer l'odeur, la couleur, l'aspect et le goût.

- **L'odeur** : L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habileté des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air. L'appréciation de l'odeur de nos huiles a été faite par nous.
- **La couleur** : La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Dans notre cas, elle a été appréciée et décrite visuellement.
- **Aspect physique** : De même, l'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent. Elle peut apparaître sous différentes formes : solide, liquide ou solide - liquide.
- **Le goût** : C'est le sens qui permet d'identifier les substances chimiques par l'intermédiaire de chémorécepteurs situés sur la langue. Dans notre cas, le goût a été apprécié par nous même.

### II.4.4 Caractérisation des huiles étudiées

La caractérisation des huiles essentielles s'attache surtout à la détermination de la densité, de l'indice de réfraction, miscibilité à l'éthanol et le pouvoir rotatoire (AFNOR, 2000).

#### a) Densité relative :

La masse volumique « densité », est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un volume égale d'eau distillée à 20°C. Sa détermination a été faite avec un densitomètre à affichage numérique APPAR DMA 45.

#### b) Indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'une substance est le rapport de la vitesse de la lumière, à une longueur d'onde définie dans le vide, à sa vitesse dans la substance. Les indices de réfraction des huiles essentielles sont mesurés avec un réfractomètre CONVEX.

**c) Pouvoir rotatoire :**

Le pouvoir rotatoire est un critère important de la pureté de l'huile essentielle. Il permet d'indiquer si elle possède une activité optique Dextrogyre ou Lévoxyre. Pour ce faire, on remplit la cellule par l'huile essentielle dans l'éthanol à raison de 0.2g dans 100 ml, puis l'angle de rotation est lu directement dans l'appareil. Le pouvoir rotatoire est donné par la formule suivante (AFNOR, 2000):

$$[\alpha]_d^{20} = \alpha / (L \times C)$$

Avec :

$\alpha$ : La valeur lue sur l'appareil en degré d'angle.

L : L'épaisseur du film (cellule) en dm.

C : La concentration de l'essence exprimée en (g/100ml)

**II.4.5 Caractérisation des huiles essentielles par CPG/SM**

Les huiles essentielles restent toujours notoires grâce à leurs diverses propriétés médicinales (anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, stimulantes, toniques, calmantes) qui sont dues à leur composition très complexe.

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC-SM).

C'est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation et l'identification des constituants chimiques des mélanges complexes. Cette technique permet de déterminer simultanément le nombre de constituants de l'essence, leur concentrations respectives et leur ordres de sorties qui renseignent sur la volatilité, c'est-à-dire de leur masses moléculaires et de leur polarités (Arpino *et al.*, 1995; Adams, 2004).

Cette analyse a été effectuée au laboratoire de chimie organique (chromatographie) au centre de recherche et de développement (CRD) de SONATRACH (Boumerdes) selon les conditions opératoires suivantes (Tableau 9):

**Tableau 9** : Conditions opératoires de la CPG/SM

<b>Chromatographie en phase gazeuse</b>	
<b>Type</b>	GC6890N (HP Agilent Technologies)
<b>Colonne</b>	HP-5 (5 % phényle et 95 % méthyle polysiloxane)
<b>Programme de la température</b>	35°C en isotherme pendant 5mnt puis augmentation de la température à raison de 6°C/mn jusqu'à 250°C
<b>Mode d'injection</b>	Split à température 250°C
<b>Température de détection</b>	280°C (interface)
<b>Gaz vecteur</b>	Hélium
<b>Débit du gaz vecteur</b>	1ml/mn
<b>Volume injecté</b>	0.2µl
<b>Spectrométrie de masse</b>	
<b>Appareil</b>	MS-5973N (HP Agilent Technologies)
<b>Mode de détection</b>	Scan
<b>Potentiel d'ionisation</b>	70EV
<b>Température de MS source</b>	230°C

L'identification des composés est effectuée par comparaison des temps de rétention sur colonne et les spectres de masse avec ceux existants dans la littérature (Adams, 2004).

### **II.5 Préparation des extraits bruts méthanoliques**

La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leur degré de polymérisation, de l'interaction avec les autres constituants et de type de solvant utilisé. Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle.

Cependant, pour les composés très polaires tels que les acides phénoliques (acide benzoïques et acide cinnamiques) ne pouvant être extraits complètement avec les solvants organiques purs, des mélanges d'alcool - eau ou acétone - eau, sont recommandés. Les solvants moins

polaires (dichlorométhane (DCM), chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle...) (Muanda, 2010). Dans notre cas, la procédure suivie est celle décrite par Benhamou *et al.* (2009).

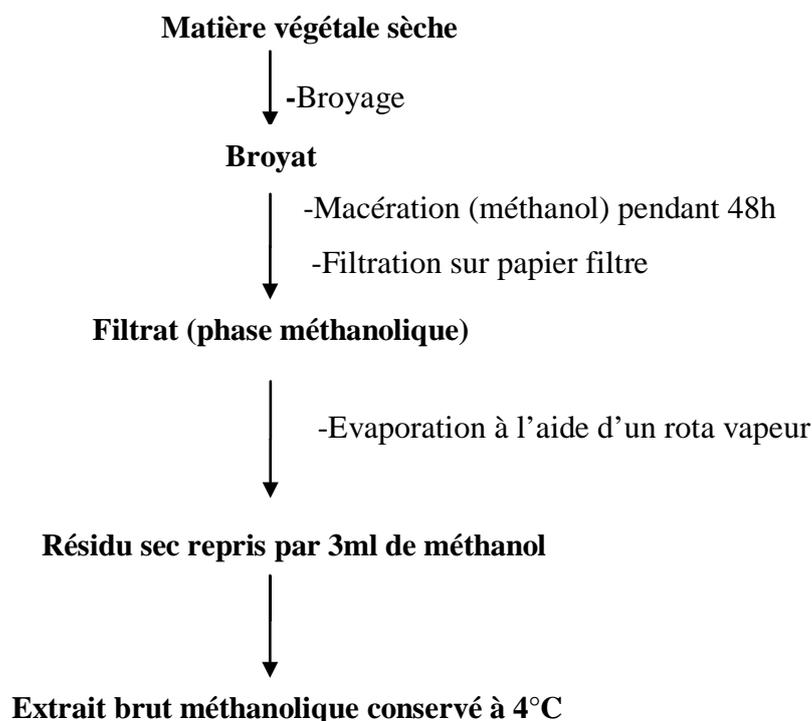
Le principe de cette méthode repose sur l'extraction solide - liquide qui est une opération de séparation qui consiste à extraire un constituant solide d'une matrice qui en comporte plusieurs, en le transférant sélectivement vers une phase liquide.

### Mode opératoire

1g de la poudre végétale pulvérisée représentant chaque partie de la plante (feuille, fleur, tige et graine) des différentes périodes de croissances sont additionnées à 20 ml de méthanol puis laissé macérer pendant 48h.

Après filtration, les solutions sont évaporées sous vide par un rota vapeur jusqu'à l'élimination totale de l'alcool. L'extrait résultant est repris par 3ml de méthanol (Benhamou *et al.*, 2009).

Le schéma de la figure 10 récapitule les différentes étapes d'extractions déjà mentionnées.



**Fig.10** Étapes d'obtention des extraits bruts méthanoliques

### II.5.1 Rendement en extraits méthanoliques

Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant (Ouahas et Devalez, 1988) :

$$\text{Rendement (\%)} = (P_0 - P_1 / P_2) \times 100$$

$P_0$  : Poids du ballon après évaporation (g).

$P_1$  : Poids du ballon avant évaporation (g).

$P_2$  : Poids de la matière végétale initiale (g)

### II.6 Dosage des composés phénoliques

#### II.6.1 Polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par Singleton et Ross, 1965.

Celle-ci repose sur l'oxydation des hydroxyles libres des composés phénoliques par le mélange d'acide phosphomolybdique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphotungstique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui constitue le réactif de Folin – Ciocalteu (de couleur jaune), la réduction de ces acides donne naissance à des oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) colorés en bleu, cette coloration dont l'absorbance mesurée à 760 nm est proportionnelle au taux de composés phénoliques (Riberau-Gayon, 1968).

#### Mode opératoire

200 µl de chaque extrait sont introduits dans un tube à essais, le mélange (1 ml de Folin – Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et laissés durant 30 min à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage à différente concentration d'acide gallique a été préparée. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) de matière végétale sèche (mg GAE/g) (Singleton et Ross, 1965).

#### II.6.2 Flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen *et al.* (1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm (Zhishen *et al.*, 1999).

**Mode opératoire :**

500 µl d'extrait brut méthanolique est mélangé avec 1500 µl d'eau distillée, suivi de 150 µl de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5 %. Après 5 mn, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10 % (m/v) est rajouté au mélange. Après 6 mn de repos à température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu.

L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de plante étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g) (Zhishen *et al.*, 1999).

**II.6.3 Tanins**

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide (Price *et al.*, 1978). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm (Yrjonent, 2004).

**Mode opératoire**

50µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 % m/v), le mélange est ensuite mélangé avec un vortex. Après, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCL) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 mn ; et l'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats de la plante étudiée sont exprimés en milligramme équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g).

**II.7 Analyse qualitative des extraits méthanoliques par chromatographie sur couche mince**

L'analyse qualitative a été faite par chromatographie sur couche mince (CCM) qui est une méthode efficace et rapide, associant la sensibilité à la simplicité pour identifier les substances, en fonction de leur façon de migration dans des conditions données.

La chromatographie sur couche mince est une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée immobilisée sur un support planaire.

Elle permet la séparation d'un mélange et leurs constituants; en se basant sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile (Yrjonent, 2004).

### Mode opératoire

10 µl de chaque extrait ont été déposés à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque. Après séchage des spots, la plaque a été émergée dans la cuve en verre saturée au préalable avec l'éluant approprié (Yrjonent, 2004).

Dans le but de choisir les meilleurs systèmes solvants permettant une bonne séparation des substances naturelles étudiées, nous avons réalisé plusieurs minis CCM, en utilisant plusieurs systèmes de migration (Tableau 10).

**Tableau 10** : Systèmes de migration des polyphénols testés :

<b>Premier système</b>	Chloroforme - acétate d'éthyle -acétone (50:40:10)
<b>Deuxième système</b>	Chloroforme - méthanol (90:10)
<b>Troisième système</b>	Butanol - acide acétique - eau distillée (40 :10 :50)
<b>Quatrième système</b>	Chloroforme - acétone (90:10)

Après développement et séchage, la plaque a été observée sous UV à 254 nm et à 366 nm, les fluorescences des taches et leur rapport frontal (Rf.) ont été enregistrés avant et après révélation par les réactifs appropriés permettant la mise en évidence des composés séparés.

Il est à noter que six standards (vanilline, l'acide ascorbique, quercétine, catéchine, et l'acide gallique) ont été recherchés dans les extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L.

## II.8 Activité antioxydante

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits méthanoliques et des huiles essentielles a été réalisée par deux techniques différentes :

### II.8.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés antiradicaux, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Le virage de la couleur ainsi que son intensité de la forme libre de DPPH en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance radicalaire. Les absorbances mesurées servent à calculer les pourcentages d'inhibition du radical DPPH, qui sont proportionnels au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Parejo *et al.*, 2002).

#### Mode opératoire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque solution test exprimées en (10, 8, 6, 4, 2, 1 mg/ml) est ajouté à 1.950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.0025 g/l) fraîchement préparée. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1.950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

L'absorbance est mesurée à 517 nm après incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire est calculé selon l'équation suivante (Athamena *et al.*, 2010) :

$$I (\%) = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle.

**A<sub>t</sub>** : Absorbance du test effectué.

### II.8.2 Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Cette méthode a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Oyaizu, 1986).

## **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques et des huiles essentielles est déterminé selon la méthode préconisée par Oyaizu (1986). 1 ml des différentes concentrations de chaque solution test (10, 8, 6, 4, 2, 1 mg/ml) est mélangé avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [ $K_3Fe(CN)_6$ ] à 1 %. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2.5 ml de l'acide trichloracétique à 10 % sont additionnés. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec (2.5 ml de l'eau distillée plus 0.5 ml de  $FeCl_3$  à 0.1%). A la fin, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

## **II.9 Méthodes microbiologiques**

### **II.9.1 Revivification des souches**

#### **II.9.1.1 Pré culture des souches bactériennes**

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries sur des boites de Petri contenant la gélose nutritive, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune.

#### **II.9.1.2 Pré culture des levures et moisissures**

Sur des boites de Petri contenant le milieu PDA (annexe 2), un disque de champignon d'une culture pure a été déposé au centre de chaque boite, puis incubée à 28°C durant 4 jours.

Pour les levures, le repiquage a été fait par des stries sur milieu Sabouraud. L'incubation a duré 48 heures à 28°C.

### **II.9.2 Préparation de l'inoculum microbien**

L'inoculum a été préparé à partir de la préculture. À l'aide d'une anse de platine, quelques colonies ont été prélevées puis introduites dans des tubes à essai contenant l'eau physiologique stérile.

L'inoculum bactérien est préparé après une bonne homogénéisation de la suspension bactérienne, une lecture de sa densité optique a été effectuée à 625 nm. L'opacité de la solution doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une densité optique (DO) comprise entre 0.08 et 0.1 (correspond à  $10^8$  bactéries /ml) (Kiehlbauch *et al.*, 2000; NCCLS, 2006<sup>a</sup>). L'inoculum des levures a été à partir d'une suspension de  $10^5$  CFU/ml (Erkmen et Ozcan, 2004).

### II.9.3 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de la plante *Ammi visnaga* L. a été évaluée par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé, selon NCCLS (2006). Le milieu de culture Mueller Hinton (annexe 2) a été coulé dans des boîtes de Petri qui, après solidification, elles ont étéensemencées par les souches microbiennes à tester, en utilisant une tige de coton stérile. Des disques de papier Wattman N°4, de 9 mm de diamètre sont imprégnés de 10 µl d'extrait méthanolique ou d'huile essentielle, à une concentration de 1 mg/ml, et un disque contenant 10 µl de DMSO servant de témoin négatif, ont été séchés puis déposés sur les gélosesensemencées. Les boîtes ont été ensuite placées au frais (4°C) pendant 2 heures avant d'être incubées à 37°C durant 24 h (NCCLS, 2006).

Pour les levures, le même protocole a été utilisé, mais en faisant un ensemencement sur milieu PDA. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 h (Erkmen et Ozcan, 2004).

D'après Duraffourd *et al.* (1990); la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm, la sensibilité est limitée pour un diamètre entre 8 et 14 mm, elle est moyenne pour un diamètre compris entre 14 et 20 mm et pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible.

### II.9.4 Antibiogramme des souches bactériennes

Ce test a été réalisé dans le but de comparer l'effet de nos composés naturels (polyphénols et huiles essentielles) sur des souches sensibles à celui des composés synthétiques et commerciales. Pour cela plusieurs antibiotiques ont été testés, la méthode utilisée a été celle de diffusion des disques sur milieu gélosé. Le choix des antibiotiques a été fait selon leur disponibilité et en fonction des souches qui ont présenté une sensibilité à l'égard des extraits méthanoliques et des huiles essentielles issues de notre plante. Les antibiotiques testés sont récapitulés dans le tableau 11 (Joffin et Leyral, 2006):

**Tableau 11** : Noms, classes et doses d'antibiotiques testés

Classes d'antibiotiques	Doses utilisées	Noms d'antibiotiques
<i>Beta lactamine</i>	6 µg	Pénicilline G
<i>Sulfamides</i>	5µg	Triméthoprim
	20 µg	Sulphonamide
<i>Tétracycline</i>	30 µg	Doxycycline
	30 µg	Tétracycline

## II.9.5 Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits bruts et des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de contact direct sur le milieu gélosé décrit par Chang *et al.* (1999) et (2000).

### II.9.5.1 Activité antifongique des huiles essentielles

Cette technique consiste à mélanger différents volumes d'huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. (30, 50, 70  $\mu$ l), avec 20 ml du milieu PDA en surfusion plus Tween 80, dans un tube à essai stérile.

Après agitation, le contenu a été versé dans une boîte de Petri. Une boîte contenant le milieu PDA et Tween 80 a été utilisée comme témoin négatif.

Un disque de champignon a été implanté au centre de chaque boîte (traitées et témoin), ces dernières sont ensuite incubées à 28° C pendant 4 jours.

### II.9.5.2 Activité antifongique des extraits méthanoliques

Différents volumes d'extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L. (300, 500, 700)  $\mu$ l, à une concentration de 1 mg/ml, sont mélangés avec 19 ml du milieu PDA en surfusion (Tween 80 préalablement ajouté), dans un tube à essai stérile. Après agitation, le contenu a été versé dans une boîte de Petri.

Une boîte contenant le milieu PDA et 1 ml de DMSO a été utilisé comme témoin négatif. Un disque de champignon a été implanté au centre de chaque boîte (traitées et témoin), ces dernières sont ensuite incubées à 28 °C pendant 4 jours.

Le suivi de la croissance fongique a été effectué tous les jours jusqu'à la fin de la durée appropriée d'incubation où l'on procède à la mesure des diamètres de mycélium pour dégager le pourcentage d'inhibition ou taux d'inhibition, calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition du mycélium} = ((MI_c - MI_t) / MI_c) \times 100$$

Avec :

MI<sub>c</sub> : Diamètre de mycélium des colonies dans la boîte témoin (control)

MI<sub>t</sub> : Diamètre de mycélium des colonies dans les boîtes contenant les principes actifs (champignons traités).

L'extrait est qualifié de :

Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100 %, la souche fongique est dite très sensible.

Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75 %, la souche fongique est dite sensible.

Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50 %, la souche est dite limitée.

Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25 %, la souche est dite peu sensible ou résistante.

A l'issue de ces données, tout extrait ayant présenté un pourcentage d'inhibition supérieur à 50 % sur une souche fongique est sélectionné pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Alcamo, 1984).

### **II.9.6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI**

La détermination de la concentration minimale inhibitrice a été faite par la méthode de dilution en milieu gélosé solide (Erkmen et Ozcan, 2004; NCCLS, 2006<sup>b</sup>).

Cette technique consiste à réaliser des dilutions du produit à analyser (extrait ou huiles essentielles) dans un milieu de culture gélosé préalablement fondu et maintenu en surfusion à 45°C.

L'ensemencement est réalisé par inondation à partir d'une suspension de microorganismes préparée de façon à ce qu'il soit le plus homogène possible. Une gamme de dilutions décroissantes a été préparée allant de 2 % jusqu'à 0.02 % pour les huiles essentielles et les composés phénoliques.

Une boîte témoin contenant la gélose Mueller Hinton plus DMSO est ensemencée de la même manière. La lecture des résultats se fait à l'œil nu par observation de la croissance ou de l'inhibition de la croissance du microorganisme dans la boîte teste par rapport à sa croissance sur une boîte témoin.

La CMI est donnée par la première concentration qui inhibe toute culture apparente de microorganisme sur la gélose.

## II.10 Détermination de l'activité insecticide des extraits méthanoliques

L'activité insecticide a été déterminée au niveau du laboratoire de Parasitologie de département de Biologie (Faculté des Science M'hamed Bougara).

Huit extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L. ont été testés sur le puceron des agrumes : *Toxoptera aurantii*.

### II.10.1 Matériel biologique

#### II.10.1.1 Matériel animal

Les pucerons adultes de l'espèce *Toxoptera aurantii* sont prélevés des plantes de l'oranger (*Citrus sinensis*) de la variété Thomson sur une parcelle expérimentale d'une station d'expérimentation privée. L'infestation des plantes de l'oranger par les pucerons a été naturelle. Une fois prélevés, les pucerons sont ramenés au laboratoire et laissés pendant 5 à 10 minutes avant la réalisation des bio-essais.

#### II.10.1.2 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des différentes parties aériennes de la plante *Ammi visnaga* collectées durant trois périodes de croissance : avant floraison, pleine floraison et période de fructification.

- **Préparation des extraits méthanolique**

1g de poudre végétale pulvérisée représentant chaque partie de la plante durant différentes périodes de croissances (feuille, fleur, tige et graine) est additionnée à 20 ml de méthanol puis laissé macérer pendant 48 h. Après filtration, les solutions sont évaporées sous vide par un rotavapeur jusqu'à l'élimination totale de l'alcool. L'extrait résultant est repris par 3 ml de méthanol (Benhamou *et al.*, 2009) (voir figure 13).

### II.10.2 Dispositif expérimental

Les tests sont réalisés *in vitro* dans les conditions de laboratoire suivant un dispositif complètement aléatoire. Huit extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L., représentant les différentes parties aériennes collectées durant différentes périodes de croissance, ont été utilisés. Cinq concentrations ont été préparées pour chaque type d'extraits : 250, 500, 3000, 5000, 10000, 30000 ng/pucerons.

Un microlitre de chaque extrait est déposé sur le thorax du puceron à l'aide d'une micro-seringue en verre de type Hamilton avec une précision et reproductibilité de  $\pm 0,05$  %.

Les pucerons témoins reçoivent 1µl de solvant pur (méthanol). L'unité expérimentale est constituée d'une boîte de Petri contenant vingt pucerons adultes aptères libérés sur une feuille de l'oranger. Chaque traitement a été répété trois fois.

### II.10.3 Essais biologiques

Les bio-essais au laboratoire ont été effectués selon la méthode IRAC (Insecticide Resistance Action Comite) N° 1 Version 2 (IRAC, 2009).

Les feuilles infestées de pucerons sont collectées de la parcelle expérimentale et acheminées au laboratoire peu avant les tests. Seuls les adultes aptères ont été utilisés pour ces tests. Les feuilles saines de l'oranger collectées de la même parcelle, soigneusement nettoyées avec une brosse fine et trempées pendant 5 secondes dans l'eau distillée ont servi de support des pucerons. Les feuilles rincées ont été séchées à l'air libre afin de faire évaporer l'eau de leurs surfaces et ensuite vingt pucerons adultes sont transférés sur chaque feuille à l'aide d'un pinceau fin. Chaque feuille portant 20 pucerons est placée dans une boîte de Petri. Du coton hydrophile mouillé est placé à la base des pétioles pour maintenir les feuilles fraîches pendant la durée du test (Photo 4). Les boîtes de Petri avec leurs contenus sont placées dans les conditions de laboratoire (température ambiante: 28°C; humidité relative 80%) pour les différentes observations.



**Photo 4.** Evaluation de l'efficacité des extraits méthanoliques *Ammi visnaga* L. contre le puceron *Toxoptera aurantii*.

#### II.10.4 Détermination des taux de mortalité

Afin de suivre l'évolution chronologique de la mortalité des pucerons soumis aux différents produits à différentes concentrations, les observations sont réalisées successivement 1 heure, 3 heures, 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures, après la mise en contact des pucerons avec les différentes doses utilisées. Une loupe binoculaire a été utilisée pour dénombrer les pucerons morts.

Les mortalités sont exprimées en pourcentage par rapport à la population initiale après les avoir corrigées préalablement selon la formule d'Abbott (1925) :

$$M = \left( \frac{P - T}{S} \right) \times 100$$

*M* : Mortalité corrigée exprimée en pourcentage de la population initiale.

*P* : Mortalité induite sous l'action de la substance active.

*T* : Mortalité des témoins.

*S* : Nombre de survivants pour les témoins.

#### II.10.5 Analyses des données

Les valeurs de l'activité insecticide ont été évaluées avec une ANOVA entre les groupes en utilisant le logiciel SPSS (2007) afin de déterminer d'éventuelle différences significatives à  $P < 0,05$ .

#### II.11 Analyses statistiques

Les expériences ont été faites en triples. Les résultats ont été signalés comme moyenne  $\pm$  écart type.

Les différentes activités : antioxydante, antimicrobienne et insecticide ont été évaluées avec une ANOVA à 1 facteur en utilisant le logiciel SPSS (2007) afin de déterminer d'éventuelle différences significatives à  $P < 0,05$ .

*Résultats  
et discussions*

Dans cette partie de travail, nous avons exposé les résultats du screening phytochimique, la caractérisation qualitative et quantitative des huiles essentielles et des composés phénoliques durant les différentes périodes de croissance (avant floraison, pleine floraison et période de fructification), les résultats de l'activité antioxydante, antimicrobienne, antifongique et insecticide seront exposés par la suite.

### 1 Screening phytochimique

La mise en évidence des différentes classes de métabolites secondaires inclus dans une plante, permet d'avoir une idée sur les activités biologiques de cette dernière. Les tests du screening phytochimique ont été réalisés sur les infusés et les poudres végétales. Les détails des tests sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 12 :** Résultats de screening phytochimique des différentes parties de la plante *Ammi visnaga* L.

Composés chimiques	Différentes parties de la plante				Révélation et coloration
	Feuille	Fleur	Tige	Graine	
Amidon	–	Trace	Trace	++	Coloration bleu violacée
Saponosides	++	++	++	++	Mousse de 1-2 cm
Flavonoïdes	++	+++	+++	+++	Coloration Rose – rouge.
Coumarines	++	+++	+++	+++	Fluorescence intense sous la lampe UV (360 nm)
Tanins	++	+++	+++	+++	Coloration vert foncée.
Tanins catéchiques	++	+++	+++	+++	Coloration bleu vert.
Alcaloïdes	+++	++	+	++	Formation d'un précipité ou une turbidité.
Anthocyanes	+	++	++	+	Coloration rouge
Quinones	+	++	++	+++	L'apparition d'une coloration rouge orange
Les stérols	+++	++	++	++	Coloration violacée fugace virant au vert
Les polyterpènes	++	++	++	++	Coloration rouge-marron

(+++): Réaction positive, (++) : Réaction moyennement positive, (+) : Réaction faible, (-) : Réaction négative.

Ces tests phytochimiques ont fait ressortir la richesse de notre plante en flavonoïdes, coumarines, tanins totaux et tanins catéchiques. Cependant, une présence relativement moyenne de saponosides, quinones, alcaloïdes et anthocyanes.

Toutes fois, il est à noter aussi que la chimie de la plante est peu étudiée. Cependant, cette plante reste connue par sa richesse en coumarines, furanochromones qui constituent ses principes actifs essentiels (khelline et visnagine) et pyranochromones (visnadine, samidine), flavonoïdes (quercétine, isorhamnetine et Kaempferol), saponines, quinones, huiles essentielles et l'huile fixe (Martelli *et al.*, 1984 ; Eldomiaty, 1992; Anonyme, 2007; Ashour *et al.*, 2013; Bishr *et al.*, 2014). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans notre étude.

Qualitativement, la comparaison des résultats des tests phytochimiques des quatre organes de la plante *Ammi visnaga* L. a révélé des similitudes en teneur pour les tanins catéchiques, saponosides et polyterpènes.

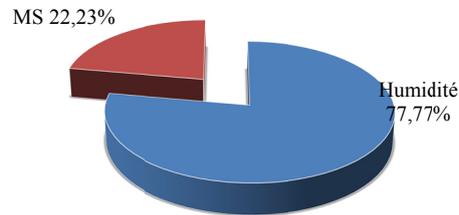
D'après Talaat *et al.* (2013) et Sellami *et al.* (2013), la quantité et la présence des métabolites secondaires dépendent de la partie de la plante analysée, des conditions de croissance et de l'ajout de fertilisants et de quelques composés naturels comme les composés phénoliques et les acides aminés.

## 2 Le taux d'humidité

Selon la figure 11, l'analyse des échantillons a révélé un taux d'humidité important. *Ammi visnaga* est très riche en eau avec un taux d'humidité égal à 77,77 % durant la période d'avant floraison, 70 % durant la floraison et 42.6 % durant la période de fructification.

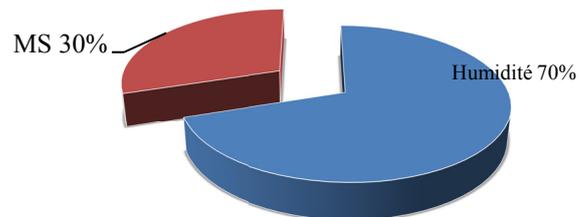
Au regard des résultats obtenus, il ressort que durant la période d'avant floraison, il ya accumulation des réserves en eau, cette teneur diminue avec la croissance jusqu' elle atteigne sa teneur minimale durant la période de fructification. D'ailleurs, les végétaux à l'état frais sont généralement riches en eau (représenté par la moitié du poids de la plante et parfois plus) (Dufresne, 2008). Cependant, un taux élevé en eau n'est pas toujours recherché, en effet le rendement en huile essentielle est inversement proportionnel au taux d'humidité. Du fait, la teneur en huiles essentielles augmente significativement avec le mode et la durée de séchage de la matière végétale (Bourkhiss *et al.*, 2009).

### Avant floraison



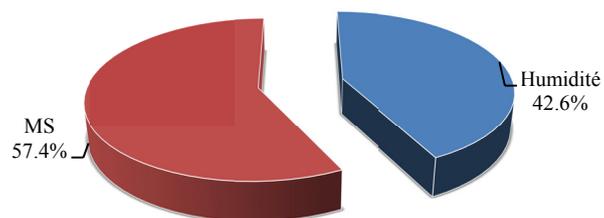
A

### Pleine floraison



B

### Fructification



C

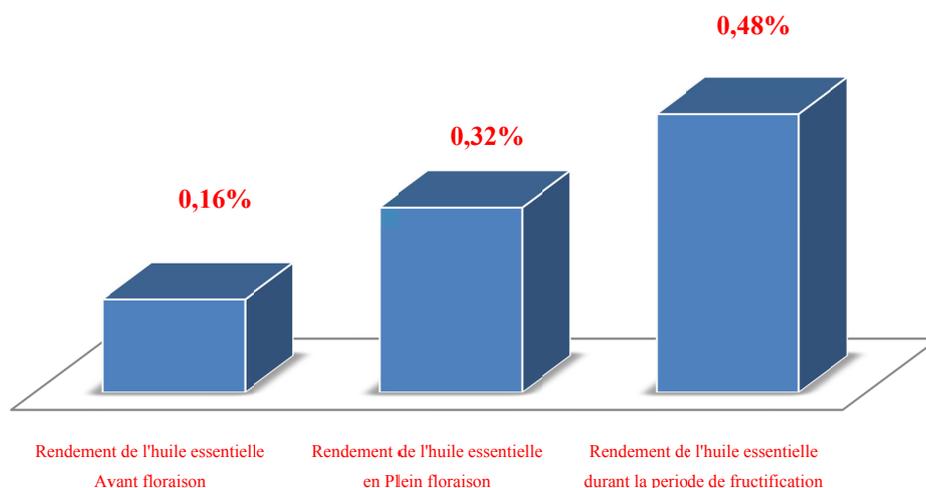
**Fig. 11** Teneur en eau d'*Ammi visnaga* L.

A : avant floraison, B: pleine floraison, C : période de fructification.

### 3 Caractérisation des huiles essentielles

#### 3.1 Rendement en huiles essentielles

Les rendements des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* durant les trois périodes de croissance (avant floraison, pleine floraison, après floraison) sont respectivement de (%) 0.16 0.32 et 0.48 (Fig. 12).



**Fig. 12** Rendement des huiles essentielle d'*Ammi visnaga* L. durant différentes périodes de croissance

D'après ces résultats, on remarque que le meilleur rendement a été obtenu durant la période de fructification (0.48 /100g de matière végétale). D'après la littérature, il est à signaler que l'extraction de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* durant la période d'avant floraison n'a jamais été réalisée. Le rendement d'extraction des parties aériennes d'*Ammi visnaga* obtenu durant la période de pleine floraison (0.32 %) est inférieur à celui obtenu (1.3 %) par Khalfallah *et al.* (2011) ayant étudié cette plante au niveau de l'Est algérien (Constantine). Par ailleurs, un rendement de 0.2 % est obtenu, après l'extraction des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* à partir des fleurs uniquement récoltées de deux régions tunisienne Ichkeul et Djebba (Khadri *et al.*, 2011). Par contre, durant la période de fructification le rendement d'extraction que nous avons obtenu (0.48 %) reste supérieur à celui obtenu (0.27 %) par Satrani *et al.* (2004) au Maroc.

D'après Maupetit (1994) et Rodolfo *et al.* (2006), le rendement en huile essentielle varie selon la plante et de sa partie utilisée, le matériel et la méthode d'extraction, l'origine et la période de récolte, le degré de broyage et enfin du climat et de la nature pédologique du sol.

### 3.2 Caractères organoleptiques

Les principaux caractères organoleptiques des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. obtenues par hydrodistillation sont présentés dans le tableau 13.

**Tableau 13** : Caractères organoleptiques des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L.

Caractères organoleptiques				
	Aspect	Couleur	Odeur	Goût
<i>Ammi visnaga</i> L.	liquide limpide	jaune claire	dégage une forte odeur aromatique	amer

Les huiles extraites d'*Ammi visnaga* durant trois périodes de croissance, avaient un aspect liquide de coloration jaune claire. Elles dégagent toutes une très forte odeur anisée. Les résultats que nous avons obtenus sont relativement comparables avec ceux rapportés dans la littérature. Khalfallah *et al.* (2011) ont mentionné la couleur jaune de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* alors que Satrani *et al.* (2004) ont soulevé son odeur caractéristique très âcre.

### 3.3 Caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles

L'étude des propriétés physicochimiques constitue un moyen de vérification et de contrôle de qualité. Il n'existe pas de normes officielles pour l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*. Les résultats des analyses que nous avons obtenues sont présentés dans le tableau 14.

**Tableau 14** : Caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* comparés à quelques plantes de la famille des *Ombellifereae* durant différentes périodes de croissance (Rana, 2010).

Caractéristiques Physico-chimiques	Huiles essentielles (HE)						
	<i>Ammi visnaga</i> L.			HE <sub>1</sub>	HE <sub>2</sub>	HE <sub>3</sub>	HE <sub>4</sub>
	HE AV.	HE PL.	HE F.				
Densité à 20°C	<b>0.869</b>	<b>0.877</b>	<b>0.872</b>	0.9548	0.828	0.9548	0.8648
Indice de réfraction à 20°C	<b>1.441</b>	<b>1.439</b>	<b>1.488</b>	1.473	1.473	1.53	1.489
Pouvoir Rotatoire	<b>+6°2´</b>	<b>+6°3´</b>	<b>+6°8´</b>	+63° 14´	+10° 4´	+16°16´	+1°3´

Avec :

HE<sub>1</sub>: *Apium graveolens* Lin (graines); HE<sub>2</sub>: *Ferula ovina* Boiss; HE<sub>3</sub>: *Foeniculum vulgare* Miller (graines); HE<sub>4</sub>: *Trachyspermum Ammi*

D'après le tableau 14, on remarque que les valeurs de densité des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* sont très proches ; cela indique que les propriétés physiques de ces huiles sont assez voisines.

De plus, les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* présentent des faibles indices de réfraction (1,441 à 1,488) ceci indiquent leur faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques (Mantel et al., 1995).

Concernant le pouvoir rotatoire, on remarque que nos huiles essentielles dévient la lumière polarisée.

### 3.4 Composition chimique des huiles essentielles analysées par CPG-SM

L'analyse des l'huile essentielles d'*Ammi visnaga* durant les trois périodes de croissance (avant floraison , pleine floraison et période de fructification) par CPG/SM a permis de détecter respectivement 75, 63 et 43 composés différents dans chaque huile. Les résultats des profils chromatographiques de la CPG/SM obtenus pour les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* sont présentés dans l'annexe 3 et dans le tableau 15.

**Tableau 15:** Composition chimique des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. étudiée.

No	Composés	T <sub>R</sub>	HE <sub>1</sub> %	HE <sub>2</sub> %	HE <sub>3</sub> %
1	-	5.774	0.007		
2	Acide propanoïque 2- méthyle, 2- méthyle propyl ester	8.069	0.032	0.031	0.337
3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> : Bicyclo[3,1,0]hex-2ene2-methyl 5-(1-méthylethyl) (Syn: $\alpha$ Thujène)	8.312	-	-	0.025
4	Phénol 3-5 diméthyle	8.684	0.027	0.095	0.094
5	-	8.903	0.012	0.018	-
6	Benzaldéhyde	9.53	0.01	0.063	-
7	1R- $\alpha$ Pinène	9.82	-	0.058	0.049
8	$\beta$ Phellandrene	9.84	0.023	-	0.201
9	$\beta$ Myrcène	10.52	-	0.252	-
10	Nerol	10.53	0.596	-	-
11	Isobutyle -2- méthyle butanouate	10.91	0.5	-	-
12	Butyle 2-méthyle butanouate	10.93	-	0.742	2.301
13	Acide butanoïque 3methyl-2methylpropyl ester (syn: <b>Isobutyl isovalerate</b> )	11.046	0.195	0.271	0.836
14	Acide propanoïque 2-méthyle-,3-méthyle butyle ester	11.26	0.243	-	0.694
15	Acide propanoïque 2-méthyle-,2-méthyle butyle ester (syn: <b>Isoamyl iso-butyrate</b> )	11.406	<b>1.802</b>	<b>1.828</b>	<b>6.758</b>
16	-	11.57	-	0.195	-
17	-	11.61	-	-	0.4

18	Acide butanoïque -2-méthyle, 2-méthyle butyl ester (syn: <b>2-Methylbutyl 2-methyl butanoate</b> )	14.018	<b>10.291</b>	<b>16.533</b>	<b>28.561</b>
19	β-Linalool	14.036	<b>2.916</b>	<b>13.616</b>	<b>9.181</b>
20	Acide butanoïque -3-méthyle, 2-méthyle butyl ester (syn: <b>Acide isovalérique, 2-méthyle butyl ester</b> )	14.097	<b>2.857</b>	<b>1.355</b>	<b>3.490</b>
21	n-Amyl isovalerate	14.164	<b>2.324</b>	-	-
22	Acide pentanoïque, 2-penten-1-yl ester (Z)-	14.950	0.396	0.814	0.904
23	-	15.10	-	0.256	-
24	4-Hexane-1-ol, 5-méthyle-2-(méthyle éthenyl)	15.497	-	0.377	-
25	3- Cyclohexane-1-ol,4-méthyl-1 méthyle éthenyl (syn: <b>4- Terpeneol</b> )	15.692	-	0.280	-
26	-	15.942	-	0.196	-
27	L α Terpeneol	16.033	0.396	0.787	0.428
28	3-Cyclohexane 1-acétaldéhyde α-4 diméthyle	16.61	0.177	0.274	-
29	-	16.67	0.168	0.260	-
30	-	17.62	-	0.399	-
31	1,6-Octadien 3-ol, 3,7-diméthyle acétate	18.44	0.196	-	-
32	Acide propanoïque 2- méthyle phényle méthyle ester	18.57	0.344	0.214	-
33	2 – Buten1-,1(2,6,6 triméthyle-1,3 cyclohexadien -1-yl) (syn : <b>Floriffone</b> )	20.47	<b>1.705</b>	0.978	0.875
34	Acide Butanoïque 3-méthyle phényle méthyle ester (syn: <b>Acide isovalérique, benzyl ester</b> )	20.55	<b>1.673</b>	<b>1.258</b>	<b>1.420</b>
35	Acide propanoïque 2-méthyle, 2-phényle éthyle ester	20.71	-	0.863	0.780
36	β Phényle éthyle buterate	20.74	0.979	-	-
37	-	21.19	0.745	0.490	-
38	Acide propanoïque 2-méthyle-3,7-diméthyle -2,6-octadienylester	21.33	-	-	<b>1.023</b>
39	Linalool isobutyrate	21.37	<b>2.260</b>	<b>2.050</b>	-
40	1H,3a,7-Methanoazulene,2,3,4,7,8,8a hexahydro-3,6,8,8 tetraméthyle	21.55	0.336	0.492	-
41	5,9 Undecadien -2one-6,10 diméthyle	21.74	0.381	0.391	0.404
42	1,6,10 Dodecatriene-7,11diméthyl-3-méthylène (Z)	22.019	0.306	0.301	-
43	1-Dodecanol	22.48	0.414	0.888	-
44	Citronellyl acétate	22.57	-	<b>1.452</b>	<b>1.617</b>
45	Citronellyl n-butyrate	22.61	<b>2.119</b>	<b>1.262</b>	<b>1.188</b>

46	Acide butanoique 3-méthyle 2-phényle éthyle ester	22.68		-	-
47	Acide butanoique 2-méthyle 2-phényle éthyle ester	22.75	<b>1.468</b>	<b>0.615</b>	<b>0.442</b>
48	Cyclohexane 1,1,2 triméthyle 3,5bis 1-methylethenyle (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ )	23.084	<b>6.433</b>	<b>7.886</b>	<b>3.264</b>
49	Acide butanoique 3-méthyl 1-etheny 1,5-diméthyl 4-hexenyl ester (syn: <b>linalyl isovalerate</b> )	23.15	<b>3.457</b>	<b>2.705</b>	<b>2.710</b>
50	-	23.237	<b>1.812</b>	<b>1.693</b>	-
51	2-Butanol, 4-(2,2-diméthyl-6-méthylène cyclohexylidène)	23.36	0.144	-	-
52	Caryophyllène	23.40	0.660	0.657	-
53	1H-Inden-1-ol, 2,4,5,6 ;7,7a hexahydro-4,4,7- triméthyl	23.68	0.205	-	0.693
54	Acide Propanoïque 2 méthyl decyl ester	23.80	<b>1.385</b>	<b>1.302</b>	<b>0.621</b>
55	-	23.93	0.303		
56	Cyclopropane méthanol $\alpha$ -2 diméthyl -2(4-méthyl-3-pentenyl)[1 $\alpha$ R*,2 $\alpha$ ]	24.16	<b>1.458</b>	<b>1.605</b>	<b>2.536</b>
57	<b>C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub></b> : Citronellyl proprionate	24.32	0.957	0.611	0.838
58	<b>C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O</b> : 2-Octen 1-ol, 3,7-diméthyl	24.40	0.829	0.783	0.598
59	<b>C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O</b> : Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]cyclohepten-3(3ah)-one,1,2,3b,6,7,8-hexahydro-6-6-diméthyl	24.50	0.788	0.519	0.513
60	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub></b> : Limonène 6-ol pivalate	24.90	0.703	-	-
61	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O</b> : Caryophyllène oxide	25.033	0.378	-	-
62	-	25.1	0.286	-	-
63	<b>C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub></b> : Acide butanoïque ,2-méthyl octyl ester	25.47	0.916	0.647	0.652
64	<b>C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub></b> : Geranyl isovalerate	25.56	0.459	0.304	-
65	<b>C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub></b> : 5-Hydroxy-2,3,3-triméthyl-2-(3-méthyl-butane-1,3diényl)cyclohexane	25.63	0.43	-	-
66	-	25.78	-	-	0.208
67	-	26.001	0.484	-	-
68	<b>C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>S</b> : Thiophène -2-4 bis(1,1-diméthylethyl)	26.25	0.705	-	-
69	5,6-Azulenedicarboxaldehyde,1,2,3,3a,8,8a hexahydro-2,2,8-triméthyl	26.34	0.571	-	-
70	2,3,3-Triméthyl-2-(3méthyl-butane-1,3diényl) cyclohexane.	26.52	0.537	0.305	0.556
71	-	26.841	0.503	0.527	-
72	-	26.89	-	0.472	<b>1.325</b>
73	<b>C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O</b> : 1,6,10 Dodecatrien-3-ol,3,7,11-triméthyl	26.91	0.927	-	-
74	Acide propanoïque 2-méthyl decyl ester	27.468	-	-	<b>1.936</b>

75	Acide butanoïque decyl ester (syn: <b>decyl butanouate</b> )	27.584	<b>5.814</b>	<b>4.804</b>	-
76	<b>C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub></b> : Nerolidyl acétate	27.73	0.151	-	-
77	<b>C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O</b> : Benzene,1-methoxy-4-(2-propenyl)	27.88	0.571	0.18	-
78	-	28.52	0.273	-	0.99
79	Spiro(2,5)octane-3,3-diméthyle-2-(1-buten-3-on-1-yl)	28.723	<b>6.539</b>	<b>4.937</b>	<b>7.821</b>
80	Acide butanoïque 3-méthyle hexadecyl	29.094	<b>2.363</b>	<b>2.317</b>	<b>1.464</b>
81	-	29.16	<b>2.073</b>	<b>1.504</b>	-
82	-	29.52	0.518	-	-
83	<b>C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>O</b> : Hexadecanol	30.82	0.667	0.601	
84	-	31.21	0.563	0.772	-
85	-	31.84	0.537	0.336	-
86	4-Isopropyl-1,7,11-triméthyl-2,7,11-cyclotetradecatrien-1-ol(syn:Thunbergol)	32.66	0.183	-	<b>1.091</b>
87	(M)Hexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-ol, 3,7,11,16-tetraméthyl-, (E,E,E)	32.71	<b>1.898</b>	<b>1.250</b>	-
88	Farnesol	33.14	0.593	0.753	<b>1.193</b>
89	phytol	33.51	<b>1.025</b>	-	-
90	Verticiol	33.84	<b>10.063</b>	<b>7.587</b>	<b>6.451</b>
91	-	34.24	<b>0.331</b>	-	-
92	(R) 2,6,10,14 hexadecatetraen 1-ol 3,7,11,15 tetraméthyl acétate (E,E,E)	34.56	<b>3.060</b>	<b>4.282</b>	<b>2.530</b>
93	-	38.8	-	0.367	-
Pourcentage des composants identifiés %			<b>92.307</b>	<b>93.578</b>	<b>97.075</b>
Pourcentage des composants majoritaires %			75.18	79.719	85.559

Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne non polaire HP5MS ; Indice de rétention relatif aux n-alcanes C7-C24 ; t=trace (<à 0.1%).

**T** : Temps de rétention

**R**  
**HE1** : Huile essentielle d'*Ammi visnaga* de la période avant floraison

**HE2** : Huile essentielle d'*Ammi visnaga* de la période pleine floraison

**HE3** : Huile essentielle d'*Ammi visnaga* de la période de fructification

L'analyse par CPG/SM des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. récoltée de la Wilaya de Boumerdes (Bordj-Menaiel) et utilisée dans cette présente étude a permis d'identifier respectivement 73, 63 et 43 composants représentant respectivement (%) 92.307, 93.578 et

97.075 des composants présents durant trois périodes de croissance de la plante : avant floraison, pleine floraison et période de fructification. Cependant, un pourcentage élevé en composés **non- terpènes esters, monoterpènes, di-terpènes** et **alcools** a été observé dans nos trois huiles.

Durant les trois périodes de croissance, le non-terpène ester (2-methylbutyl 2-methyl butanoate) a été le constituant majoritaire avec des taux croissants durant les périodes de croissance d'avant floraison, pleine floraison et période de fructification, soit de (%) 10.291, 16.533 et 28.561 respectivement, suivi par le mono-terpène oxygéné  **$\beta$  linalool** (%) (2.916, 13.616 et 9.181), le **diterpène verticiol** (%) (10.063, 7.587 et 6.451), le **spiro (2,5) octane-3,3-dimethyl-2-(1-buten-3-on-1-yl)** (%) (6.539, 4.937 et 7.821), **cyclohexane 1,1,2 trimethyl 3,5 bis 1-methylethenyl (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ )** (%) (6.433, 7.886 et 3.264) et le **linalyl isovalerate** (%) (3.457, 2.705 et 2.71). Il est à noter que selon les phases de croissance, la composition chimique des trois huiles obtenues diffère dans certains constituants, cependant, ces huiles partagent les mêmes composants majoritaires avec des teneurs différentes.

Très peu d'études existent à travers le monde sur la composition de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. Généralement cette huile est extraite durant la période de floraison et de fructification mais sa composition chimique avant la floraison n'a jamais été explorée.

La comparaison de nos résultats (composition des trois huiles) avec ceux rapportés par les auteurs tunisiens et marocains montre une grande concordance dans la composition chimique. khalfallah *et al.* (2011) ont rapporté que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* collectée durant la période de floraison dans la région de Constantine contient 21 composants dont le **2-methylbutyl 2-methyl butanoate (30.1 %)** qui est majoritaire suivi par l'**isobutyl isobutyrate (14 %)**, **croweacin (12.2 %)** et le **linalool (12.1 %)**. Alors que l'analyse de l'huile essentielle tunisienne issue de deux régions différentes, Ichkeul et Djebba obtenues durant la période de pleine floraison a montré que les composants majoritaires respectivement sont: l'**iso-amyl méthyle 2-butyrate (24.2 et 36 %)**, **linalool (23.6 et 32 %)**, **iso-pentyl iso-valerate (10 % et 14.8 %)** (Khadhri *et al.*, 2011). Le même résultat a été obtenu par Sellami *et al.* (2011) qui mentionnent une dominance de non-terpène ester (isoamyl méthyle 2-butyrate) en pleine floraison.

De même, Satrani *et al.* (2004) ont rapporté que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* du Maroc récoltée durant la période de fructification contient **33** composants, dont les composés majoritaires sont : l'**isoamyl méthyle 2-butyrate (27.7 %)**, **linalool (22.7 %)**, **isobutyrate amyl**

(16 %) et amyl valérate (10 %). De plus, elle est caractérisée par la présence des monoterpènes ( $\alpha$ -thujène,  $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène), des sesquiterpènes, des esters isobutyriques dont l'isobutyrate d'amyle, des acétates, des alcools et des phénols (4-terpèneol, linalol,  $\alpha$ -terpèneol...). Lamiri *et al.* (2001) rapportent dans leur étude que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est composée essentiellement de linalool (70.1 %) et de pentyl méthyle butanoate (4.3 %).

Par contre, nos résultats diffèrent avec ceux rapportés par Günaydin et Beyazit (2004) qui ont démontré que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. récoltée de Turquie durant la période de fructification est caractérisée par un pourcentage élevé en nerol (29.98 %),  $\alpha$ -bisabolol (20.86 %) et butyl hydroxy-toluène (18.55 %), tant que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. d'origine iranienne est dominée par la présence de cis-pinène hydrate (42.83 %), méthyl octadecanoate (14.73 %) et le  $\alpha$ -terpinène (9.20 %) (Rasooli *et al.*, 2007).

Une grande similitude a été remarquée dans la composition chimique des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. de Nord Africain (Tunisie, Algérie et Maroc), alors qu'une différence remarquable a été notée dans la composition de la même espèce collectée d'Iran et de Turquie.

Cette variabilité dans la composition chimique et des teneurs de l'huile essentielle peut être attribuée à de nombreux facteurs comme les facteurs écologiques (type de sol, radiations solaires), les facteurs génétiques, la sélection individuelle (Ross et Sombrero, 1991; Keskitalo *et al.*, 2001; Satrani *et al.*, 2004) ainsi que la méthode d'extraction et la partie de la plante utilisée (Zrira *et al.*, 2008; Sellami *et al.*, 2011).

## 4 Caractérisation des extraits phénoliques

### 4.1 Rendement

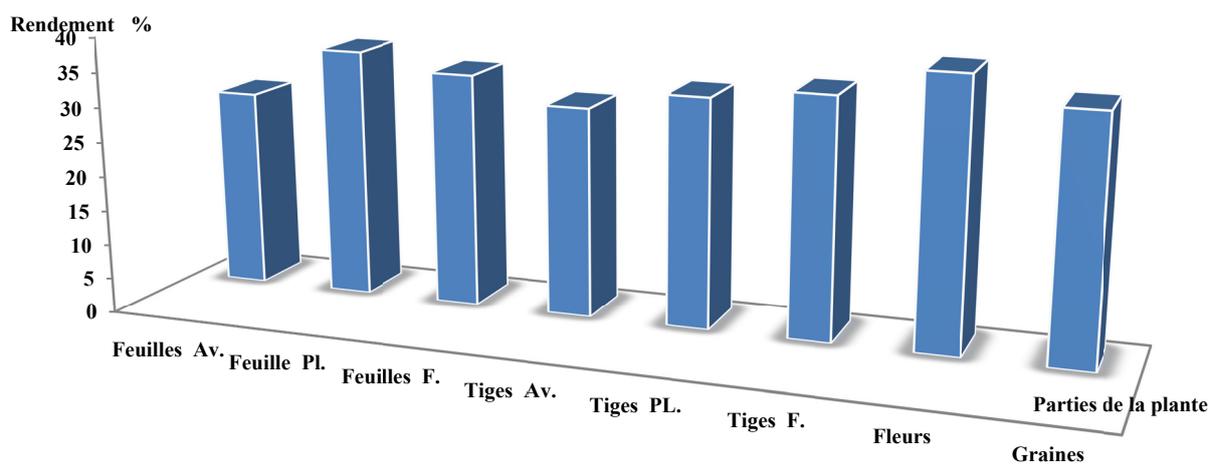
D'après Monpon *et al.* (1993) et Escibano et Santos (2003), l'extraction n'est qu'une étape de transformation de la matière première en extrait.

Dans toutes les étapes qui précèdent ou qui suivent, l'extraction doit être maîtrisée avec précision pour arriver à un produit final de qualité optimale. Toute fois, les méthodes et les conditions d'extraction affectent le rendement en composés phénoliques (Bucić-Kojić *et al.*, 2011).

Les extraits bruts récupérés après évaporation des différentes parties de la plante durant différentes périodes de la récolte, ont été pesés pour déterminer le poids résultant. Le rendement a été déterminé par rapport à 1g de matière végétale sèche transformée en poudre et macérée pendant 72h. Les résultats ont été exprimés en pourcentage. Le tableau ci-dessous et la figure 13 regroupent les résultats du rendement et la quantité en gramme de chaque extrait phénolique obtenu.

**Tableau 16** : Rendement en composés phénoliques pour 1g de chaque partie de la plante étudiée

Parties de la plante	Rendements (%)
Feuilles Av.	28.84
Feuilles Pl.	36.18
Feuilles F.	33.95
Tiges Av.	30.71
Tiges Pl.	33.18
Tiges F.	34.43
Fleurs	38.76
Graines	35.1



**Fig.13** Rendements des extraits méthanoliques des différentes parties aériennes la plante *Ammi visnaga* L. durant les différentes périodes de croissance

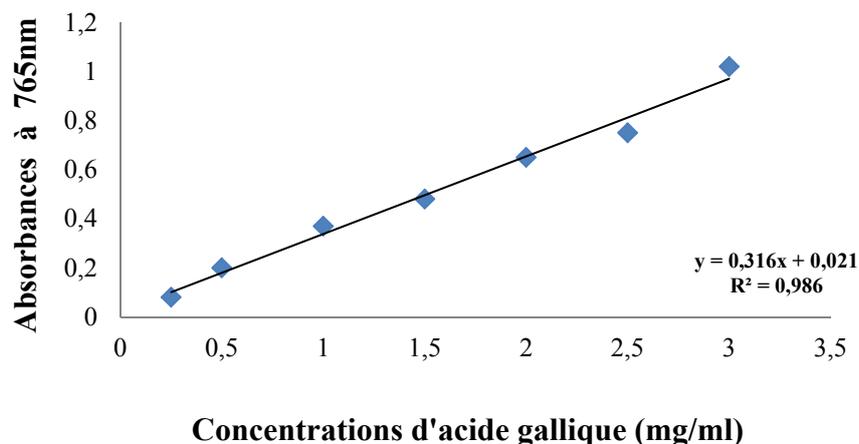
A partir de tableau (16) et de la figure (13), nous constatons que les rendements des parties (feuilles Pl. et fleurs) extraites durant la période de pleine floraison représentent les rendements les plus élevés de la plante suivies par (graines et tiges F.) extraites durant la période de fructification. Toutes fois, il reste difficile de comparer les résultats que nous avons obtenu avec ceux de la littérature car le rendement dépend de la méthode d'extraction qui doit permettre l'extraction plus au moins complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique (Turkmenet *et al.*, 2007).

Selon Escribano et Santos (2003), l'extraction dépend de plusieurs paramètres y compris le diamètre des graines formant la poudre, le volume et la nature du solvant utilisé. Le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (Falleh *et al.*, 2008). De précédentes études rapportent que les plantes ayant des rendements élevés en extrait contiennent une forte teneur en composés phénoliques (Ross *et al.*, 1991 et Keskitalo *et al.*, 2001).

#### 4.2 Dosage des composés phénoliques

- **Polyphénols totaux**

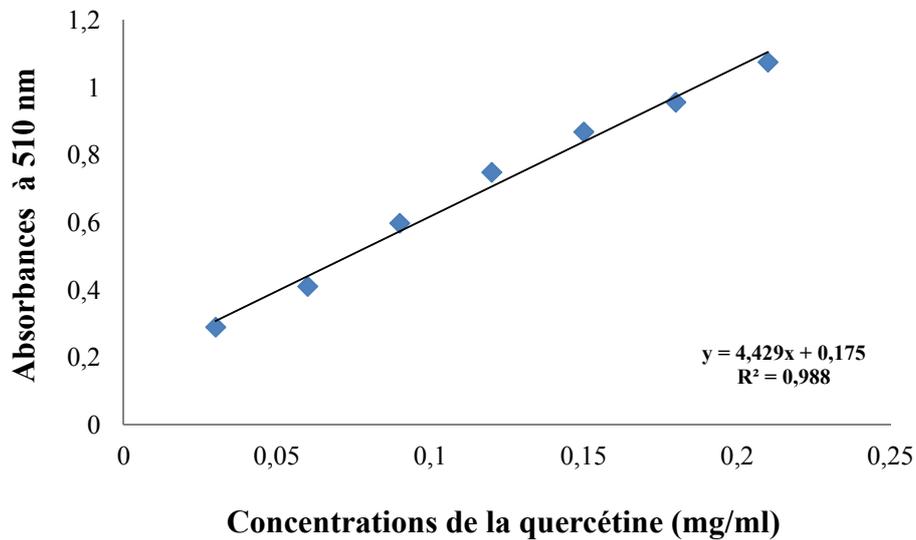
Les teneurs en polyphénols totaux (mg GAE/g de matière végétale) des extraits obtenus des différentes parties aériennes d'*Ammi visnaga* L. durant les différentes périodes de croissance sont déterminées par la méthode colorimétrique de Folin-ciocalteu (Singleton et Ross, 1965), en utilisant la courbe d'étalonnage d'acide gallique représentée par la figure 14.



**Fig.14** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

- **Flavonoïdes**

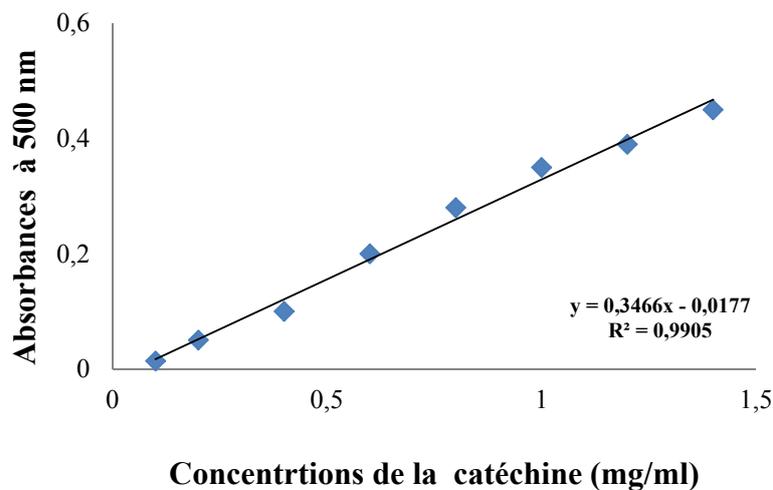
Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon la méthode de Zhishen *et al.* (1999) avec le trichlorure d'aluminium, en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine représentée dans la figure 15.



**Fig. 15** Courbe d'étalonnage de la quercétine

- **Tanins**

Le dosage des tanins a été effectué selon la méthode de Price *et al.* (1978) avec la vanilline en milieu acide, tout en utilisant la courbe d'étalonnage de la catéchine représentée par la figure 16.



**Fig. 16** Courbe d'étalonnage de la catéchine

Le tableau ci-dessous représente les résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins.

**Tableau 17 :** Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins des extraits étudiés

Parties de plante	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tanins
	mg EGA/ MV	mg EQ/ MV	mg EC/MV
Feuilles Av.	13.86	3.11	5.635
Feuilles Pl.	17.46	3.569	3.29
Feuilles F.	7.97	3.952	2.89
Tiges Av.	<b>23.354</b>	1.236	6.06
Tiges Pl.	<b>20.822</b>	1.02	7.365
Tiges F.	<b>25.378</b>	2.572	8.92
Fleurs	18.417	4.8195	5.92
Graines	19.872	12.57	10.26

EGA : Equivalent d'acide gallique, EQ : Equivalent de quercétine, EC : Equivalent de catéchine.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 17, nous remarquons que les trois tiges (F., Pl. et Av.) d'*Ammi visnaga* L. referment respectivement les quantités les plus élevées en polyphénols totaux, soit (25.37, 23.354 et 20.822 mg EGA/g de matière végétale sèche), suivis par les graines (19.872 mg EGA/g de matière végétale sèche), les fleurs puis les feuilles (Pl., Av. et F.) respectivement dans l'ordre.

**Tableau 18 :** Comparaison entre les teneurs en polyphénols totaux (PT) et flavonoïdes (F) contenus dans les extraits méthanoliques de quelques *Apiaceae* (Rice-Evans, 1996).

Plantes	PT (mg EAG/g MVS)*	F ( mg EQ/g MVS)*
<i>Ammi visnaga</i> (graines)	<b>19.872 ± 0.05</b>	<b>12.57 ± 1.5</b>
<i>Anethum graveolens</i>	14.637 ± 1.52	18.159 ± 2.16
<i>Apium graveolens</i>	19.437 ± 0.47	13.242 ± 2.62
<i>Carum carvi</i>	35.445 ± 1.84	12.812 ± 1.49
<i>Coriandrum sativum</i>	38.828 ± 2.62	45.262 ± 2.11
<i>Cuminum cyminum</i>	25.291 ± 2.64	38.364 ± 1.02
	28.99 (Athamena, 2009)	17.39 (Athamena, 2009)
<i>Foeniculum vulgare</i>	21.712 ± 3.60	15.854 ± 1.96
<i>Trachyspermum ammi</i>	31.028 ± 1.90	27.446 ± 0.87

\* : Valeurs exprimées en (moyenne ± écart type).

D'après l'étude faite par Wojdylo *et al.* (2007), les plantes de la famille des Ombellifères ne présentent pas une teneur très élevée en polyphénols. Cependant, la plupart des épices consommées appartenant à la famille des *Ombellifères* sont une excellente source de composés phénoliques (Rice-Evans, 1996).

D'après le tableau 18, nous remarquons que la teneur en polyphénols des graines d'*Ammi visnaga* est largement supérieure à celle des graines d'*Anethum graveolens* et très proche de celle de l'espèce *Apium graveolens*. Cependant, la teneur des polyphénols totaux de nos graines est nettement inférieure à celles des graines de *Carum carvi*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare* et *Trachyspermum ammi*. Cette différence résulte vraisemblablement à la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu, qui est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement celle des composés phénoliques, mais également de certains sucres et protéines etc., ce qui donne un taux phénolique apparent élevé (Vuorela *et al.*, 2005; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006; Tawaha *et al.*, 2007). En effet, il faut signaler aussi que la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (conditions climatiques, la maturité au moment de la récolte et les conditions de stockage) (Podsdek *et al.*, 2007; Falleh *et al.*, 2008).

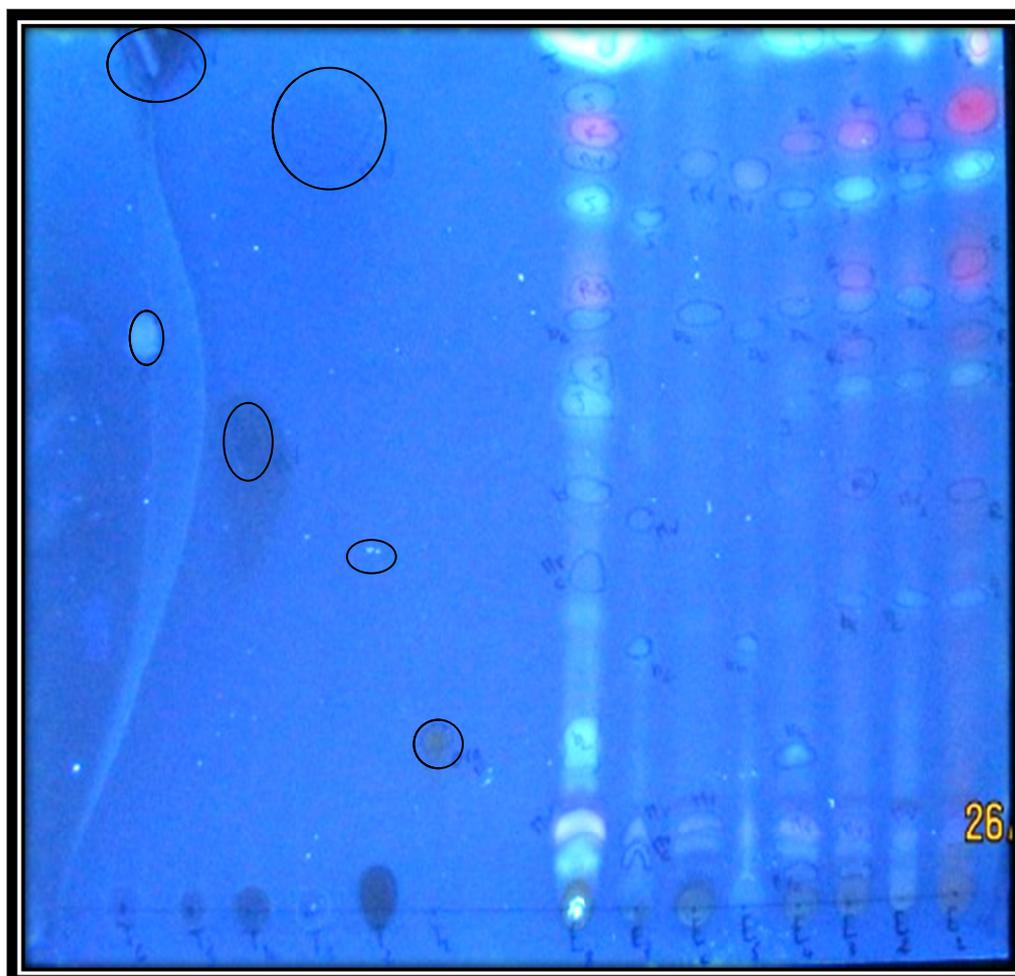
Concernant la teneur en flavonoïdes, d'après les résultats représentés dans le tableau 17; nous remarquons que la graine d'*Ammi visnaga* renferme la quantité la plus élevée, suivie par la fleur, les feuilles et enfin les tiges. Selon le tableau 18, la teneur en flavonoïdes de notre graine est proche de celles obtenue dans les graines d'*Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Cuminum cyminum* et de *Foeniculum vulgare* mais largement inférieure à celles des graines de *Trachyspermum ammi* (27.446 EQ/g de matière végétale sèche) et de *Coriandrum sativum* (45.262 EQ/g de matière végétale sèche) (Rice-Evans, 1996). Concernant les tanins, nous remarquons que la graine de notre plante est la partie la plus riche suivi par les tiges, les fleurs puis les feuilles.

#### **4.3 Chromatographie sur couche mince CCM des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L.**

L'analyse qualitative du contenu phénolique des différents extraits obtenus dans cette présente étude a été faite en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation la plus simple des différents constituants d'un extrait végétal.

Après plusieurs essais préliminaires permettant d'optimiser un système solvant de migration, nous avons opté pour le système suivant : Chloroforme - Acétate d'éthyle - Acétone (50:40 :10). Les chromatogrammes résultants comportent une série de spots (Photos 5 et 6).

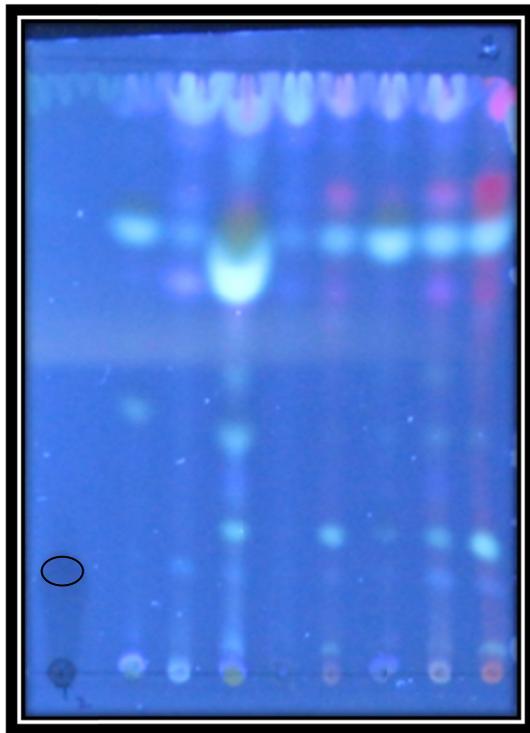
L'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf. et des couleurs des taches observées sous lampe UV apparues sur CCM avec ceux des étalons notés dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats de la CCM des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L. et des standards sont résumés dans les tableaux 19, 20 et 21.



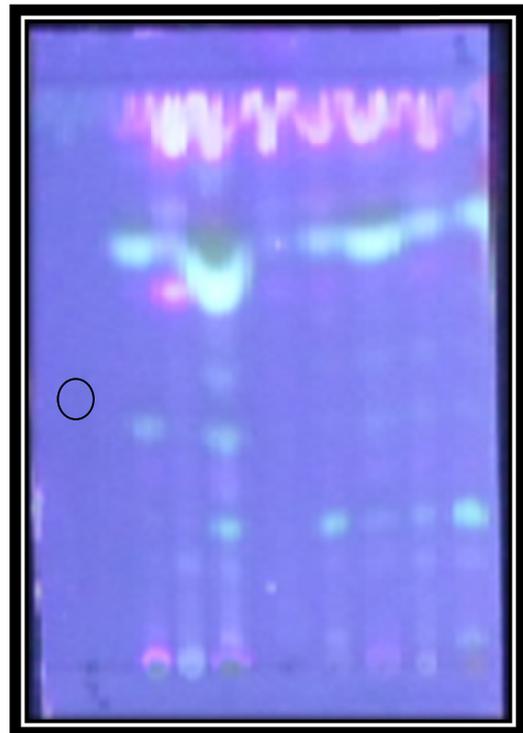
**Photo 5.** CCM des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* et des standards

**E1:Feuilles Av., E2: Tiges Av., E3: Feuilles Pl., E4 : Fleurs, E5 : Tiges Pl., E6 : Feuilles F.,  
E7:Graines, E8:Tiges F.**

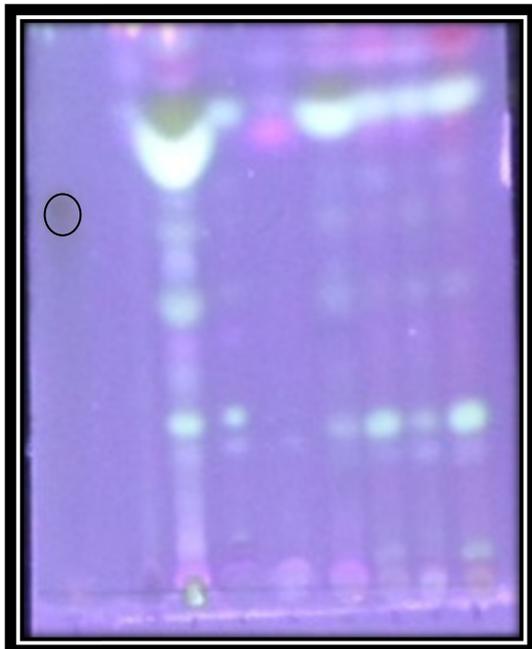
**T1: Quercétine, T2 : Acide gallique, T3 : Acide phénolique, T4 : Acide ascorbique, T5 : Catéchol,  
T6 : Vanilline**



A



B



C



D

**Photo 6.** Minis CCM des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* et des standards  
A : Quercétine, B : Acide gallique, C : Acide phénolique, D : Catéchol.

**Tableau 19:** Couleurs des taches observées sur les plaques CCM et les rapports frontaux (R<sub>f</sub>) des différents standards utilisés

Témoins	Couleurs	R <sub>f</sub> .	Classes phénoliques
Quercétine	Orange	0.2	Flavonol
Acide gallique	Violet foncé	0.26	Acide phénol
Acide phénolique	Violet foncé	0.85	Acide phénol
Acide ascorbique	Violet foncé	0.52	Acide phénol
Catéchine	Violet foncé	0.93	Flavonol
Vanilline	Jaune vert clair	0.62	Aldéhyde phénol

**Tableau 20:** Couleurs des taches observées sur les plaques CCM et les rapports frontaux (R<sub>f</sub>) des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L. et standards

Couleurs des taches observées en UV à 365 nm	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Fleurs	Tiges F.	Feuilles	Graines	R <sub>f</sub> .
	Av.	Av.	Pl.	Pl.			F.		
Jaune vert	+	+	+	+	+	+	+	+	0.07
Jaune	+	+	+	+	+	+	+	+	0.1
Mauve	+	+	+	+	+	+	+	+	0.11
Bleu blanc fluorescent	-	-	-	-	+	-	+	-	0.2
Bleu claire	+	+	+	+	+	-	+	+	0.28
Marron	+	+	-	+	-	+	-	-	0.36
Bleu fluorescent	-	-	+	-	-	-	-	+	0.46
Jaune foncé	+	+	+	+	+	+	-	-	0.54
Jaune vert clair	+	-	+	-	+	+	+	+	0.62
Rouge	+	+	-	+	-	+	-	-	0.66
Jaune	+	+	-	-	-	+	-	+	0.76
Bleu fluorescent	+	+	+	+	+	+	+	+	0.8
Rouge	+	+	+	+	-	+	-	-	0.83
Jaune Fluorescent	-	-	-	-	-	+	-	-	0.86
Jaune	-	-	-	-	-	+	-	+	0.93

**Tableau 21:** Couleurs et significations des taches observées sur les plaques CCM

(Soine *et al.*, 1964 ; Nielson et Lemmich, 1964; Hörhammer *et al.*, 1966, Seshadri et Vishwapaul, 1973 et Markham, 1982).

Couleurs	Noms des composés probables
Bleu fluorescent	7-Hydroxycoumarine , 7-Hydroxy-6-alkoxycoumarine 6, Psoralène 7,8-Trialkoxycoumarine , 6-Methoxyangelicine ,7,8-Dihydroxycoumarine
Bleu blanc fluorescent	Flavonol, flavone, flavanone, isoflavone
Jaune fluorescent	7-Hydroxy-8-méthoxycoumarine 3, 4,5-Triméthoxy-psoralène , 6-Hydroxy-5,7-diméthoxycoumarine , 5- Hydroxy-6,7-diméthoxycoumarine , 5-Hydroxypsoralène , 5,6-Diméthoxyangélicine
Jaune	Flavonol
Rouge	Anthocyanidine 3-glucoside
Mauve	Anthocyanidine 3-glucoside

La propriété physique la plus évidente de la plupart des coumarines est la fluorescence qu'elles montrent sous la lumière UV (365 nm). Cette caractéristique a été appliquée pour leur détection sur chromatographie sur couche mince (Soine *et al.*, 1964 ; Nielson et Lemmich, 1964; Hörhammer *et al.*, 1966). La fluorescence du produit soumis à la lumière UV représente l'étape primaire de l'analyse, et joue un rôle très important pour l'identification structurale. D'après les résultats de tableau 20, il est bien clair que la composition des huit extraits de la plante diffère, cela se voit dans la tache bleu claire de  $R_f \cong 0.2$  cm qui est présente uniquement dans l'extrait des fleurs et des feuilles de la période de fructification mais absente dans les autres extraits. Cette différence est aussi remarquée dans les taches : marron  $R_f \cong 0.36$ , la tache « Bleu fluorescent »  $R_f \cong 0.4$ , la tache « jaune vert clair »  $R_f \cong 0.62$ , la tache « jaune clair »  $R_f \cong 0.66$ , la tache « rouge »  $R_f \cong 0.83$ , la tache « jaune fluorescent »  $R_f \cong 0.86$  et la tache « jaune »  $R_f \cong 0.93$ . D'après la littérature, notre plante est très riche en coumarines, ces derniers constituent ses composés actifs, ceci a été confirmé d'abord par nos résultats de screening phytochimique ainsi que par nos résultats chromatographiques. Ils ont montré la présence de nombreux composés fluorescents (présence de nombreux spots fluorescents). Selon les résultats du screening phytochimique, notre plante est une source importante en flavonoïdes, tanins et anthocyanes, ce qui est en

accord avec le résultat de chromatographie sur couche mince qui a montré la présence de spots de couleurs rouge, jaune, bleu et mauve qui sont des couleurs qui caractérisent la présence de ces composés. Nos résultats ont également montré la présence de la vanilline dans tous les extraits testés à l'exception de l'extrait des graines et l'extrait des tiges de pleine floraison et l'absence des autres standards utilisés dans les huit extraits analysés d'*Ammi visnaga* L.

## 5 Pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits testés a été évaluée *in vitro* par deux méthodes différentes.

### 5.1 Piégeage du radical DPPH

La mesure de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH est largement utilisée pour sa fiabilité (Thaipong *et al.*, 2006), les résultats de ce test sont hautement reproductibles et comparables à d'autres méthodes de piégeage des radicaux libres (Gil *et al.*, 2002).

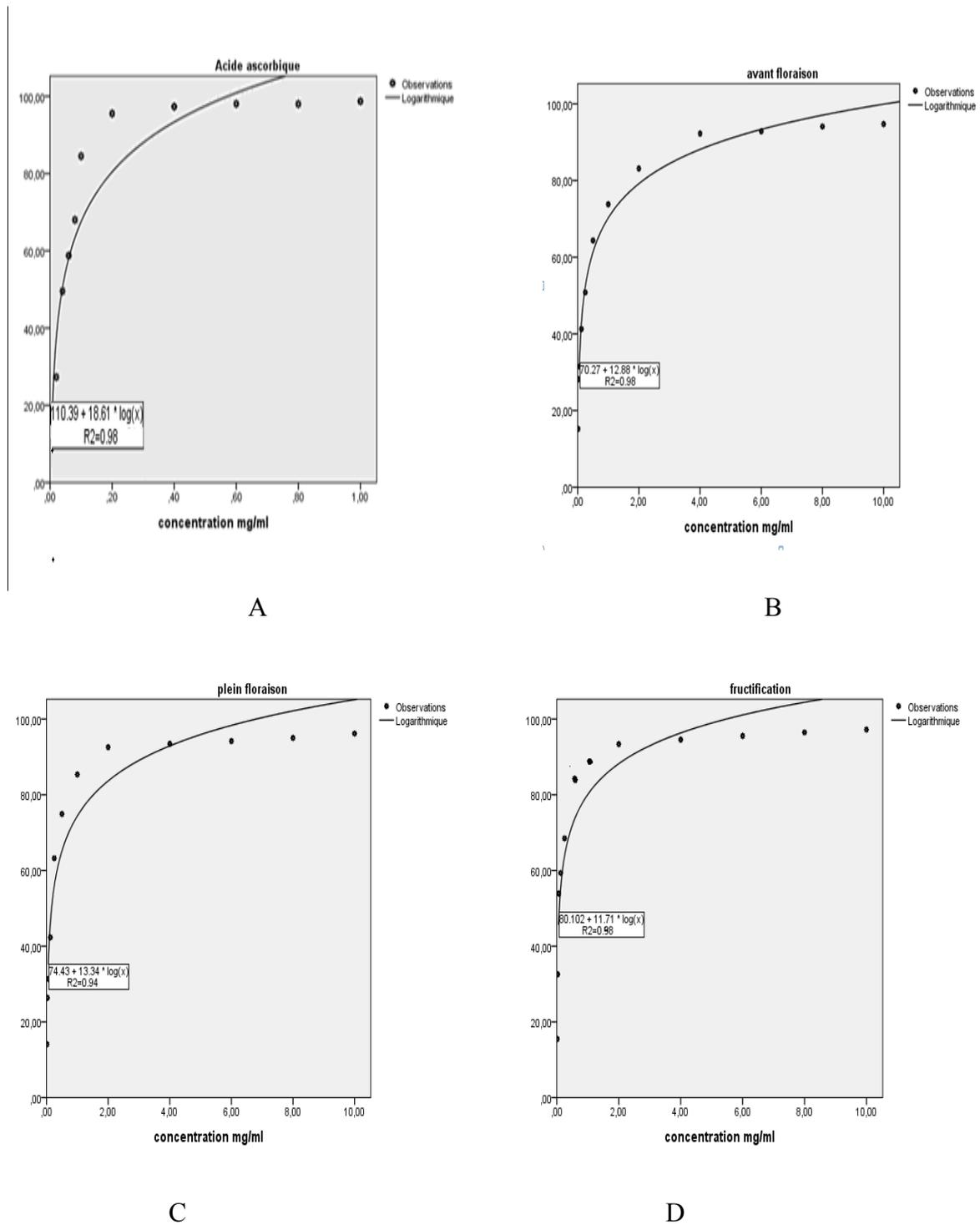
#### a) Les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical DPPH et les valeurs des IC<sub>50</sub> pour les trois huiles essentielles d'*Ammi visnaga* étudiées sont illustrés par les tableaux 22 et 23 et la figure 17. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

**Tableau 22** : Pourcentages d'inhibition du DPPH par les HE d'*Ammi visnaga*

Pourcentages d'inhibition du radical DPPH %*				
Concentrations (mg/ml)	HE Av.	HE Pl.	HE F.	Acide ascorbique
10	94,728± 0.49	96,180±0.247	97,230±0.088	ND
8	94,081±0.49	95,026±0.167	96,478±0.052	ND
6	92,847±0.49	94,192±0.32	95,543±0.089	ND
4	92,241±0.83	93,470±0.101	94,557±0.225	ND
2	83,118±0.73	89,200±0.16	93,397±0.024	ND
1	73,816±0.33	85,376±5.266	92,837±0.036	98,709±0.161
0,8	64,355±1.48	74,951±1.652	87,548±0.043	98,003±0.189
0,6	50,806±0.64	63,223±0.421	68,478±0.565	98,050±0.026
0,4	41,235±0.67	42,310±0.249	59,352±0.422	97,312±0.335
0,2	31,503±0.67	31,344±0.566	53,925±5.516	95,535±0.243
0,1	28,171±0.61	26,344±0.335	32,581±2.561	84,515±9.358
0,08	15,213±0.49	14,086±1.132	15,481±3.498	68,008±0.332
0,06	ND	ND	ND	58,760±0.407
0,04	ND	ND	ND	49,559±0.479
0,02	ND	ND	ND	27,295±0.959
0,01	ND	ND	ND	17,257±0.852

\* : Valeurs exprimées en (moyenne ±écartype). ND : non déterminé



**Fig. 17** Piégeage du radical libre DPPH par

A : l'acide ascorbique - B : l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammi visnaga* durant la période d'avant floraison- C : l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammi visnaga* durant la période de pleine floraison - D : l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammi visnaga* durant la période de fructification

**Tableau 23:** Valeurs des IC<sub>50</sub> des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

Les huiles essentielles	Valeurs des IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Valeur d'IC <sub>50</sub> de l'acide ascorbique (mg/ml)
HE Av.	0.207	
HE Pl.	0.16	0.038
HE F.	0.07	

D'après la figure 17, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de l'acide ascorbique et la concentration des différentes huiles essentielles d'*Ammi visnaga*.

Les antioxydants de synthèse manifestent une forte activité antioxydante même à de faible concentration. Pour une concentration de 1 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de DPPH enregistré est de 98,709±0.161 %. Il est à signaler que l'activité antioxydante de nos huiles essentielles n'a jamais été étudiée. Parmi les trois huiles essentielles d'*Ammi visnaga* analysées, l'huile essentielle de la période de fructification montre la plus forte activité de piégeage du radical DPPH (97,230±0.088 % à une concentration égale à 10 mg/ml), suivie par l'huile essentielle de la période d'avant floraison (96,180±0.247% à une concentration égale à 10 mg/ml) et en fin se classe l'huile essentielle de pleine floraison 94,728± 0.49. Oke et *al.* (2009) attribuent les différences d'intensité de piégeage des radicaux libres par les huiles essentielles à la composition chimique de ces dernières. De ce fait, la forte activité des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* peut être expliquée par sa forte teneur en linalool et en 2-méthylbutyl 2-méthyl butanoate. Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA (**p <0,0000**) ont montré que l'activité antioxydante des huiles essentielles et celui de témoin était significatif (Annexe 6).

#### **b) Extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga***

L'activité antioxydante peut être exprimée en tant que pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire, pourcentage de DPPH restant ou en calculant l'IC<sub>50</sub> qui est définie comme la concentration du substrat qui inhibe 50 % de DPPH (Markowicz *et al.*, 2007).

Les différentes activités de piégeage obtenues pour les extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* comparés à celle de l'acide ascorbique sont illustrées par les tableaux 24, 25 et 26 et les figures 18 et 19.

Les valeurs des IC<sub>50</sub> des différents extraits sont représentées dans le tableau 27.

**Tableau 24:** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits méthanoliques des différentes tiges d'*Ammi visnaga* collectées durant trois périodes de croissance.

<b>Pourcentages d'inhibition du radical DPPH %*</b>				
Concentrations (mg/ml)	Tiges Av.	Tiges Pl.	Tiges F.	Acide ascorbique
10	93.7±0.141	67.265±2.92	95.894±0.474	ND
8	91.625±0.093	57.96±3.111	93.38±0.0	ND
6	77.59±0.523	53.385±3.599	89.83±0.707	ND
4	66.65±0.778	46.945±1.676	80.725±0.403	ND
2	63.725±0.714	40.915±0.346	70.33±0.0	ND
1	48.005±0.064	39.2±0.834	65.585±0.233	98,709±0.161
0,8	41.255±0.346	36.185±0.12	52.515±3.797	98,003±0.189
0,6	39.185±0.049	35.25±0.481	45.88±5.162	98,050±0.026
0,4	ND	ND	ND	97,312±0.335
0,2	ND	ND	ND	95,535±0.243
0,1	ND	ND	ND	84,515±9.358
0,08	ND	ND	ND	68,008±0.332
0,06	ND	ND	ND	58,760±0.407
0,04	ND	ND	ND	49,559±0.479
0,02	ND	ND	ND	27,295±0.959
0,01	ND	ND	ND	17,257±0.852

\* : Valeurs exprimées en (moyenne ± écartype). ND : non déterminé

**Tableau 25:** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits méthanoliques des différentes feuilles d'*Ammi visnaga* collectées durant trois périodes de croissance

<b>Pourcentages d'inhibition du radical DPPH %*</b>				
Concentrations (mg/ml)	Feuilles Av.	Feuilles Pl.	Feuilles F.	Acide ascorbique
10	56.925±0.983	67±3.154	52.05±1.202	ND
8	44.425±1.28	55.335±1.563	45.41±0.156	ND
6	39.065±0.601	48.895±1.322	39.4±1.556	ND
4	32.47±2.97	43.47±3.719	35.215±0.304	ND
2	29.91±2.517	28.045±0.601	28.98±00	ND
1	26.69±2.036	17.03±1.315	26.805±1.025	98,709±0.161
0,8	17.79±5.756	16.01±1.315	24.925±0.247	98,003±0.189
0,6	13.32±3.507	14.4±1.202	23.62±0.41	98,050±0.026
0,4	ND	ND	ND	97,312±0.335
0,2	ND	ND	ND	95,535±0.243
0,1	ND	ND	ND	84,515±9.358
0,08	ND	ND	ND	68,008±0.332
0,06	ND	ND	ND	58,760±0.407
0,04	ND	ND	ND	49,559±0.479
0,02	ND	ND	ND	27,295±0.959
0,01	ND	ND	ND	17,257±0.852

\* : Valeurs exprimées en (moyenne ± écartype). ND : non déterminé

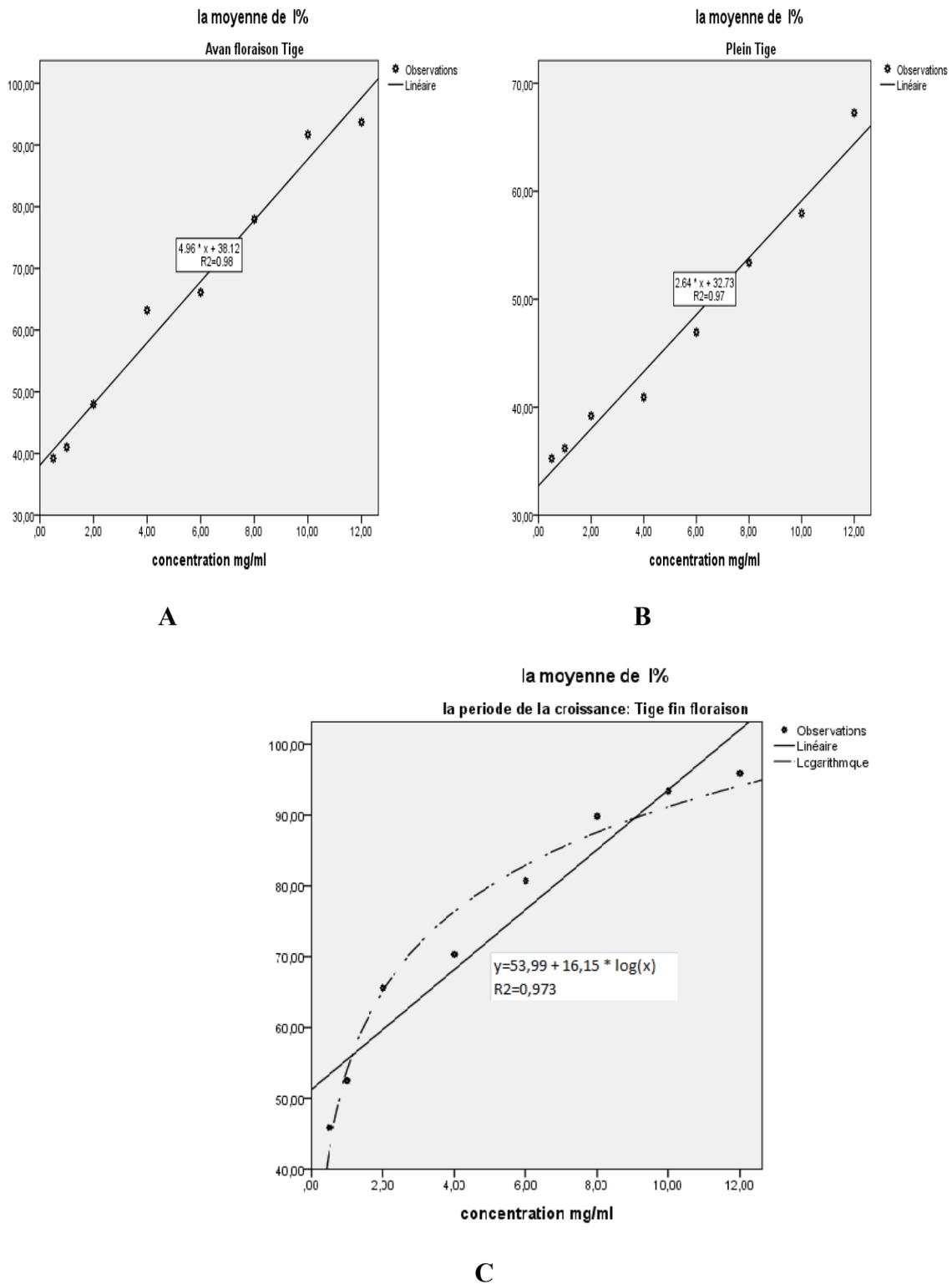
**Tableau 26:** Pourcentages d'inhibition du DPPH par l'extrait des fleurs et des graines d'*Ammi visnaga* L.

Pourcentages d'inhibition du radical DPPH %*			
Concentrations (mg/ml)	Fleurs	Graines	Acide ascorbique
10	58.87±1.937	73.92±1.824	ND
8	46.605±1.916	60.59±2.758	ND
6	43.215±5.028	51.605±1.563	ND
4	35.335±1.322	51.775±3.472	ND
2	30.585±0.12	49.4±2.998	ND
1	26.27±0.481	40.505±1.676	98,709±0.161
0,8	17.285±1.676	42.71±0.24	98,003±0.189
0,6	15.335±0.12	38.89±2.517	98,050±0.026
0,4	ND	ND	97,312±0.335
0,2	ND	ND	95,535±0.243
0,1	ND	ND	84,515±9.358
0,08	ND	ND	68,008±0.332
0,06	ND	ND	58,760±0.407
0,04	ND	ND	49,559±0.479
0,02	ND	ND	27,295±0.959
0,01	ND	ND	17,257±0.852

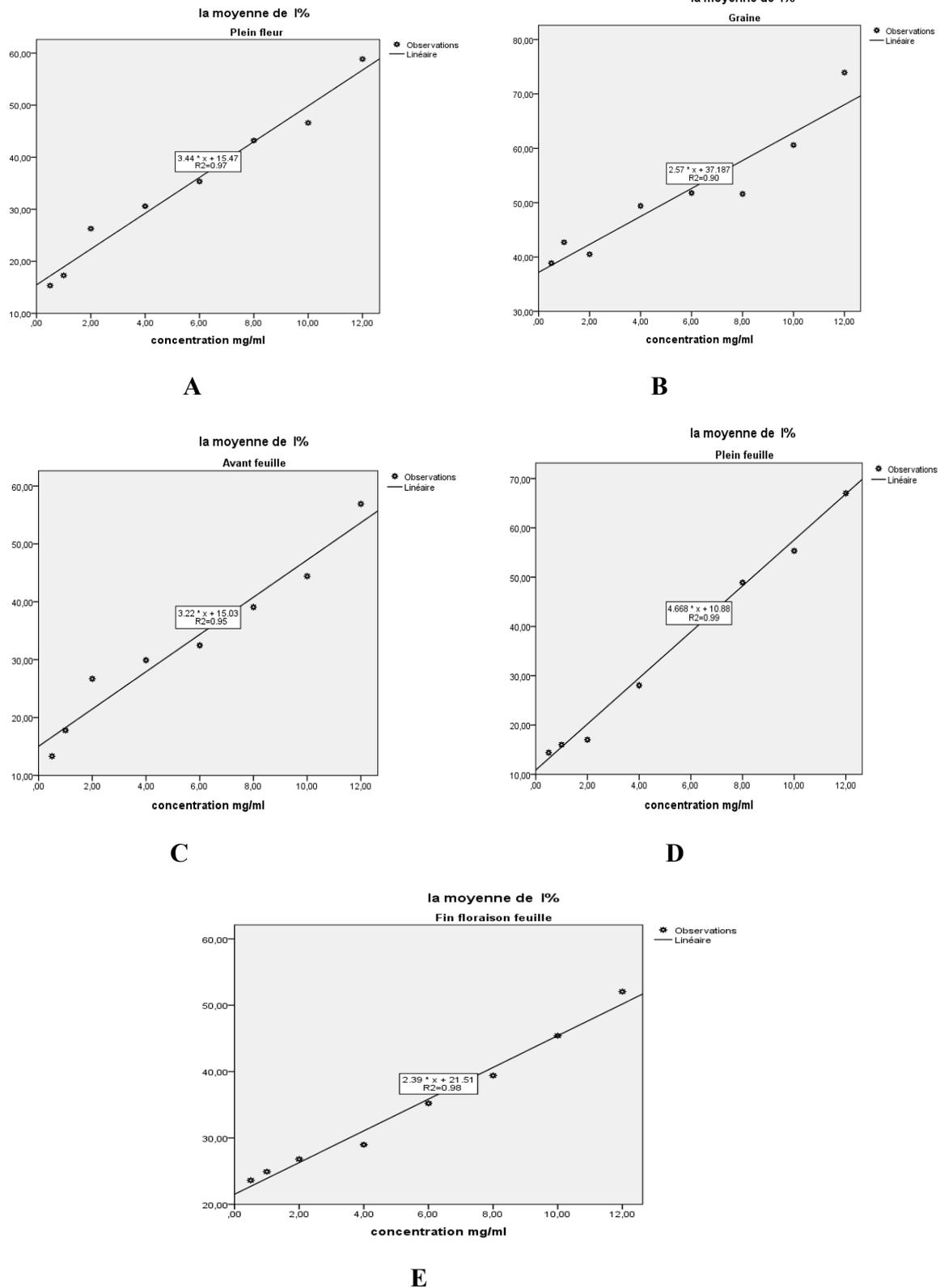
\* : Valeurs exprimées en (moyenne ± écartype). ND : non déterminé

**Tableau 27:** Valeurs d'IC<sub>50</sub> des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*

Les extraits	Valeurs des IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Valeurs des IC <sub>50</sub> de l'acide ascorbique (mg/ml)
Feuilles Av.	10.84	
Feuilles Pl.	8.38	
Feuilles F.	11.883	
Tiges Av.	2.395	<b>0.038</b>
Tiges Pl.	6.541	
Tiges F.	0.78	
Fleurs	10.037	
Graines	4.985	



**Fig.18** Piégeage du radical libre DPPH par les extraits des tiges d'*Ammi visnaga*:  
 A: tiges de la période d'avant floraison, B : tiges de la période de pleine floraison, C : tiges de la période de fructification



**Fig. 19** Piégeage du radical libre DPPH par les extraits d'*Ammi visnaga*:

A : l'extrait des fleurs, B : l'extrait des graines d'*Ammi visnaga* , C: extrait des feuilles de la période d'avant floraison, D: extrait des feuilles de la période de pleine floraison, E: extrait des feuilles de la période de fructification

D'après les figures 18 et 19, nous remarquons une augmentation proportionnelle des pourcentages d'activités de piégeage de radical libre DPPH avec l'augmentation des concentrations des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*.

Les différents extraits méthanoliques des tiges ainsi que l'extrait méthanolique des graines ont montré une grande activité antioxydante. Pour une concentration de 10 mg/ml d'extrait, nous avons constaté les pourcentages d'inhibition suivants (%)  $95.894 \pm 0.474$ ,  $93.7 \pm 0.141$ ,  $67.265 \pm 2.92$ , et  $73.92 \pm 1.824$  qui représentent respectivement dans l'ordre les extraits de tiges F., tiges Av., tiges PL. et graines.

D'après le tableau 24, nous avons noté que l'extrait de tige F. présente la valeur d'IC<sub>50</sub> la plus basse (0.781 mg/ml), mais cette dernière reste toujours inférieure à celle de l'acide ascorbique (0.038 mg/ml).

Donc, on peut classer les IC<sub>50</sub> des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* comme suit : IC<sub>50</sub> acide ascorbique > IC<sub>50</sub> tiges F. > IC<sub>50</sub> tiges Av. > IC<sub>50</sub> tiges PL. > IC<sub>50</sub> graines > IC<sub>50</sub> feuilles PL. > IC<sub>50</sub> fleurs > IC<sub>50</sub> feuilles Av. > feuilles F. Cette forte activité antioxydante de nos extraits méthanoliques peut être expliquée par la richesse de notre plante en polyphénols et en flavonoïdes. En effet, ces derniers sont considérés comme d'excellents donateurs d'hydrogène et inhibiteurs d'oxygène singulier et triplet. En raison de leurs structure chimique comportant un nombre important d'atomes d'hydrogènes, des groupement hydroxylés, des noyaux phényles qui seraient capable de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires (Calliste *et al.*, 2001, Torres de pinedo *et al.*, 2007, Wajdylo *et al.*, 2007).

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, car la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (Bourgou *et al.*, 2008). Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA (**p < 0,0000**) ont montré que l'activité antioxydante des extraits méthanoliques et celui de témoin était significatif (Annexe 6).

Beaucoup d'épices utilisées ont un effet antioxydant très fort, ce qui a été confirmé par les travaux de Madan *et al.* (2012). Les valeurs des IC<sub>50</sub> de leurs extraits méthanoliques sont représentées dans le tableau 28. Selon ce dernier, nous avons remarqué que l'activité antioxydante de nos graines (IC<sub>50</sub> = 4.985 mg/ml) est plus faible que celles des graines d'*Anethum graveolen*, *Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare* et *Trachyspermum ammi*.

**Tableau 28:** Comparaison entre des valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits extraits méthanoliques de quelques épices (*Ombellifereae*) (Shafaghat, 2011; Madan *et al.*, 2012 ).

Plantes	Valeurs des IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<i>Ammi visnaga</i> (graines)	4.985
<i>Anethum graveolens</i>	0.572
<i>Apium graveolens</i>	0.318
<i>Carum carvi</i>	0.046
<i>Coriandrum sativum</i>	0.021
<i>Cuminum cyminum</i>	0.112
<i>Foeniculum vulgare</i>	0.146
<i>Trachyspermum ammi</i>	0.084
<i>Levisticum persicum</i> Freyn et Bornm	0.095

### 5.2 Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>), donc la mesure de l'aptitude d'une huile essentielle ou d'un extrait à interagir avec les espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces derniers ainsi réduits deviennent plus stables.

#### a) Pouvoir réducteur des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

Les résultats du pouvoir réducteur des huiles essentielles étudiées et d'acide ascorbique exprimé par absorbance à 700 nm sont résumés dans le tableau 29 et les figures 20 et 21.

**Tableau 29:** Pouvoir réducteur des trois huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. et d'acide ascorbique.

Concentrations (mg/ml)	Absorbances à 700 nm*			
	HE Av.	HE Pl.	HE F.	Acide ascorbique
10	1,574±0.007	1,828±0.055	1,918±0.005	2,741±0.069
8	1,279±0.014	1,576±0.034	1,773±0.006	2,524±0.107
6	0,989±0.003	1,289±0.002	1,358±0.006	2,408±0.047
4	0,754±0.035	0,929±0.004	1,035±0.017	2,3835±0.08
2	0,662±0.023	0,607±0.007	0,862±0.004	2,263±0.054
1	0,459±0.004	0,41±0.002	0,645±0.003	2,11±0.014
0,5	0,342±0.025	0,321±0.002	0,508±0.01	1,93±0.042

\* : Absorbances exprimées en (moyenne ±écartype)

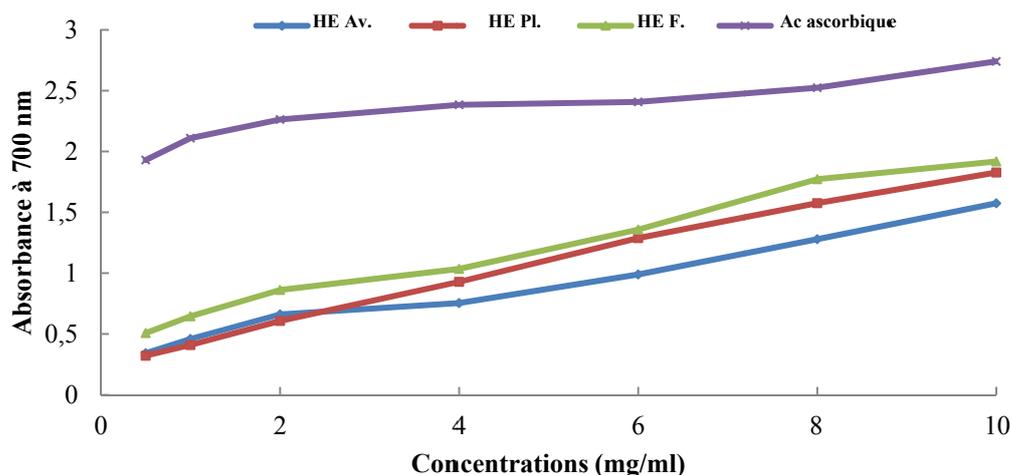


Fig.20 Pouvoir réducteur des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* et d'acide ascorbique

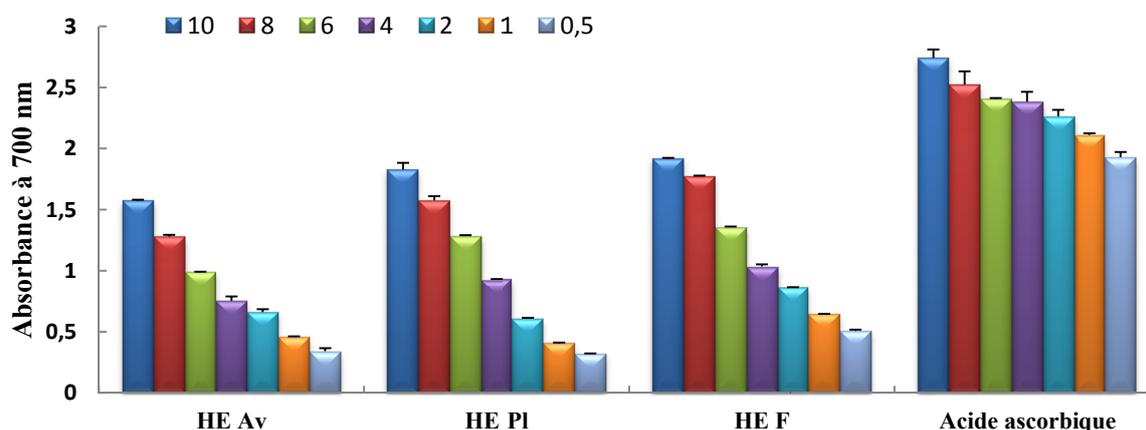


Fig. 21 Histogramme de pouvoir réducteur des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* et d'acide ascorbique à 700 nm

Selon la figure 20, nous constatons que les absorbances mesurées à 700 nm des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* et d'acide ascorbique augmentent proportionnellement avec l'augmentation des concentrations. Les capacités réductrices les plus élevées sont enregistrées par l'acide ascorbique suivi par l'HE F., l'HE Pl. et l'HE Av. Toute fois, le pouvoir réducteur de nos huiles essentielles est inférieur à celui de l'acide ascorbique mais reste assez important, cela peut être expliqué par la teneur considérable de nos huiles en linalool. Selon Yang et *al.* (2008), la capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA ( $p < 0,0000$ ) ont montré que l'effet de pouvoir réducteur des huiles essentielles et celui de témoin était significatif (Annexe 6).

**b) Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga***

Les résultats du pouvoir réducteur des huit extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* comparés à celui de l'acide ascorbique sont résumés dans les tableaux 30, 31 et 32 et figures 22 et 23.

**Tableau 30:** Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des feuilles (F) d'*Ammi visnaga* collectées durant différentes périodes de croissance.

Concentrations (mg/ml)	Absorbances à 700 nm*			
	F Av.	F Pl.	F F.	Acide ascorbique
10	0.171±0.015	0.287±0.007	0.148±0.017	2,741±0.069
8	0.166±0.017	0.256±0.008	0.111±0.005	2,524±0.107
6	0,138±0.001	0.201±0.001	0.086±0.02	2,408±0.047
4	0,106±0.03	0,094±0.004	0.045±0.002	2,3835±0.08
2	0,077±0.047	0,058±0.001	0,035±0.002	2,263±0.054
1	0,057±0.029	0,051±0.00	0,034±0.003	2,11±0.014
0,5	0,04±0.014	0,031±0.001	0,022±0.001	1,93±0.042

\* : Absorbances exprimées en (moyenne ± écartype)

**Tableau 31:** Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des tiges (T) d'*Ammi visnaga* collectées durant différentes périodes de croissance

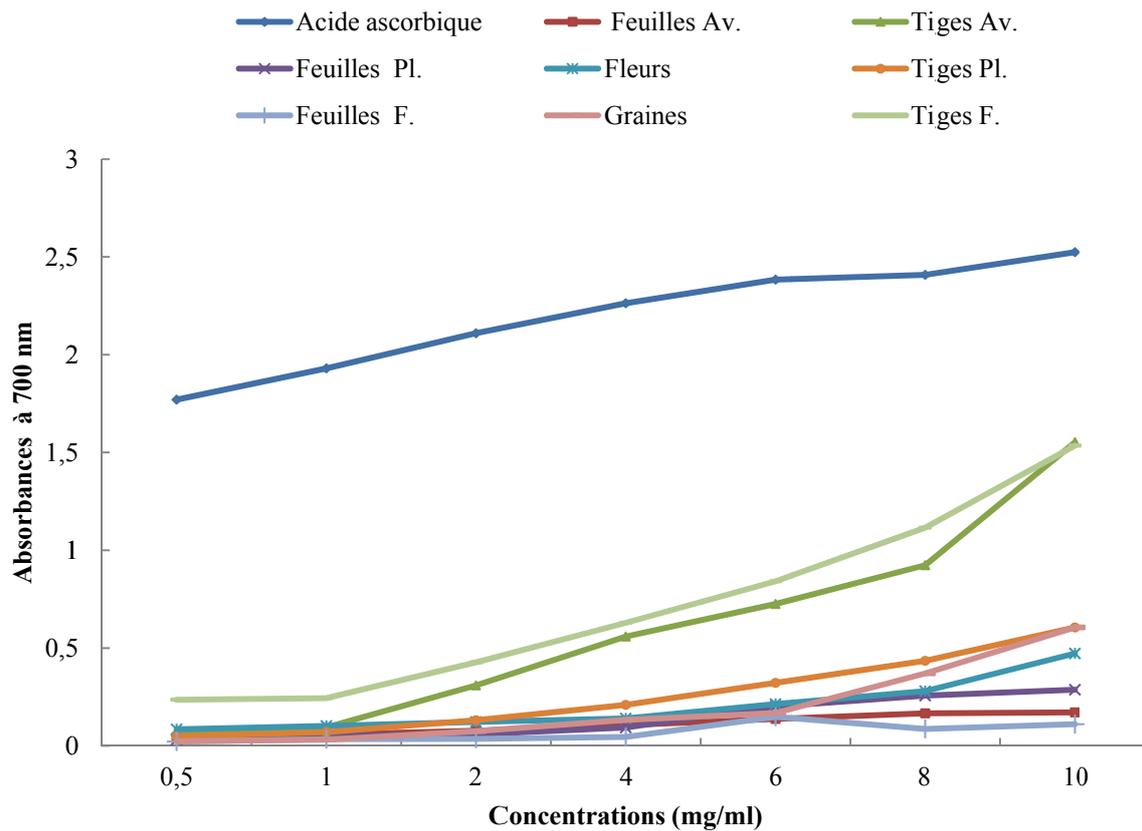
Concentrations (mg/ml)	Absorbances à 700nm*			
	T Av.	T Pl.	T F.	Acide ascorbique
10	1,535±0.033	0.44±0.055	1,554±0.057	2,741±0.069
8	0.924±0.001	0.282±0.013	1.115±0.016	2,524±0.107
6	0,725±0.011	0.241±0.011	0.841±0.001	2,408±0.047
4	0,558±0.037	0,121±0.008	0.629±0.007	2,3835±0.08
2	0,309±0.068	0,098±0.00	0,457±0.015	2,263±0.054
1	0,094±0.005	0,031±0.013	0,244±0.00	2,11±0.014
0,5	0,056±0.015	0,014±0.002	0,235±0.005	1,93±0.042

\* : Absorbances exprimées en (moyenne ± écartype)

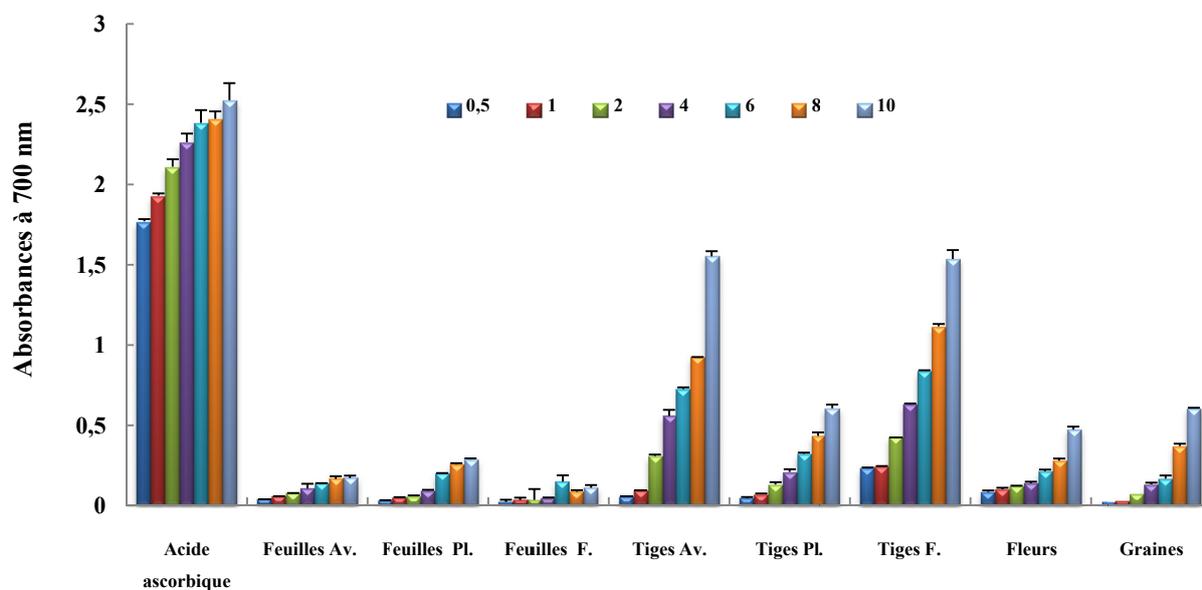
**Tableau 32:** Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des fleurs et des graines d'*Ammi visnaga* L.

Concentrations (mg/ml)	Absorbances à 700 nm*		
	Fleurs	Graines	Acide ascorbique
10	0.473±0.023	0.605±0.004	2,741±0.069
8	0.28±0.021	0.37±0.015	2,524±0.107
6	0.214±0.007	0,168±0.02	2,408±0.047
4	0,14±0.016	0,133±0.01	2,3835±0.08
2	0,122±0.009	0,074±0.002	2,263±0.054
1	0,102±0.018	0,031±0.012	2,11±0.014
0,5	0,085±00	0,023±0.009	1,93±0.042

\* : Absorbances exprimées en (moyenne ± écartype)



**Fig.22** Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* et d'acide ascorbique



**Fig. 23** Histogramme des absorbances des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L. et de l'acide ascorbique obtenues à 700 nm

D'après la figure 22, nous constatons que l'absorbance des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* et de l'acide ascorbique augmente proportionnellement avec l'augmentation des concentrations.

D'après, les résultats mentionnés dans le tableau 31, nous avons noté que l'absorbance la plus élevée est celle de l'extrait des tiges de la période de fructification (DO:1,554) à une concentration égale à 10mg/ml.

Cette absorbance est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique qui égale à 2.79 pour une concentration égale à 10 mg/ml. Selon Huang *et al.* (2005), une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur.

Donc, on peut classer le pouvoir réducteur des différentes parties testées comme suit: acide ascorbique > tiges F.> tiges Av.> graines > fleurs > tiges Pl. > feuilles Pl. > feuilles Av.> feuilles F.

Nous remarquons ainsi, que les capacités réductrices des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* correspondent aux différentes parties de cette plante collectées durant différentes périodes qui sont nettement inférieures que celles enregistrées par les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*, ce qui est en accord avec les résultats cités auparavant pour le test du piégeage du radical libre DPPH.

Selon Jeong *et al.* (2004), le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

De plus, l'intensité réductrice de nos extraits est en corrélation avec leurs teneurs en flavonoïdes et en polyphénols totaux.

On constate donc que le pouvoir réducteur est probablement dû à la présence du groupement hydroxyle dans les composés phénoliques et les flavonoïdes qui peuvent servir comme donneurs d'électrons.

Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA ( $p < 0,0000$ ) ont montré que l'effet de pouvoir réducteur des extraits méthanoliques et celui de témoin était significatif (Annexe 6).

## 6 Activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques

L'activité antimicrobienne de nos échantillons (huile essentielle et extraits méthanoliques) a été évaluée qualitativement et quantitativement.

### 6.1 Etude qualitative de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos échantillons a été faite sur douze souches bactériennes, six souches de levures et 8 souches fongiques.

#### a) Activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Le pouvoir antimicrobien est déterminé en mesurant le diamètre des zones d'inhibition (mm) obtenu pour chaque espèce bactérienne. Alors que, l'activité antifongique a été déterminée par la méthode de contact direct. Les résultats obtenus sont regroupés respectivement dans les tableaux 33 et 34.

Selon les résultats observés dans les tableaux 33 et 34, nous avons noté que les différentes bactéries (Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup>) et champignons étaient sensibles à l'action des huiles essentielles, alors que les levures demeuraient résistantes à ces mêmes huiles.

Ces trois dernières ont exercé un pouvoir antimicrobien intéressant contre les bactéries suivantes *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Salmonella sp.* et *Serratia sp.* (Photo 7).

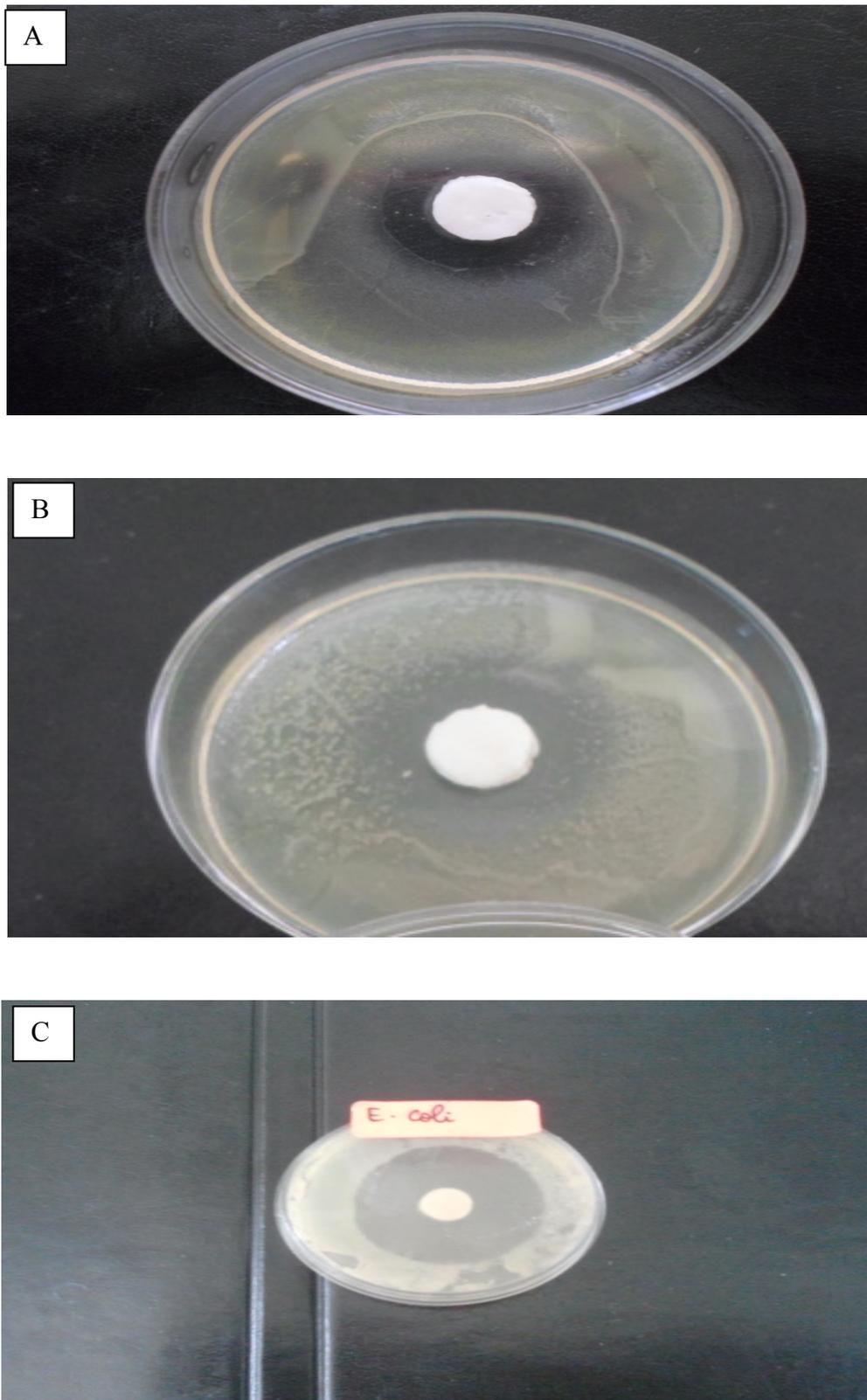
Une très bonne activité antifongique des trois huiles essentielles a été aussi observée dont une inhibition totale des champignons *Thielaviopsis sp.* et *Monellia sp.* par les trois différentes doses appliquées de l'huile essentielle de la période de fructification. Cette huile a ainsi inhibé 100 % de la croissance des deux autres champignons *Aspergillus niger* et *Geotrichum sp.* à une dose égale à 70µl.

Cependant, à une dose de 70µl, l'huile essentielle de la période de pleine floraison a provoqué une inhibition totale de la croissance (100 %) des champignons *Geotrichum sp.* (Photo 8A), *Phoma sp.*, *Thielaviopsis sp.* et *Monellia sp.*

**Tableau 33:** Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

Bactéries	Diamètres des zones d'inhibition (mm)*		
	HE Av.	HE Pl.	HE F.
<i>Escherichia coli</i>	<b>27±2,83</b>	<b>30±2,83</b>	<b>32±00</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>20±5,66</b>	<b>16±1,41</b>	<b>20±2,83</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>+</sup>	12±00	15±00	16±4,24
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>-</sup>	10±2,83	12±00	13±2,65
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17±2,65	14±2,83	20±3,46
<i>Proteus mirabilis</i>	11±3,61	15±3,61	13±4,24
<i>Bacillus subtilis</i>	<b>31±3,61</b>	<b>18±4,24</b>	<b>21±4</b>
<i>Salmonella sp.</i>	<b>20±1,73</b>	<b>18±3,64</b>	<b>30±2</b>
<i>Salmonella</i> H <sub>2</sub> S (+)	<b>20±4</b>	<b>20±00</b>	<b>22±4</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	14,67±4,16	17,33±1,53	18±00
<i>Enterobacter aerogenes</i>	18±2,65	20,33±5,13	22,67±3,06
<i>Serratia sp.</i>	<b>30±00</b>	<b>30,5±0,71</b>	<b>34±2,83</b>

\* : Diamètres d'inhibitions exprimées en (moyenne ± écartype)



**Photo 7.** Sensibilité de quelques bactéries vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

A : Sensibilité de *Serratia sp.* vis-à-vis HE Av. d'*Ammi visnaga* L.

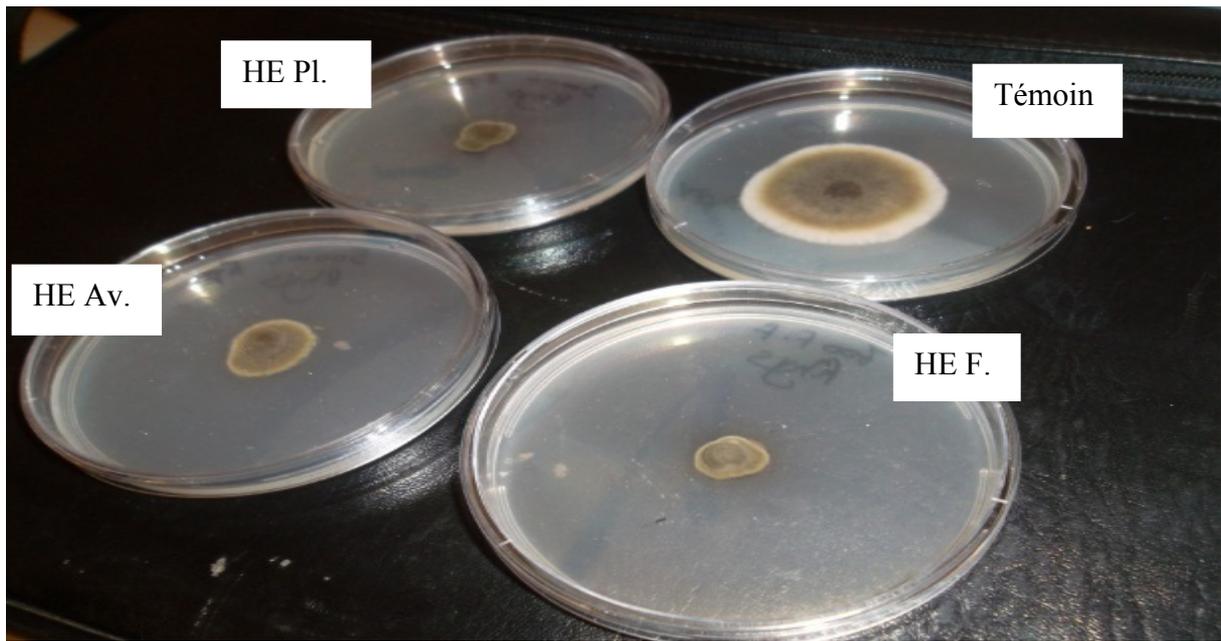
B : Sensibilité de *Salmonella sp.* vis-à-vis HE F. d'*Ammi visnaga* L.

C : Sensibilité de *Escherichia coli* vis-à-vis HE F. d'*Ammi visnaga* L.

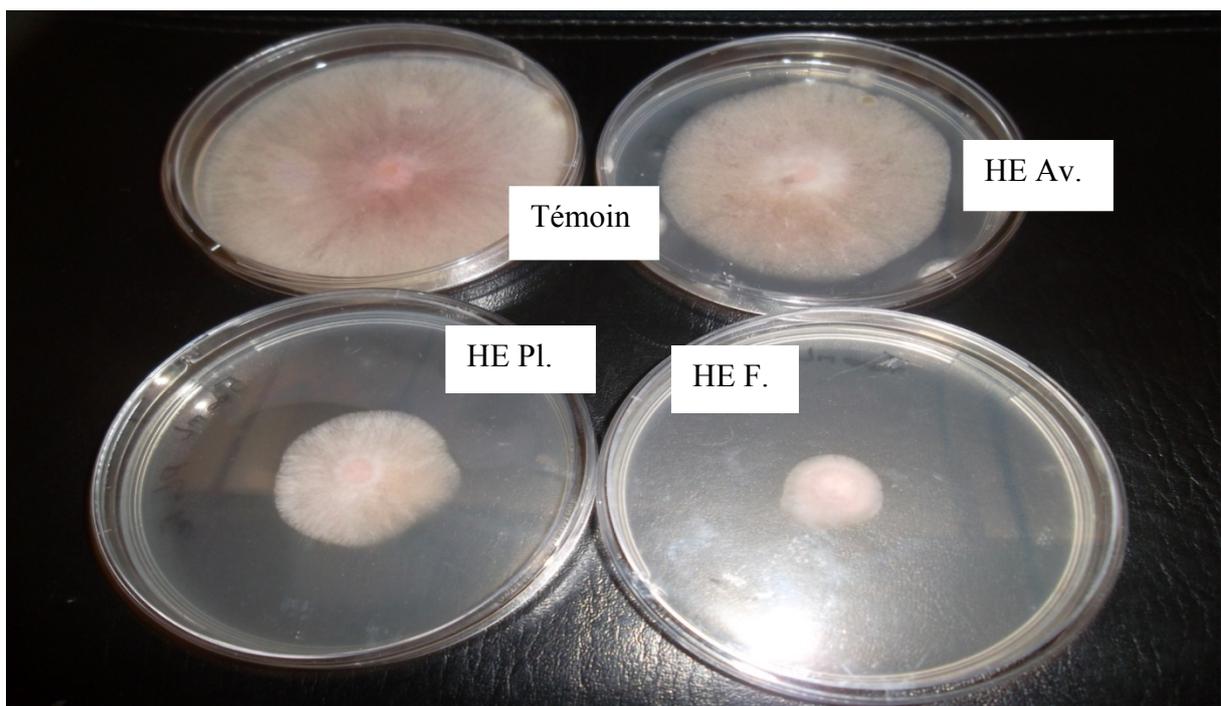
**Tableau 34:** Activité antifongique des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

Levures		Diamètres des zones d'inhibition (mm)*								
		HE Av.			HE Av.			HE Av.		
<i>Candida albicans</i> (prélèvement d'angle)		4±1,73			5±1			5±2		
<i>Candida albicans</i> (prélèvement d'urine)		3±1			5±1			6±1		
<i>Candida albicans</i> (prélèvement vaginal)		4±1			5±1			7±2		
<i>Candida tropicalis</i> (prélèvement d'urine)		4±1			2±1			6±1,73		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		00±00			00±00			00±00		
<i>Saccharomyces bulgari</i>		5,33±0,58			8±1			6,67±0,58		
Champignons	Temps (h)	Pourcentages d'inhibitions des champignons (%)								
		HE Av.			HE Pl.			HE F.		
		Doses (µL)								
		30	50	70	30	50	70	30	50	70
<i>Geotrichum sp.</i>	48	15	30	40	65	100	100	50	60	100
	96	56.	65.9	71.5	72.7	100	100	68.1	72.7	100
<i>Fusarium sp.</i>	48	25	20	37.5	40	77.5	100	25	47.5	62.5
	96	25.8	29.41	44.7	55.2	84.7	95.2	24.7	49.4	64.7
<i>Rhizoctonia solani</i>	48	5	15	20	65	100	100	50	60	70
	96	33.3	44.44	55.5	62.2	24.4	84.4	57.7	66.6	71.1
<i>Phoma sp.</i>	48	17.6	29.41	47.05	58.88	100	100	17.64	35.29	52.94
	96	44.44	50	62.5	12.5	29.16	100	31.25	33.33	54.16
<i>Aspergillus niger</i>	48	00	00	15	20	30	45	100	100	100
	96	9.37	12.5	34.37	40.62	43.75	65.62	53.12	100	100
<i>Thielaviopsis sp.</i>	48	13.63	22.72	45.45	27.27	45.45	100	100	100	100
	96	6.89	22.41	58.62	13.63	34.48	100	100	100	100
<i>Monellia sp.</i>	48	15.78	00	21.05	15.78	26.31	100	100	100	100
	96	14.28	20	40	40	54.28	100	100	100	100

\*: Diamètres d'inhibitions exprimées en (moyenne ± écartype)



A



B

**Photo 8.** Sensibilité de quelques champignons vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

A : Sensibilité de *Geotricum sp.* vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (D =30 $\mu$ l) après 48h.

B : Sensibilité de *Phoma sp.* vis-à-vis les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (D =30 $\mu$ l) après 96h.

Une inhibition relative de tous les champignons testés par l'huile essentielle d'avant floraison a été observée avec les différentes doses appliquées, cependant, cette inhibition reste toujours négligeable en comparaison avec l'inhibition de l'huile essentielle issue de la plante en période de fructification et l'huile essentielle issue de la période de pleine floraison. Donc, l'huile essentielle de la période de fructification et celle de la période de pleine floraison étaient les plus efficaces.

Par ailleurs, d'après les résultats de tableau 33, nous remarquons que les bactéries à Gram-négative (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Klebsiella pneumoniae*) sauf *Proteus mirabilis* sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram-positives (*Staphylococcus aureus* MRS<sup>+</sup> et *S. aureus* MRS<sup>-</sup>), ces observations n'ont pas été rapportées par la littérature (Smith-Palmer *et al.*, 1998; Dorman et Deans, 2000; Suppakul *et al.*, 2003). De plus, nos trois huiles essentielles ont montré un meilleur pouvoir antibactérien vis à vis *Escherichia coli* ATCC25922, résultats déjà mentionnés par Khalfallah *et al.* (2011) et Satrani *et al.* (2004).

Ces auteurs affirment l'existence d'un grand pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* vis-à-vis *Escherichia coli* et l'inverse a été observé chez *Staphylococcus aureus*. De plus, Charai *et al.* (1996) ont démontré que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont plus résistants que *Escherichia coli* à l'inhibition par les huiles essentielles d'*Origanum compactum*, riche en carvacrol (50 %) et en p-cymène (21 %) et d'*Origanum majorana*, riche en linalool (33 %) et en terpinène-4-ol (22 %).

La même constatation a été faite par Limberger *et al.* (2001) qui ont indiqué que *Escherichia coli* est plus sensible que *Staphylococcus aureus* à l'inhibition par l'huile essentielle des feuilles de *Blepharocalyx salicifolius* dont les composés majeurs sont le 1,8 cineole (25,2 %), le linalool (20,4 %) et la P-caryophylène (22,9 %). Ces résultats diffèrent de ce qui a été avancé par d'autres auteurs sur la plus grande sensibilité de *Staphylococcus aureus* par rapport à *Escherichia coli* vis-à-vis de plusieurs huiles essentielles (Hajji *et al.*, 1993; Tantaoui - Elaraki *et al.*, 1993).

Par ailleurs, notons que les parois des microorganismes procaryotes contiennent des glycopeptides absents chez les eucaryotes. Cependant, la paroi cellulosique de ces derniers est composée de chitine, cellulose et d'autres polymères de sucres qui assurent sa rigidité.

D'après Suppakul *et al.* (2003), décrivant le mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries, le premier site d'action est la paroi bactérienne, les bactéries à Gram positives sont plus résistantes à l'action des huiles essentielles que les bactéries à Gram négative à cause des différences de composition dans leurs paroi.

En plus, le mode d'action des huiles essentielles est en relation avec sa constitution en molécules bioactives, elles agissent comme solvant de dissolution. L'analyse chimique de nos huiles essentielles par CPG/SM a prouvé leurs richesse en linalool et verticiol, ceci explique leurs grande réactivité, car le mécanisme antibactérien lié à la présence de linalool surtout, est lié à la forte solubilité des huiles essentielles et leurs capacité à pénétrer les parois (Suppakul *et al.*, 2003).

Autant qu'un composé typiquement liposoluble, les huiles essentielles traversent les obstacles pariétales et cytoplasmiques d'où l'activité cytotoxique liée à l'éruption de la structure des différents polysaccharides, acides gras et phospholipides, due au mécanisme d'action à multiple cibles en même temps (Betoni *et al.*, 2006).

Donc, il apparait que le linalool à la capacité de jouer le rôle d'agent dénaturant de protéines ou bien comme un solvant déshydratant ce qui engendre sa capacité antimicrobienne (Pelczar *et al.*, 1993).

D'après Stefan *et al.* (2013), l'activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles peut être jugé selon leur pourcentage en linalool qui est un monoterpène oxygéné connu pour son importante activité antioxydante, antimicrobienne et antifongique (Queiroga *et al.*, 2007 et Boulogne *et al.*, 2012).

Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA ( $p < 0,001$ ) ont montré que l'effet des huiles essentielles était significatif pour toute les souches bactériennes et levures testées (Annexe 7).

#### **b) Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques**

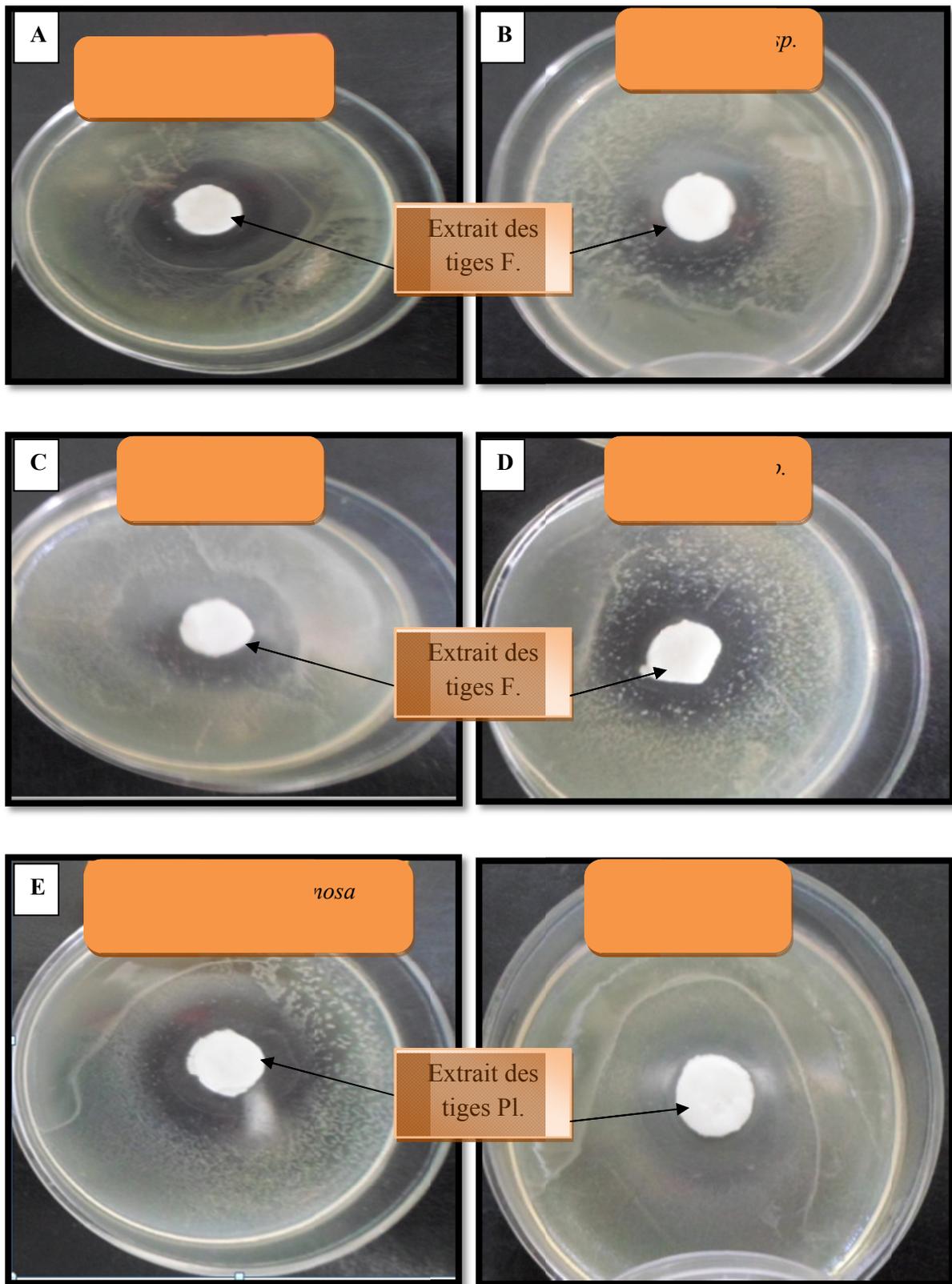
L'activité antimicrobienne des différents extraits d'*Ammi visnaga* L. a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Le pouvoir antimicrobien est déterminé en mesurant les diamètres d'inhibitions (mm) de chaque bactérie ou levures vis-à-vis le produit testé (Photo 9 et 10). Alors que, l'activité antifongique a été déterminée par la méthode du contact direct (photo 11), les diamètres de croissance fongique (mm) ont été utilisés pour le calcul des pourcentages d'inhibition de mycélium. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 35, 36 et 37.

**Tableau 35:** Activité antibactérienne des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L.

Souches	Diamètres d'inhibitions (mm)*							
	Extraits méthanoliques (E)							
	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	E <sub>7</sub>	E <sub>8</sub>
<i>Escherichia coli</i>	13.33± 1.52	17.33± 0.57	15.33± 4.04	14± 5.19	15±1	15.66± 1.52	16.66± 2.82	14.66± 0.57
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14±1	16.33± 4.61	13.66± 1.15	12.66± 0.57	18.33± 6.65	18± 4.35	12.66± 2.08	12±1
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>+</sup>	12±00	16±00	16±00	9±00	17±00	19±00	20±00	20±00
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>-</sup>	11±00	14± 2.64	14.66± 0.57	7.33± 6.42	14.66± 3.21	16±1	17.66± 2.08	18± 5.19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15.66± 0.57	17±10	14.33± 0.57	22.33± 1.52	16.33± 0.57	15.66± 2.51	17±1.73	11.33± 4.93
<i>Proteus mirabilis</i>	16±00	16±00	17.33± 1.15	16.66± 0.57	17.66± 0.57	16.66± 1.52	15.33± 0.57	16±1.73
<i>Bacillus subtilis</i>	14.66± 0.57	00±00	8±6.92	00±00	18± 2.64	4.33± 7.5	13.66± 0.57	8.66± 7.57
<i>Salmonella sp.</i>	20±6.08	17± 2.64	20.33± 2.51	21±10	16±10	23.33± 4.16	17.66± 3.05	24.66± 2.3
<i>Salmonella</i> H <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	20±00	19.66± 0.58	15.66± 0.58	19±10	18.33± 0.58	23.66± 1.53	21.33± 1.15	20.33± 1.53
<i>Enterococcus faecium</i>	13.66± 3.05	14±10	13±10	14.33± 1.52	13.33± 2.08	15.66± 3.21	13.33± 1.15	12.66± 0.57
<i>Enterobacter aerogenes</i>	23±1.73	17.33± 0.58	21±10	20±20	26± 3.61	18±00	21±10	25±00
<i>Serratia sp.</i>	23.66± 1.15	16.33± 1.15	17±10	17.33± 2.08	18±20	17± 1.73	15.66± 1.15	20±20

\* : Diamètres d'inhibitions exprimées en (moyenne ±écartype)

Avec: E<sub>1</sub> :feuilles Av., E<sub>2</sub> : tiges Av., E<sub>3</sub> : feuilles Pl., E<sub>4</sub> : fleurs, E<sub>5</sub> : tiges Pl., E<sub>6</sub> : feuilles F., E<sub>7</sub> : graines, E<sub>8</sub> : tiges F.



**Photo 9.** Sensibilité de quelques bactéries vis-à-vis quelques extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*

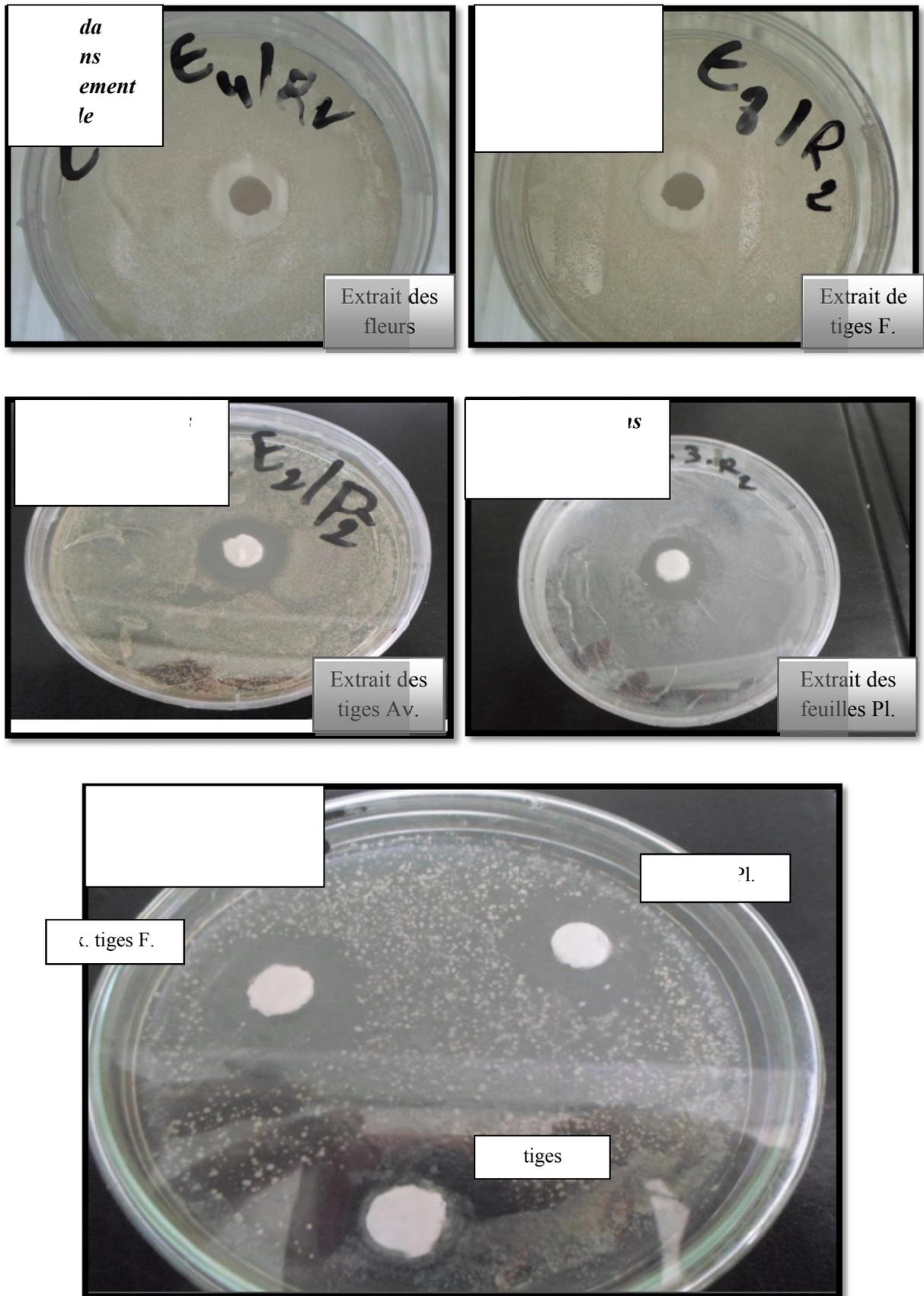
**Tableau 36:** Effet des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L. sur les levures

Levures	Diamètres d'inhibitions (mm)*							
	Extraits méthanoliques (E)							
	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	E <sub>7</sub>	E <sub>8</sub>
<i>Candida albicans</i> (prélèvement d'angle)	11±9.30	19.66±0.57	19±10	19±2.64	12.33±11.5	19±10	16±1.70	17.66±2.08
<i>Candida albicans</i> (prélèvement d'urine)	22.33±4.50	20.33±1.15	20.66±2.08	18.33±3.05	18.66±3.21	12.33±10.8	19±1.70	17.33±0.57
<i>Candida albicans</i> (prélèvement vaginal)	24.33±3.5	21±2.5	18.33±3	15±10	19±10	14±2.5	21±10	19.33±2
<i>Candida tropicalis</i> (prélèvement d'urine)	18.33±1.52	18.33±4.93	19.33±1.15	17±10	15±3.6	16.33±3.51	17.66±2.88	18±2.64
<i>Saccharomyces bulgari</i>	17±2.30	5±8.60	00±00	19±1.73	14.33±2.3	00±00	00±00	15.66±1.15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20±02	24±00	30±00	21.66±2.88	26±3.6	25.33±2.88	22±00	20.66±1.15

\* : Diamètres d'inhibitions exprimées en (moyenne ±écartype)

Avec:

E<sub>1</sub> : Feuilles Av., E<sub>2</sub> : Tiges Av., E<sub>3</sub> : Feuilles Pl., E<sub>4</sub> : Fleurs, E<sub>5</sub> : Tiges Pl., E<sub>6</sub> : Feuilles F., E<sub>7</sub> : Graines,  
 E<sub>8</sub> : Tiges F.



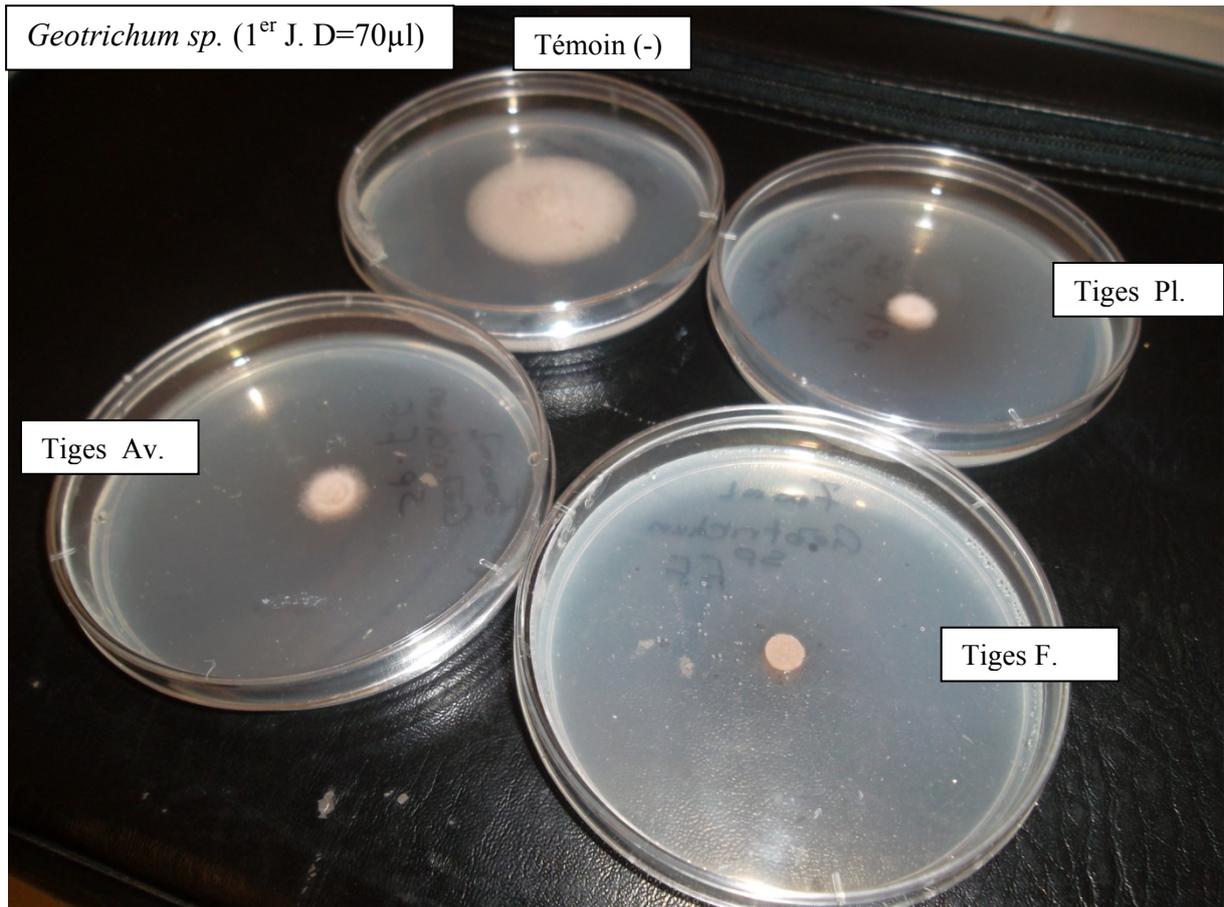
**Photo 10.** Sensibilité de quelques levures vis-à-vis quelques extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*

Tableau 37: Activité antifongique des différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L.

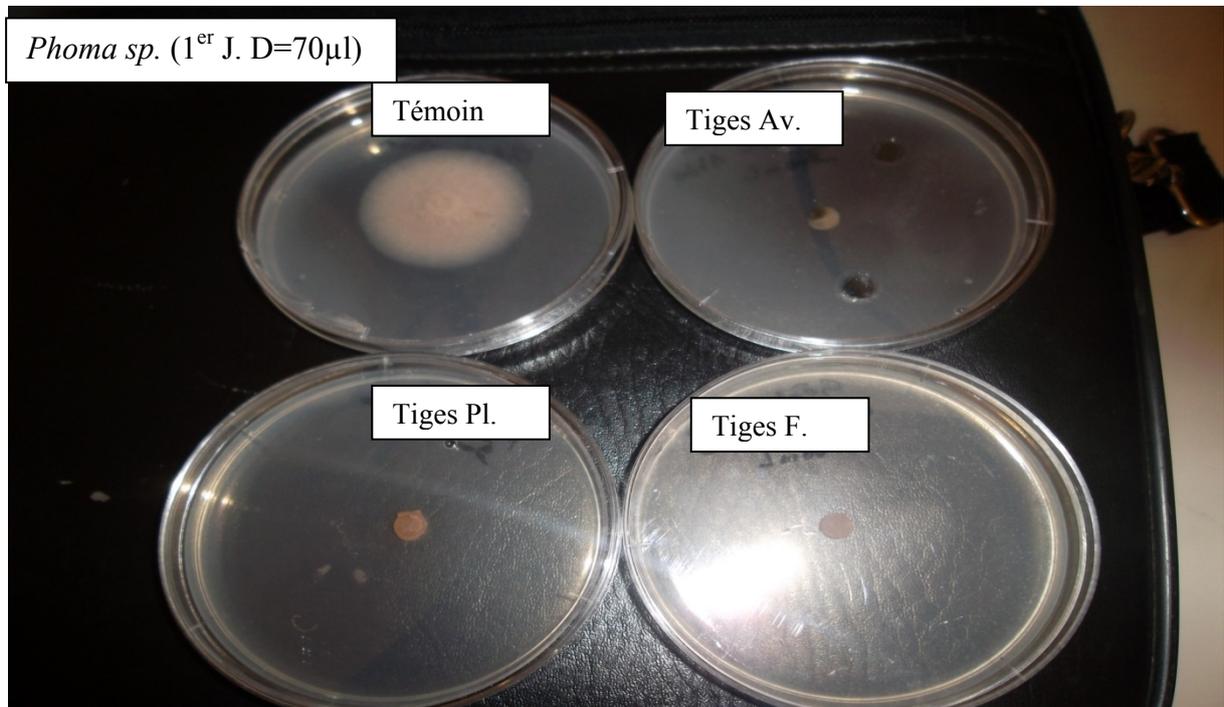
Moisissures		Pourcentages d'inhibition (%)								
		Doses	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	E <sub>7</sub>	E <sub>8</sub>
<i>Aspergillus niger</i>	1 <sup>er</sup> Jr	D1	85	100	100	100	100	70	85	70
		D2	78.75	62.5	100	100	72.5	67.5	67.5	60
		D3	50	62.5	100	100	65	50	65	55
	4 <sup>eme</sup> Jr	D1	70	100	100	100	100	75	77.5	62.5
		D2	62.5	62.5	100	100	78.75	56.25	72.5	56.25
		D3	43.75	60	100	100	62.5	25	62.5	37.5
<i>Thielaviopsis sp.</i>	1 <sup>er</sup> Jr	D1	100	100	100	100	86.25	86.25	100	71.66
		D2	100	100	80	100	81.25	83.75	100	66.25
		D3	100	100	56.25	100	77.5	68.75	100	60
	4 <sup>eme</sup> Jr	D1	100	100	100	100	86.25	86.25	100	71.66
		D2	100	100	80	100	81.25	83.75	100	66.25
		D3	100	100	56.25	100	77.5	68.75	100	60
<i>Geotrichum sp.</i>	1 <sup>er</sup> Jr	D1	100	100	60	71.42	100	66.66	100	100
		D2	60	59.18	50.90	65.45	55.55	60	100	55.55
		D3	51.11	52.72	38.77	33.33	36	31.11	33.33	44.44
	4 <sup>eme</sup> Jr	D1	68.33	71.66	54.54	66.66	71.66	68.33	76.66	78.33
		D2	52	52.38	47.61	62.22	53.33	61.66	71.66	70
		D3	46.03	47.61	38.23	27.94	31.66	25	55	61.66
<i>Phoma sp.</i>	1 <sup>er</sup> Jr	D1	73.33	100	57.77	100	100	100	100	100
		D2	64.91	100	51.11	100	100	100	35.71	100
		D3	56.14	100	35.08	100	100	100	22.22	100
	4 <sup>eme</sup> Jr	D1	40	53.33	43.75	100	100	100	100	100
		D2	33.33	20	25	100	100	100	26.66	100
		D3	13.33	13.33	04	100	100	100	7.14	100
<i>Monellia sp.</i>	1 <sup>er</sup> Jr	D1	100	100	60	100	100	100	100	65
		D2	100	100	60	55	60	55	25	60
		D3	25	100	65	60	65	20	15	55
	4 <sup>eme</sup> Jr	D1	100	72.5	62.5	72.5	72.5	100	100	72.5
		D2	42.5	70	37.5	52.5	60	65	50	65
		D3	30	60	10	50	52.5	35	35	57.5
<i>Fusarium sp.</i>	1 <sup>er</sup> Jr	D1	100	71.11	60	66.66	71.11	100	86.66	68.88
		D2	46.66	68.88	35.55	53.33	62.22	64.44	53.33	57.77
		D3	35.55	62.22	11.11	51.11	55.55	37.77	55.55	55.55
	4 <sup>eme</sup> Jr	D1	100	69.09	63.63	60	69.09	81.81	80	67.27
		D2	49.09	63.63	65.45	54.54	63.63	63.63	54.54	60
		D3	45.45	60	27.27	47.27	36.36	36.36	45.45	30.9
<i>Rhizoctonia solani</i>	1 <sup>er</sup> Jr	D1	59.57	63.82	42.55	57.44	63.82	59.57	70.21	72.34
		D2	36.17	38.29	31.91	53.19	40.42	51.06	63.82	61.7
		D3	29.78	36.17	21.27	10.63	12.76	29.78	42.55	51.06
	4 <sup>eme</sup> Jr	D1	58.82	63.23	48.52	61.76	64.7	57.35	63.23	66.17
		D2	47.05	48.52	42.64	54.41	47.05	55.88	58.82	63.23
		D3	39.7	44.11	32.35	73.26	29.41	38.23	48.52	55.88

\* : Pourcentages d'inhibitions exprimées en (moyenne)

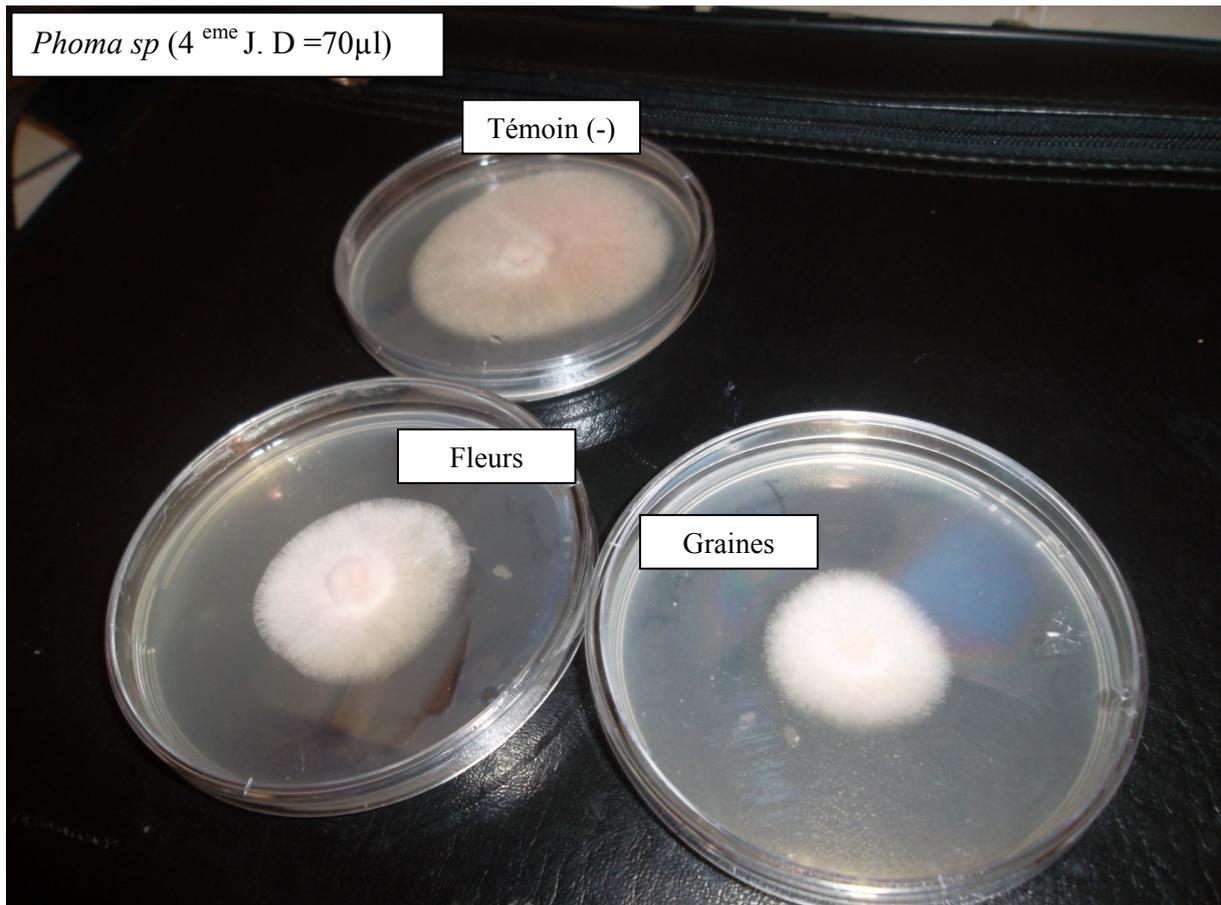
E<sub>1</sub> : Feuilles Av., E<sub>2</sub> : Tiges Av., E<sub>3</sub> : Feuilles Pl., E<sub>4</sub> : Fleurs, E<sub>5</sub> : Tiges Pl., E<sub>6</sub> : Feuilles F., E<sub>7</sub> : Graines, E<sub>8</sub> : Tiges F.  
 1 . T : Témoin négatif. D<sub>1</sub> : Dose égale à 30µl, D<sub>2</sub> : Dose égale à 50µl, D<sub>3</sub> : Dose égale à 70µl



-A-



-B-



-C-

**Photo 11.** Sensibilité de quelques champignons vis-à-vis quelques extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*

D'après l'échelle citée par Duraffourd *et al.* (1997), les résultats obtenus (Tab. 35) nous laisse penser que dans le cas des bactéries, les différents extraits méthanoliques des différentes parties aériennes de la plante *Ammi visnaga* L. présentent une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis la majorité des bactéries testées. Cependant, cette sensibilité diffère d'une bactérie à une autre, la plus grande sensibilité a été observée chez les bactéries Gram <sup>-</sup> dont le plus grand diamètre d'inhibition enregistré par la bactérie *Enterobacter aerogenes* (26 mm) vis-à-vis l'extrait des tiges Pl., suivi par les espèces du genre *Salmonella* (sp. et H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>) puis *Serratia sp.*

Une activité antimicrobienne moyennement forte des extraits méthanoliques des différentes parties aérienne d'*Ammi visnaga* a été remarquée chez les genres bactériens *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Serratia sp.* Cependant, les bactéries Gram <sup>+</sup> telle que *Bacillus subtilis* montre une résistance importante

vis à vis des cinq extraits : tige Av., feuilles Pl., fleurs, feuilles F. et tige F. D'autres résistances ont été enregistrées par l'espèce *Staphylococcus aureus* MRS<sup>+</sup> et MRS<sup>-</sup> quand elles ont été confrontées à l'extrait des fleurs, alors qu'une activité limitée a été observée vis-à-vis les extraits restant. Ainsi, une activité inhibitrice limitée des différents extraits testés a été enregistrée chez l'espèce *Enterococcus faecium*. Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA ( $p < 0,0000$ ) ont montré que l'effet des extraits polyphénoliques et celui de témoin était significatif pour toutes les souches bactériennes testées (Annexe 7).

Toutefois, dans le cas des levures, celles-ci ont montré une sensibilité remarquable vis-à-vis la majorité des extraits méthanoliques (Tab. 36). La plus grande sensibilité a été notée chez *Saccharomyces cerevisiae* et ceci avec tous les extraits testés sauf l'extrait des feuilles d'avant floraison. Cependant, *Saccharomyces bulgari* a montré une résistance totale (00 mm) vis-à-vis quatre extraits méthanoliques alors qu'une sensibilité moyenne a été observée avec les autres extraits. Dans le cas des levures du genre *Candida*, une sensibilité assez importante a été enregistrée par les deux espèces testées de *Candida albicans* vis-à-vis la plus part des extraits. Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA ( $p < 0,002$ ) ont montré que l'effet des extraits polyphénoliques était significatif pour toutes les levures testées (Annexe 7).

Concernant les moisissures, d'après le tableau 37, nous remarquons que le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique augmente proportionnellement en fonction de l'augmentation de la dose de l'extrait appliquée. Nos extraits montrent une très bonne activité antifongique vis-à-vis les champignons testés comparativement au contrôle négatif. L'extrait le plus actif correspond à l'extrait des fleurs qui a inhibé totalement (100 %) trois champignons différents durant toute la période du test *Aspergillus niger*, *Thielaviopsis sp.* et *Phoma sp.*, suivi par l'extrait des graines qui a totalement inhibé la croissance du *Thielaviopsis sp.* durant toute la période de l'expérience ainsi qu'avec toutes les doses appliquées. Cet extrait a également inhibé le champignon *Geotrichum sp.* le 1<sup>er</sup> jour uniquement avec les deux doses (forte et moyenne). L'extrait des tiges Av. a inhibé complètement la croissance du champignon *Thielaviopsis sp.* durant toute la période de croissance et avec toutes les doses appliquées. En plus, cet extrait a inhibé la croissance de deux autres champignons *Phoma sp.* et *Monellia sp.* durant le 1<sup>er</sup> jour uniquement avec les trois doses appliquées.

Nous avons constaté aussi que les différents extraits des différentes parties d'*Ammi visnaga* ont montré des zones d'inhibition qui se rapprochent en valeur pour l'ensemble des souches

fongiques testées, ceci peut être dû à leur teneur importante en flavonoïdes et en polyphénols (Del campo *et al.*, 2000). L'activité antimicrobienne de ces derniers s peut être attribuée à leur capacité à inhiber la synthèse ADN et ARN ainsi que d'autres macromolécules (Ferrell *et al.*, 1979; Melts et Mac Gregor, 1981). Donc, on peut dire que les extraits de tiges, graines et de fleurs sont les plus actifs vis-à-vis des microorganismes testés.

Nos résultats sont en accord avec Semyaril *et al.* (2011) qui rapportent que les extraits aqueux et hydroalcooliques des tiges et des graines d'*A. visnaga* ont montré une activité antibactérienne remarquable contre *S. mutans*, *S. salivarius* et *S. sanguis*.

De plus, les extraits d'*Ammi visnaga* n'ont pas montré une activité inhibitrice supérieure à celle des huiles essentielles. Cependant, les levures ont montré une forte résistance aux trois huiles essentielles testées, alors qu'elles se sont montrées sensibles pour les différents extraits méthanoliques. L'activité antimicrobienne d'*Ammi visnaga* est généralement attribuée à la présence du Kelline et visnagine (Hashim *et al.*, 2014) qui ont une activité antifongique, antibactérienne et antivirale (Hudson, 1999).

L'extrait éthanolique des graines (95% d'éthanol) d'*Ammi visnaga* inhibe la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* H37RVTMC 102 même à des concentrations très basses (dilution 1:40) (Grange et Davey, 1990). De même, l'extrait acétonique, éthanolique ou aqueux inhibe la croissance fongique de *Neurospora crassa* *In vitro* (Kubas, 1974). Alors que, l'extrait aqueux des graines de la même plante (à des concentrations comprises entre 2 et 10 mg/ml) inhibe la croissance et la production des Aflatoxine par *Aspergillus flavus* (Mahmoud, 1999).

### 6.1.1 Antibiogramme des souches bactériennes

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques de référence. Les résultats de l'antibiogramme réalisé sur l'ensemble des souches bactériennes sensibles ou non aux extraits phénoliques sont regroupés dans le tableau 38. On y remarque que toutes les bactéries testées ont montré une résistance vis-à-vis la clindamycine, Doxycycline et à la Pénicilline sauf les genres *S. aureus* et *P. aeruginosa*. De plus, toutes les bactéries testées ont révélé aussi une forte sensibilité aux Sulphonamides sauf *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. La fosfomycine s'est montré un bon inhibiteur de toutes les bactéries testées, à l'exception de l'espèce *B. subtilis*. Par ailleurs,

toutes les bactéries ont été résistantes au Doxycycline et à la Pénicilline sauf *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli*. De plus, toutes les bactéries testées ont révélé aussi une forte sensibilité à l'Ofloxacin. A partir de ces résultats, on a opté pour l'Ofloxacin servant comme témoin positif.

**Tableau 38** : Antibiogramme des souches sensibles aux extraits polyphénoliques d'*Ammi visnaga*

Bactéries Antibiotiques (A)	Zones d'inhibition (mm)					
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>
<i>Escherichia coli</i>	10±2	18±0.28	30±1.5	18±00	00±00	30±1.52
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>+</sup>	18±0.5	18±0.5	08±1	28±0.2	12±4.02	00±00
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>-</sup>	20±00	00±00	9.5±00	31±0.75	15±2	00±00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15±2	12±0.86	30±1.52	12±1	12±3.5	00±00
<i>Enterococcus faecium</i>	00±00	12±1.75	20±1	30±0.57	11±2	12±1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8±00	15±1.75	20±0.5	34±2	17±3.05	15±1.73
<i>Salmonella sp.</i>	00±00	00±00	25±1.15	25±0.86	00±00	30±4.04
<i>Salmonella</i> H <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	00±00	00±00	23±1.25	22±1.25	00±00	28±1
<i>Proteus mirabilis</i>	00±00	16±1.52	18±0.5	35±2	00±00	30±2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	00±00	00±00	6±00	28±1	10±2	00±00
<i>Serratia sp.</i>	00±00	15±2.08	26±1.52	35±0.75	00±00	32±0.33
<i>Bacillus subtilis</i>	00±00	29±2.08	00±00	32±2.08	00±00	35±2

\* : Diamètres d'inhibitions exprimées en (moyenne ±écartype)

**Avec :** A<sub>1</sub> : Clindamycine ; A<sub>2</sub> : Doxycycline ; A<sub>3</sub> : Fosfomycine ; A<sub>4</sub> : Ofloxacin ; A<sub>5</sub> : Pénicilline ; A<sub>6</sub> : Sulphonamide

## 6.2 Etude quantitative de l'activité antimicrobienne

A fin de confirmer les résultats trouvés précédemment dans l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimale inhibitrices (CMI) des trois huiles essentielles (HE) d'*Ammi visnaga* ainsi que celle des extraits étudiés.

**a) Les huiles essentielles**

Les valeurs des CMI des HE vis-à-vis les souches microbiennes sensibles sont représentées dans le tableau 39.

**Tableau 39:** Valeurs de CMI des trois huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L.

Bactéries	CMI des huiles essentielles (%)		
	HE Av.	HE Pl.	HE F.
<i>Escherichia coli</i>	0.4	0.2	0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.4	0.4	0.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.6	0.6	0.6
<i>Bacillus subtilis</i>	0.4	0.4	0.4
<i>Salmonella sp.</i>	1	0.8	0.8
<i>Salmonella H<sub>2</sub>S<sup>+</sup></i>	1	1	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	0.8
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS -	1	0.8	0.8
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS +	1	0.8	0.8
<i>Enterococcus faecium</i>	0.8	0.8	0.8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.6	0.6	0.6
<i>Serratia sp.</i>	0.4	0.2	0.2

**b) Les Extraits méthanoliques**

Les valeurs des CMI des extraits méthanoliques vis-à-vis les souches microbiennes et les levures sensibles sont représentées dans le tableau 40.

**Tableau 40:** Valeurs de CMI des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* L.

Microorganismes	CMI des extraits méthanoliques (%)							
	Ex.1	Ex.2	Ex. 3	Ex. 4	Ex. 5	Ex. 6	Ex. 7	Ex. 8
<i>Escherichia coli</i>	0.8	0.8	0.6	0.8	0.6	0.8	0.6	0.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.8	0.8	1	1	1	1	1	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	ND	ND	ND	1	ND	1	ND
<i>Salmonella sp.</i>	1	1	0.6	0.6	0.6	0.4	0.6	0.4
<i>Salmonella H<sub>2</sub>S<sup>+</sup></i>	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.6	0.6
<i>Proteus mirabilis</i>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>-</sup>	0.8	0.8	0.8	ND	0.6	0.6	0.6	0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> MRS <sup>+</sup>	0.8	0.8	0.8	ND	0.6	0.6	0.6	0.6
<i>Enterococcus faecium</i>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.6	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4
<i>Serratia sp.</i>	0.4	0.8	0.6	0.8	0.6	0.8	0.6	0.6
<i>Candida albicans</i> (prélèvement d'angle)	1	0.6	0.6	0.6	1	0.6	0.8	0.8
<i>Candida albicans</i> (prélèvement d'urine)	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	1	0.6	0.8
<i>Candida albicans</i> (prélèvement vaginal)	0.4	0.4	0.6	0.8	0.6	0.8	0.4	0.6
<i>Candida tropicalis</i> (prélèvement d'urine)	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.6
<i>Saccharomyces bulgari</i>	0.6	ND	ND	0.6	0.8	ND	ND	0.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

ND : Non déterminé

E<sub>1</sub> :feuilles Av., E<sub>2</sub> : tiges Av., E<sub>3</sub> : feuilles Pl., E<sub>4</sub> : fleurs, E<sub>5</sub> : tiges Pl., E<sub>6</sub> : feuilles F., E<sub>7</sub> : graines, E<sub>8</sub> : tiges F.

D'après les résultats obtenus et représentés dans les tableaux ci-dessus, nous constatons que les valeurs des CMI des HE et des extraits méthanoliques varient en fonction des souches microbiennes testées et des échantillons obtenus (selon la partie de la plante utilisée et sa période de récolte).

L'huile essentielle de la période de fructification a montré la plus forte inhibition avec des valeurs de CMI les plus faibles, les genres bactériens *Escherichia coli*, *Serratia sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* étaient les plus sensibles avec des CMI variant entre (0.2 et 0.4%), cela confirme les résultats obtenus précédemment avec la méthode de diffusion sur milieu gélosé (aromatogramme).

Pour les extraits, plusieurs similitudes ont été enregistrées dans les CMI des bactéries, ce qui a été expliqué par le rapprochement des valeurs des diamètres de leurs zones d'inhibitions. Cependant, dans le des levures, les extraits méthanoliques se sont montrés actifs en les comparant avec les huiles essentielles dont aucune sensibilité n'a été enregistrée, ce qui a été confirmé par les résultats de la CMI. Ce fort pouvoir bactériostatique de ces extraits par rapport à celui des huiles essentielles est attribué à sa richesse en phénols totaux et flavonoïdes (Del campo *et al.*, 2000). Satrani *et al.* (2004), ont rapporté que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. a une grande activité inhibitrice vis-à-vis les bactéries et les champignons. Cependant, les bactéries sont plus sensibles que les champignons à cette huile essentielle. En effet, *Escherichia coli* est inhibée à partir de la concentration de 1/500 V/V alors que *B. subtilis* et *S. aureus* résistent jusqu'à une concentration de 1/1250 V/V en huile essentielle d'*Ammi visnaga*.

Les moisissures ont manifesté la même sensibilité à l'huile essentielle d'*Ammi visnaga*, le champignon *Aspergillus niger* a été inhibé à une concentration égale à 1/100 V/V.

Charai *et al.* (1996) ont démontré que *S. aureus* et *B. subtilis* sont plus résistants que *E. coli* à l'inhibition des huiles essentielles d'*Origanum compactum* comportant du carvacrol et du  $\beta$ -cymène ainsi que l'*Origanum majorana* riche en linalool et en terpinène-4-ol.

La même constatation a été faite par Limberger *et al.* (2001) qui ont indiqué que *E.coli* est plus sensible que *S. aureus* à l'inhibition de l'huile essentielle des feuilles de *Blepharocalyx salicifolius* dont les composés majeurs sont le 1,8 cineole (25,2 %), le linalool (20,4 %) et la P-caryophyllène (22,9 %). Cette activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* est principalement liée à son profil chimique (Tableau 15). Ce dernier montre une dominance des alcools monoterpéniques (linalool,  $\alpha$ -terpeneol, nerol, verticicol, farnesol et terpinène-4-ol). Le **linalool** est le second composé majoritaire des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

après le 2-methylbutyl 2-methyl butanoate. Charai *et al.* (1996) et Deans et Svoboda (1990) ont rapporté que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*O. majorana* est due à ses composés majoritaires : le linalool et le terpinène-4-ol. Hitokoto *et al.* (1980) ont aussi démontré que le linalool, composant majeur de l'huile essentielle de coriandre, a un pouvoir puissant sur *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* et *A. versicolor*. En étudiant l'effet de cinq constituants purs des huiles essentielles (cineole, citral, geraniol, linalool et menthol), Pattnaik *et al.* (1997) ont prouvé que le linalool est le constituant le plus actif en inhibant la croissance de dix-sept souches bactériennes parmi les dix-huit testées. Ces mêmes auteurs ont indiqué aussi que le linalool est doté d'un pouvoir fongistatique vis-à-vis des champignons étudiés. Le test de huit micro-organismes pathogènes sur l'extrait méthanolique et éthanolique d'*A. visnaga* a montré que l'extrait éthanolique été le plus actif avec une CMI égale à 5 mg/ml contre *Enterococcus faecalis*. De plus, une concentration de 8 mg/ml inhibe la croissance des levures (Ghareeb *et al.*, 2011).

## **7 Evaluation de la toxicité aigüe de contact des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga***

Pour comparer les effets létaux induits par les différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*, la toxicité aigüe par contact est étudiée pour l'espèce de puceron *Toxoptera aurantii*. Les résultats de l'évaluation de la toxicité aigüe des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* sont exposés et traités par des analyses statistiques.

### **7.1 Observation des symptômes**

Pour l'étude de la toxicité aigüe par contact, la mortalité des pucerons est contrôlée au bout de 24, 48, 72 et 96 heures. Les symptômes de neurotoxicité observés chez *Toxoptera aurantii* lors de l'intoxication par contact se manifestent rapidement par une activité générale accrue, avec des mouvements désordonnés, des tremblements et des convulsions, puis un comportement apathique.

### **7.2 Toxicité de contact**

La relation dose - mortalité et la cinétique de la mortalité après l'intoxication par la voie topique sont développées.

#### **7.2.1 Relation dose - mortalité**

Les résultats de la toxicité aigüe des huit extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* par voie topique chez l'espèce *Toxoptera aurantii* sont représentés sur la figure 24 (A, B, C, D, E, F, G et H).

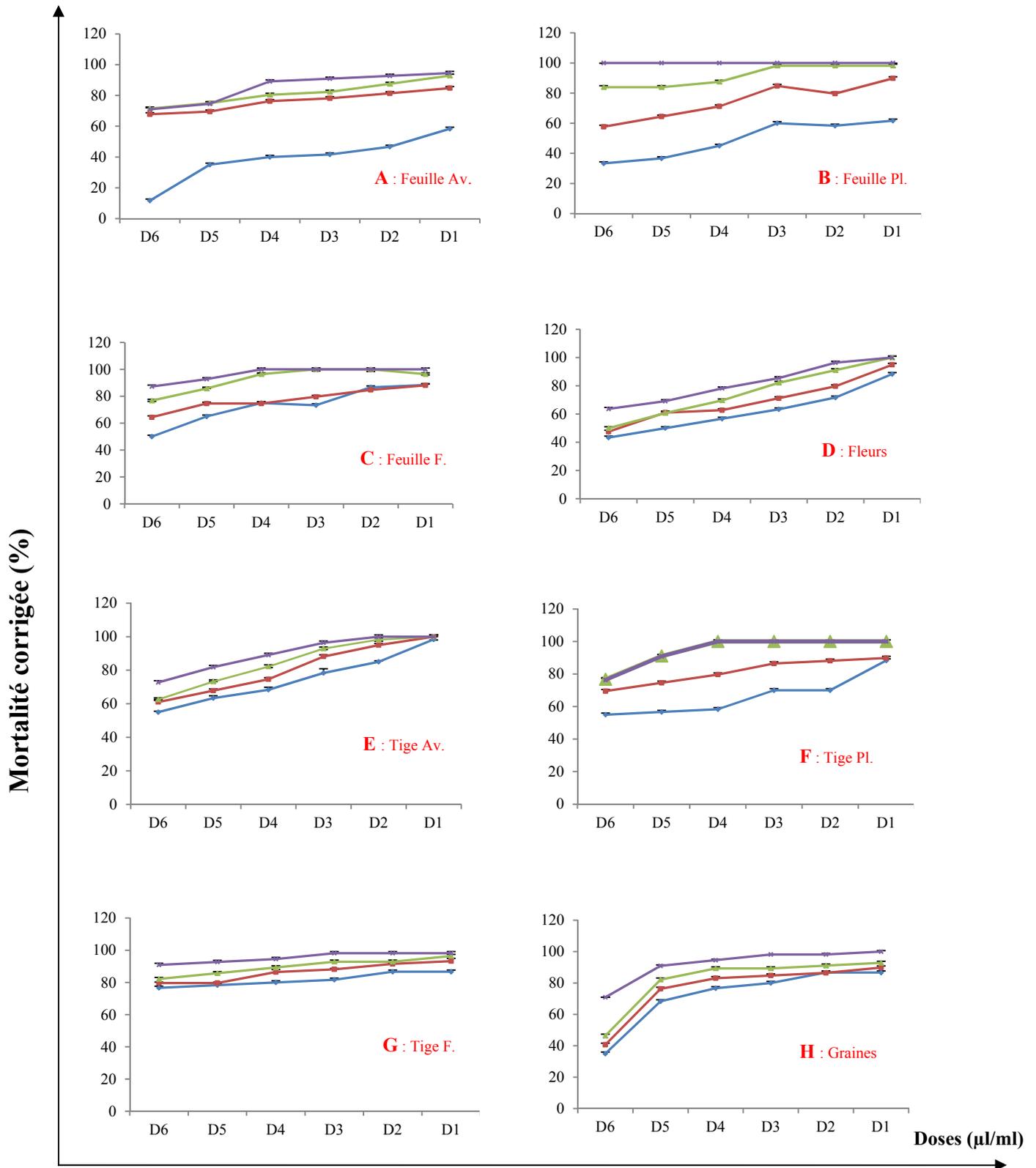


Fig.24 Relation dose-mortalité après contact topique avec les différents extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*

—▲— 24H —■— 48H —◆— 72H —×— 96H

La mortalité des pucerons est observée pour des doses de 250, 500, 3000, 50000, 10000, 30000 ng/pucerons. Les données représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard d'expériences réalisées en triplicata. L'absence de barre d'erreur correspond à un écart-type égale à 0. La mortalité des témoins est inférieure à 10 %. On remarque qu'il existe une relation proportionnelle entre la dose appliquée et la mortalité observée. La mortalité augmente en fonction de la dose administrée pour les huit extraits appliqués.

En effet pour le premier extrait (feuilles Av.), la dose la plus élevée ( $3.10^4$  ng/puceron) a engendré une mortalité de 58.33 % après 24h et une mortalité de 94.55 % après 96h. Après 24h, les doses comprises entre  $D_2$  ( $10^4$  ng/puceron) et  $D_4$  ( $5.10^3$  ng/puceron) enregistrent des mortalités qui se rapprochent de l'ordre de 46 %. La plus faible dose  $D_6$  (250 ng/puceron) a provoqué une mortalité de 11.8 % après 24h, cette mortalité ne cesse d'augmenter pour atteindre 70.33 % après 96h (Fig.24A).

Concernant le deuxième extrait (feuilles Pl.), la dose la plus élevée ( $3.10^4$  ng/puceron) a engendré une mortalité de 61.67 %, alors que la plus faible dose  $D_6$  (250ng/puceron) a provoqué une mortalité de 33.33 % après 24h (Fig.24B). Les 100 % de mortalité sont atteints après 96h pour toutes les doses administrées.

La plus forte dose ( $D_1$ ) du troisième extrait (feuilles F.), a engendré une mortalité de 88.33 % après 24h. Cette mortalité atteint les 100 % après 72h. Alors que la plus faible des doses  $D_6$  (250 ng/puceron) a provoqué une mortalité de 43.33 % après 24h, cette mortalité ne cesse d'augmenter pour atteindre 63.64 % après 96h (Fig.24C).

De plus, après 24h de contact, nous remarquons que la dose la plus élevée  $D_1$  ( $3.10^4$  ng/puceron) du quatrième extrait (fleurs) a provoqué une mortalité de 88.33 % et atteignant les 100 % après 96h (Fig.24D). Par ailleurs, les doses  $D_2$  et  $D_3$  ( $10^4$  et  $5.10^3$  ng/puceron) ont provoqué une mortalité de 86.67 et 73.33 % respectivement après 24h, cette mortalité ne cesse d'augmenter pour atteindre les 100 % après 72h.

Toute fois, nous observons pour le cinquième extrait (tiges Av.), que la dose la plus élevée ( $3.10^4$  ng/puceron) a provoqué une mortalité de 98.33 % par après 24h. Cette mortalité atteint les 100 % après 48h seulement. Alors que la dose  $D_2$  ( $10^4$  ng/puceron) a engendré une mortalité de 85 % après 24h, cette mortalité atteint les 100 % après 96h de contact (Fig.24E). Une mortalité de 55 % a été enregistrée par la plus faible dose après 24h alors que 72.73 % a été enregistrée après 96h.

De plus, nous avons noté des mortalités proches de 86 % pour les plus forte doses  $D_1$  ( $3 \times 10^4$  ng/ $\mu$ l) et  $D_2$  ( $10^4$  ng/ $\mu$ l) provoquées par le sixième extrait (tiges Pl.) au bout de 24h, alors que les doses moyennes  $D_3$  ( $5 \times 10^3$  ng/ $\mu$ l) et  $D_4$  ( $3 \times 10^3$  ng/ $\mu$ l) ont provoqué des mortalités d'environ 80 % (Fig.24F), atteignant environ les 98 % après 96 h. Les deux plus faibles doses  $D_5$  ( $5 \times 10^2$  ng/ $\mu$ l) et  $D_6$  (250 ng/ $\mu$ l) provoquent environ de 78 % de mortalités et atteignant les 90 % après 96h.

Concernant le septième extrait (tiges F.), nous remarquons que la plus forte dose ( $3 \times 10^4$  ng/puceron) engendre le pourcentage de mortalité le plus élevé 88.33 % au bout de 24h (Fig.24G). Les doses  $D_2$  et  $D_3$  provoquent une mortalité de 70 % alors que les doses  $D_4$ ,  $D_5$  et  $D_6$  engendrent des mortalités proche de 55 %. Nous constatons ainsi que pour les doses  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$  et  $D_4$  100 % de mortalité sont atteints après 48h uniquement.

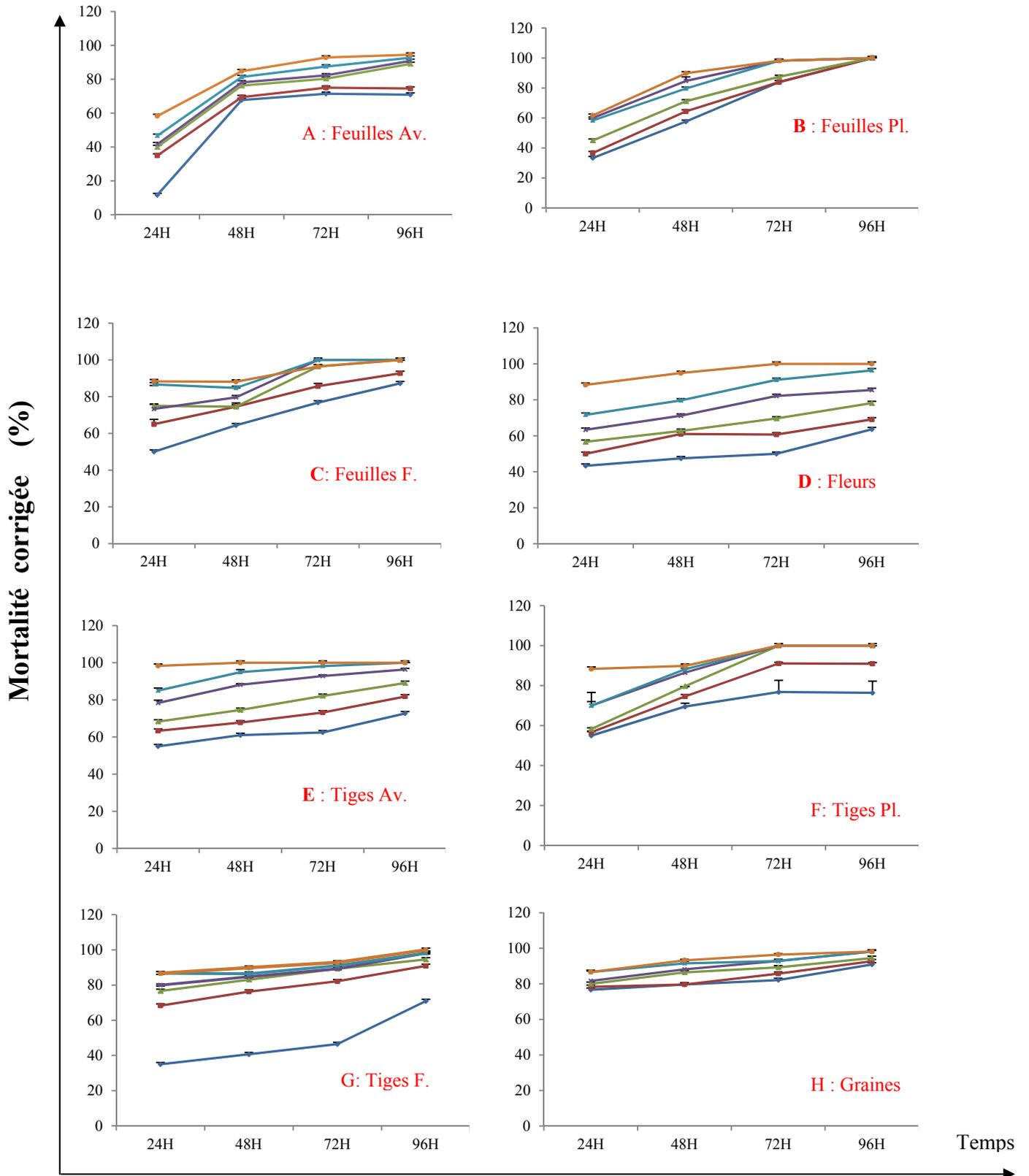
Et enfin, la dose la plus élevée ( $3 \times 10^4$  ng/puceron) du huitième extrait (graines), a provoqué la mortalité de 86.67 % des pucerons après 24h de contact qui atteint les 100 % après 96h de temps de contact (Fig.24H). Cependant, la plus faible des doses  $D_6$  (250 ng/puceron) a engendré une mortalité de 35 % des pucerons après 24h, cette mortalité n'a cessé d'augmenter pour atteindre 70.91 % après 96h.

Les résultats de l'analyse de la variance ANOVA ( $p < 0,0000$ ) ont montré que l'effet traitement était significatif après tout les temps de contact testés pour ce qui est de la sensibilité *Toxoptera aurantii* aux huit extraits méthanoliques testés (Annexe 5).

### 7.2.2 Cinétique de mortalité

Les résultats de la cinétique de mortalité sont représentés sur la figure 25. L'aspect de cette cinétique est classique. Plus la dose des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* augmente plus la mortalité s'élève.

La mortalité des pucerons est observée pour des six doses différentes : 250, 500,  $3.10^3$ ,  $5.10^3$ ,  $10^4$  et  $3.10^4$  ng /pucerons. Les données représentent la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicata. Les résultats de la cinétique de mortalité sont représentés sur la figure 25 A, B, C, D, E, F et G. L'aspect de cette cinétique est classique. Les mortalités augmentent en fonction de l'augmentation des doses administrées des différents extraits d'*Ammi visnaga*.



**Fig. 25** Cinétique de mortalité

— (◆)—  $D_6 = 250$ ,  $D_5 = 500$  — (■)—,  $D_4 = 3000$  — (▲)—,  $D_3 = 5000$  — (×)—,  
 — (×)—  $D_2 = 10000$ ,  $D_1 = 30000$  — (●)— (Doses en ng/puceron)

En effet, pour le premier extrait (feuilles Av.), le maximum de mortalité (%) (89.09 - 94,55) est atteint après 96h pour les fortes doses qui sont comprises entre D<sub>1</sub> et D<sub>4</sub> (Fig. 25A). Par ailleurs, le deuxième extrait (feuilles Pl.) a engendré 100 % de mortalité au bout de 96h pour toutes les doses administrées (Fig. 25B).

Alors que le troisième extrait (feuilles F.), le maximum de mortalité (100 %) est atteint après 96h pour les doses D<sub>1</sub> et D<sub>4</sub> et après 72h pour les doses D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>. Cependant, le maximum de mortalité (%) (92.73 et 87.27) engendré par les faibles doses D<sub>5</sub> et D<sub>6</sub> n'est atteint qu'après 96 h de temps de contact (Fig. 25C).

De plus, nous remarquons pour le quatrième extrait (fleurs) que les 100 % de mortalité sont atteints après 72 h pour la dose D<sub>1</sub> (Fig. 25D). Alors que, la D<sub>1</sub> de l'extrait des tiges Av. a engendré 100 % de mortalité après 48h uniquement (Fig. 25E).

Toute fois, nous enregistrons un maximum de mortalités atteints après 72h provoqué par les six doses testées du sixième extrait (tiges Pl.) dont les doses D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> et D<sub>4</sub> atteignant 100 % de mortalité (Fig. 25F). Nous remarquons ainsi, que le maximum de mortalités est atteint après 96h provoqué par les six doses testées du septième et huitième extrait (tiges F. et graines) dont 100 % de mortalité ont été enregistrées uniquement par la forte dose D<sub>1</sub> de l'extrait des tiges F. (Fig. 25G et H).

En effet, il existe une relation directement proportionnelle entre la dose de l'extrait administré et la mortalité observée. La mortalité des pucerons augmente en fonction de l'élévation de la dose administrée pour tous les extraits méthanoliques testés.

Le maximum de la mortalité est la plupart de temps atteint au bout de 96 heures à part quelques exceptions comme celle de l'extrait des tiges Av. (à D<sub>1</sub>= 3.10<sup>4</sup> ng/pucerons) qui a engendré 100 % de mortalité au bout de 48h, ainsi que la D<sub>1</sub> de l'extrait des fleurs avec la dose D<sub>1</sub>, l'extrait des feuilles F. avec les doses D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> où 100 % de mortalité ont été atteints au bout de 72h, l'extrait.

### 7.3 DL<sub>50</sub> de contact des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga*

Après intoxication des pucerons par la voie topique avec les huit extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* représentant les différentes parties aériennes collectées durant différentes périodes de croissance, la mortalité est contrôlée pendant 96 heures.

Les valeurs de la  $DL_{50}$  regroupées dans le tableau 41, sont déterminées à partir des droites de régression, obtenues par des transformations en Probit des pourcentages des mortalités corrigées, et des transformations en logarithme décimal des doses administrées.

La méthode standard pour évaluer la toxicité des insecticides implique le calcul d'une donnée de toxicité aiguë ( $DL_{50}$ ) suite aux lignes directives normalisées comme la directive du Conseil Européen 91/414 d'une part et celle de la fédérale des insecticides, des fongicides et des rodenticides aux États-Unis d'autre part (Decourtye et Devillers, 2010; Blacquiere *et al.*, 2012).

Les valeurs de  $DL_{50}$  des extraits méthanoliques de la plante *Ammi visnaga* L. obtenues pour le puceron *Toxoptera aurantii* sont faibles ceci peut être attribué à la composition chimique des graines. En effet, au bout de 24 heures les valeurs de  $DL_{50}$  les plus faibles sont respectivement égales à 0.054 ng/puceron pour l'extrait des graines et 171,65 ng/puceron pour l'extrait des feuilles F. par voie topique (Tableau 41).

Cependant, au bout de 48 heures les valeurs de  $DL_{50}$  les plus faibles sont respectivement égales à 1.345 ng/puceron pour l'extrait des graines, 7.12 ng/puceron pour l'extrait des feuilles Av. par voie topique.

Alors que, au bout de 72 heures les valeurs de  $DL_{50}$  les plus faibles sont respectivement égales à 1.258, 11.19, 13.97 ng/pucerons par voie topique représentant respectivement l'extrait des graines, feuilles Pl. et feuilles Av.

Nous remarquons au bout de 96h que les valeurs de  $DL_{50}$  les plus faibles sont égales à 0.153 ng/puceron pour l'extrait des graines, 8 ng/puceron pour l'extrait des feuilles Pl. par voie topique.

Donc, on conclut que l'extrait des graines est l'extrait le plus actif. On peut classer les extraits selon leurs efficacités et leurs valeurs de  $DL_{50}$  comme suit :

$DL_{50}$  **graines** >  $DL_{50}$  feuilles Pl. >  $DL_{50}$  feuilles F. >  $DL_{50}$  feuilles Av. >  $DL_{50}$  tiges Pl. >  $DL_{50}$  tiges F. >  $DL_{50}$  tiges Av. >  $DL_{50}$  fleurs.

**Tableau 41** : Variation des valeurs de DL<sub>50</sub> en fonction des extraits méthanoliques administrés chez *Toxoptera aurantii*.

Temps (Heure)	DL <sub>50</sub> (ng /puceron)							
	Extraits méthanoliques							
	<i>Feuilles Av.</i>	<i>Feuilles Pl.</i>	<i>Feuilles F.</i>	<i>Fleurs</i>	<i>Tiges Av.</i>	<i>Tiges Pl.</i>	<i>Tiges F.</i>	<i>Graines</i>
<b>24</b>	11265.64 [D1 - D2]	3249.92 [D3-D4]	171.56 < D6	706.24 [D4-D5]	310.53 [D5-D6]	259.53 [D5-D6]	281.58 [D5-D6]	<b>0.054 &lt; D6</b>
<b>48</b>	<b>7.12 &lt; D6</b>	102.86 < D6	<b>16.87 &lt; D6</b>	383.11 [D5-D6]	268.49 [D5-D6]	<b>11 &lt; D6</b>	218.91 < D6	<b>1.345 &lt; D6</b>
<b>72</b>	<b>13.97 &lt; D6</b>	<b>11.196 &lt; D6</b>	<b>48.65 &lt; D6</b>	438.02 [D5-D6]	205.82 < D6	<b>30.77 &lt; D6</b>	<b>70.17 &lt; D6</b>	<b>1.258 &lt; D6</b>
<b>96</b>	<b>22 &lt; D6</b>	<b>8.09 &lt; D6</b>	<b>13.09 &lt; D6</b>	238.53 < D6	113.24 < D6	<b>30.15 &lt; D6</b>	<b>54.43 &lt; D6</b>	<b>0.153 &lt; D6</b>

Plusieurs espèces de plante de la famille des *Apiaceae* sont connues par leurs effet significatif acaricide et insecticide contre un grand nombre d'insectes (Papachristos *et al.*, 2002). Il est à signaler que peu de travaux sont réalisés sur l'effet insecticide de l'huile essentielle ou des différents extraits végétaux de la plante *Ammi visnaga*.

Pavela (2008) et Pavela (2009) a rapporté que l'extrait méthanolique d' *Ammi visnaga* a un effet larvicide contre *Culex quinquefasciatus* et une toxicité très élevée qui a engendré 100 % de mortalité après 24h avec une valeur de LC<sub>50</sub> notée, égale à 9mg/l. De plus, l'extrait de la plante testée a également protégé les graines de denrées stockées contre *Sitophilus granarius* (Abdel-Latif, 2004) et *Sitophilus oryzae* (Ahmed et Al-Moajel, 2005).

Ghoneim *et al.* (2014<sup>a</sup>), ont rapporté l'effet de l'extrait de fruit (graine) d'*Ammi visnaga* sur deux enzymes de détoxification (l'acide phosphatase (ACP) et l'alcaline phosphatase (ALP)) dans l'hémolymph et les acides gras de *Schistocerca gregaria*. Trois extraits différents ont été testés: l'extrait éthanolique, extrait d'éther de pétrole et l'extrait butanolique dont la CL<sub>50</sub> égale à (21,0, 12,0 et 22,5%) respectivement. Les trois extraits d'*Ammi visnaga* ont été appliqués sur l'avant-dernier stade larvaire. L'extraits d'éthanol et d'éther de pétrole promouvoir l'activité de l'acide phosphatase dans l'hémolymph, dans la vie larvaire et les adultes qui viennent d'émerger. En revanche, l'extrait du n-butanol a provoqué une réduction drastique de l'activité de l'enzyme dans l'hémolymph des larves et d'adultes.

Ghoneim *et al.* (2014<sup>b</sup>), a également rapporté que l'extrait de fruit d'*Ammi visnaga* a engendré un trouble dans les réactions métaboliques les plus essentielles de *S. gregaria*, ceci peut être expliqué par l'intervention de certains composés chimiques sur la régulation hormonale de la mobilisation métabolique.

Lamiri *et al.* (2001) rapportent que l'huile essentielle de l'espèce *Ammi visnaga* a montré un effet ovicide très fort contre *Mayetiola destructor*. De même, cette huile essentielle a un effet larvicide très intéressant contre *Culex mosquito*es (Amer et Mehlhorn, 2006).

Chiffelle *et al.* (2013), rapportent dans leur étude sur l'effet insecticide de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des feuilles (jeunes et matures) de *Schinus molle* sur les larves du troisième stade du *Xanthogaleruca luteola* que le maximum de concentration (4.3% w/v) a engendré les taux de mortalités suivantes : 89 and 67, and 78 and 63%, respectivement.

Les différents extraits (n-hexane, acetate d'éthyl et methanol) obtenus à partir de *Condalia microphylla* ont montré les LD<sub>50</sub> suivantes : 3.89, 9.4, et 9.7 ppm; contre *S. frugiperda* ,5.2,

14.2, et 20.4 ppm contre *T. molitor*, et 3.23, 7.65 et 17.9 ppm contre *D. melanogaster*, respectivement (Cespedes *et al.* , 2013).

D'après Pascual-Villalobos et Robledo, (1998), les différents extraits de quelques espèces de menthe ont montré un important effet insecticide, on cite à titre d'exemple : l'extrait hexanique de *M. longifolia* (L.) Huds. Sur *T. castaneum* qui a engendré des taux de mortalité comprise entre 40 et 69 % alors que l'extrait méthanolique a causé des taux de mortalités comprises entre 0 et 39 %. Cependant l'extrait acétonique a été inactif (0 % mortalité). L'extrait dichlorométhanique de l'espèce *M. rotundifolia* (L.) Huds. (5000 ppm) a été testé sur *T. castaneum*, 74 % de mortalité ont été enregistrées (Clemente *et al.* , 2003).

Toute fois, l'étude de l'activité biologique des différentes fractions botaniques sur les insectes montre que l'effet insecticide n'est pas le fait d'un seul composé. L'activité protectrice des plantes aromatiques résulte de l'action de plusieurs composés allélochimiques, notamment terpéniques et polyphénoliques, que les plantes synthétisent au cours du son métabolisme secondaire. En conclusion, il faut retenir que l'utilisation de ces molécules dans le cadre de la lutte écochimique pourrait contribuer à diversifier les méthodes de lutte contre les insectes phytoravageurs et diminuer l'effet néfaste des insecticides sur l'être humain et l'environnement (Regnault-Roger et Hamraoui, 1997).

*Conclusion  
générale*

## Conclusion générale

Actuellement, il existe une grande inquiétude d'une part sur le danger que peuvent présenter les conservateurs chimiques dont beaucoup sont suspects ainsi que l'ajout des pesticides et des insecticides dans les produits agricoles en raison de leur actions cancérigènes et allergènes ou de leur toxicité résiduelle. D'autre part, le problème de résistances microbiennes aux médicaments devient un grand souci de santé public dans le monde. C'est pour cela que le consommateur soucieux de sa santé, commence à prendre conscience de l'importance du retour au naturel. A cet effet et dans le cadre de la valorisation de la flore spontanée poussant en Algérie, nous avons mené un travail qui consiste à évaluer l'activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide d'*Ammi visnaga* L. collectée durant trois périodes de croissance.

De cette étude nous pouvons ressortir les points suivants :

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a fourni des rendements de 0.16%, 0.32%, 0.48% (ml/100g de matière végétale sèche) représentant les périodes de croissance suivantes : avant floraison, pleine floraison et la période de fructification.

La caractérisation des huiles essentielles étudiées par une analyse qualitative par CPG et CPG/SM nous a permis d'identifier : 73, 63 et 43 composants représentant respectivement 92.307 %, 93.578 % et 97.075% des composants durant les périodes suivantes : avant floraison, pleine floraison et période de fructification. Durant les trois périodes de croissance, le non-terpene ester (2-Methylbutyl 2-methyl butanoate) été le constituant majoritaire avec des taux croissants (%) durant les périodes de croissance suivantes : avant floraison, pleine floraison et période de fructification (10.291, 16.533 et 28.561), suivi par le monoterpène oxygéné  **$\beta$ - linalool** (%) (2.916, 13.616, 9.181), le diterpène **verticiol** (%) (10.063, 7.587, 6.451), le **spiro (2,5) octane -3,3-dimethyl -2- (1- buten- 3 -on -1-yl)** (%) (6.539, 4.937, 7.821), **cyclohexane 1,1,2 trimethyl 3,5 bis 1-methylethenyl (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ )** (%) (6.433, 7.886, 3.264) et **linalyl isovalerate** (%) (3.457, 2.705, 2.71). Il est à noter que nos trois huiles partagent les mêmes composés majoritaires mais avec des proportions différentes.

En ce qui concerne les extraits, les rendements d'extraction (%) enregistrés sont : 28.84, 36.18, 33.95, 30.71, 33.18, 34.43, 38.76 et 35.1 représentant respectivement les parties suivantes : feuilles Av., feuilles Pl., feuilles F., fleurs, tiges Av., tige Pl., tige F. et graines.

L'évaluation de la teneur en polyphénols totaux des extraits, nous a permise d'enregistrer les teneurs suivantes : 13.86, 7.97, 23.354, 20.822, 25.378, 18.417 et 19.872 mg EGA/g de

matière végétale alors que le dosage des flavonoïdes des extraits d'*Ammi visnaga* L. révèle les teneurs suivantes : 3.11, 3.569, 3.952, 1.236, 1.02, 2.572, 4.819, 12.57 mg EQ/g de matière végétale. Cependant les teneurs en tanins totaux sont : 5.635, 3.29, 2.89, 6.06, 7.365, 8.92, 5.92, 10.26 mg EC/gde matière végétale représentant respectivement dans l'ordre les parties suivantes : feuilles Av., feuilles Pl., feuilles F., fleurs, tiges Av., tige Pl., tige F. et graines.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux tests différents : l'inhibition du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur du fer. Parmi les trois huiles testées, l'huile essentielle de la période de fructification a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé ( $I\%=97,230\pm 0.088$ ). A la concentration la plus forte (10 mg/ml), le pourcentage d'inhibition de nos huiles dépasse les 94%. Cependant, les extraits ont montré une activité inhibitrice moins importante. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été enregistré par les deux tiges : tiges Av. et tige F. ( $93.7\pm 0.141\%$  et  $95.894\pm 0.474\%$ ) respectivement alors que la tige de pleine floraison a montré un pourcentage d'inhibition moyen  $I\%=67.265\pm 2.92$ . De plus, les feuilles collectées durant les trois périodes de croissance ont montré les pourcentages d'inhibitions les plus faibles.

Concernant le pouvoir réducteur, les huiles essentielles ont montré un pouvoir réducteur assez important mais il reste toujours inférieur à celui de l'acide ascorbique ( $DO= 2,741\pm 0.069$ ). L'huile essentielle de la période de fructification a montré le pouvoir réducteur le plus élevé ( $DO=1,918\pm 0.005$ ) suivi par HE Pl. puis HE Av.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* a été réalisée par une étude qualitative et quantitative sur douze souches bactériennes, six levures et sept champignons. Les trois huiles essentielles d'*Ammi visnaga* L. sont sensibles aux différentes bactéries (Gram - et Gram +) et champignons mais résistantes aux différentes levures. Les zones d'inhibition les plus importantes ont été observées chez *E.coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853, *B. subtilis* ATCC6633, *Salmonella sp.* et *Serratia sp.* Les différents extraits méthanoliques des différentes parties aériennes d'*Ammi visnaga* L. présentent une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis la majorité des bactéries testées. Cependant, cette sensibilité diffère d'une bactérie à une autre. Les levures ont montré une sensibilité remarquable vis-à-vis la majorité des extraits méthanoliques. La plus grande sensibilité a été notée chez *S. cerevisiae* et ceci avec tous les extraits testés sauf l'extrait des feuilles Av. dont la levure a montré une résistance totale (00 mm).

Nos extraits montrent une très bonne activité antifongique vis-à-vis les champignons testés comparativement à la boîte témoin (contrôle négatif) dont l'extrait le plus actif était l'extrait des fleurs qui a inhibé totalement (100%) trois champignons différents durant toute la période du test et même avec la plus faible dose appliquée (30µl) (*A. niger*, *Thielaviopsis sp.* et *Phoma sp.*).

Les valeurs des CMI enregistrées pour les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* varient entre 0.2 et 1% pour l'ensemble des souches testées. Alors que, les extraits méthanoliques ont montré des CMI très proche comprises entre 0.4 et 1% ce qui explique la similitude de leurs zones d'inhibitions. Ce fort pouvoir bactériostatique et fongicide est attribué à la richesse des extraits en composés actifs (phénols totaux et flavonoïdes). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est hautement dépendante de leur composition chimiques (principalement les phénols). Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De ce fait, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est-à-dire à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composants majoritaires.

La toxicité aigüe de contact des extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* a été évaluée pour l'espèce de puceron *Toxoptera aurantii*. Les valeurs de DL<sub>50</sub> les plus faibles ont été enregistrées après 96h. L'extrait des graines a montré l'activité insecticide la plus forte 0.153.

Enfin l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Dans la perspective de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait intéressant :

- De tester d'autre méthode d'extraction des huiles essentielles et leur influence sur la composition chimique et les activités biologique.
- D'approfondir l'analyse de la composition chimique des différents extraits obtenus (analyse par HPLC), afin d'identifier les espèces chimiques responsables de leur activité biologique.
- Tester d'autre activité biologique : activité anti-inflammatoire, cancérigène, cicatrisante...etc.
- Compléter l'étude de l'activité insecticide par tester les différents extraits à d'autres insectes nuisibles.
- De vérifier les résultats expérimentaux par des tests *in vivo*.

*Références  
bibliographiques*

## - *Références bibliographiques*

- 1) Abbott W.S., (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol*, 18 : 265-267.
- 2) Abd El-Latif A.M., (2004). Tooth-pick seed *Ammi visnaga* L. extracts as grain protectants against the granary weevil *Sitophilus granarius* L. *Egypt. J. Agri. Res.*, 82(4): 1599-1608.
- 3) Abdelfattah A, Aboulenein M.N, Wassel G.M, Elmenshawi B., (1983). Preliminary report on the therapeutic effect of Khellin in Psoriasis, *Dermatologica*, 167: 109-110.
- 4) Abdelfattah A, Aboulenein M.N, Wassel G.M., (1982). An approach to the treatment of vitiligo by khelline, *Dermatologica*, 165: 136-140.
- 5) Abderrazak M, Joël R., (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod, Paris, 177p.
- 6) Abdul-Jalil T.Z, Saour K.Y, Nasser A.A., (2010). Phytochemical study of some flavonoids present in the fruits of two *Ammi* L. species wildy grown in Iraq. *Iraqi. J. Pharm. Sci.*, 19: 48-57.
- 7) Abed D, Kambouche N., (2003). Les huiles essentielles. 1<sup>ère</sup> Ed, Dar El Gharb, Algérie.
- 8) Adams R.P., (2004). Identification of essential oil components by gas chromatography /mass spectroscopy .Carol Streams, IL: Allured Publishing Corporation, 804p.
- 9) AFNOR., (2000). " Huiles essentielles": monographie relatives aux huiles essentielle (H à Y), Ed. Tec. & Doc., Paris : 661-663.
- 10) AFNOR., (1999). Huiles essentielles - Directives générales concernant les profils chromatographiques - Partie 2 : utilisation des profils chromatographiques des échantillons d'huiles essentielles. Indice de classement : T75-500-2 NF ISO 11024-2
- 11) Ahmed S.M.S, Al-Moajel N.H., (2005). Effect of toothpick (*Ammi visnaga* L.) seed extracts on the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Arab Univ. J. Agric. Sci.*, Cairo, 13(2): 549-557.
- 12) Akačić B, Kuštrak D., (1964). Flavonols in *Ammi visnaga* (L) LAM. *Planta. Med.*, 12(2): 232-236.
- 13) Alcamo E.I., (1984). Fundamentals of microbiology. Edition Addison-Wesly publishing company, London, p: 310-341,617-699.
- 14) Al-Snafi A.E., (2013). Chemical constituents and pharmacological activities of *Ammi majus* and *Ammi visnaga*. A review, *Int. J. Pharm. Ind. Res.*, 3(3):257-265.
- 15) Altinterim B., (2012). Hiltantohumunun (*Umbelliferae, Ammivisnaga*L.) düz kaslar üzerine etkisi .Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Dergisi: 60-64.

- 16) Amer A, Mehlhorn H., (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex larvae* (Diptera, Culicidae). *Parasitol. Res.*, 99:466-472.
- 17) Anonyme., (2007). WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, 3:390p.
- 18) Anrep G.V, Barsoum G.S, Kenawy M.R, Misrahy G., (1947). Therapeutic uses of Khellin : Method of standardization. *The Lancet*, 249: 557-558.
- 19) Anrep G.V, Barsoum G.S, Kenawy M.R, Misrahy G., (1946). *Ammi visnaga* in the treatment of the anginal syndrome. *Br. Heart. J.*, 8(4): 171-177.
- 20) Anrep G.V, Barsoum G.S, Kenawy M.R., (1948). The coronary vasodilator action of khellin. *Am. Heart. J.*, 37: 531-542.
- 21) Arnason J.T, Philogene B.J.R, Morand P., (1989). Insecticides of plant origin. (ACS symposium series 387), *American Chemical Society, Washington*, 213p.
- 22) Arpino P, Prevot A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, Wittier P., (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. *Ed. Masson, Paris*, 700p.
- 23) Ashour A, El-Sharkawy S, Amer M, Abdel Bar F, Kondo R, Shimizu1 K., (2013). Melanin biosynthesis inhibitory activity of compounds isolated from unused parts of *Ammi visinaga*. *J. Cosmetics, Derma. Sci. Applic.*, 3: 40-43.
- 24) Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S, Khebri S., (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Sci. J.*, 11(1):69-81.
- 25) Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Vasseur J, Cazin M, Cazin J.C, Pinkas M., (1996). Oxygen spices scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch Drug Res.*, 46 : 1086-1108.
- 26) Balz R., (1986). Les huiles essentielles et comment les utiliser. *Ed Lavoisier. Paris*: 151p.
- 27) Baser K.H.C, Buchbauer G., (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America, 994p.
- 28) Bassole H.N, Kabore Z.I, Traore A.S., (2001). Etude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Méd. Trad. Ali" 20Gl*, 11 :113-122
- 29) Békro Y.A, Békro J.A.M, Boua B.B, Tra B.F.H, Ehilé E.E., (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) (Caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat.*, 4: 217-225.

- 30) Belaiche P., (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine Tome 1, 123p.
- 31) Bencheraïet R, Kherrab H, Kabouche A, Kabouche Z, Jay M., (2011). Flavonols and antioxidant activity of *Ammi visnaga* L. (*Apiaceae*). *Rec. Nat. Pro.*, 5(1):52-55.
- 32) Bendjilali B, Tantaoui E, Ayade A., (1986). Méthodes d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Med. Phyto.*, 20 (2) : 155-167.
- 33) Benhammou N, Atik Bekkara F, Kadifkova Panovska T., (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, 12 : 1259–1266.
- 34) Benkiki N., (2006). Etude phytochimique des plantes médicinales algérienne : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de Doctorat d'état : Chimie de l'université Haj Lakhdar de Batna, 217p.
- 35) Benzie I.F, Strain J., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Bio. Chem.*, 239: 70-76.
- 36) Berset C, Cervelier M.E., (1996). Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sci. des aliments*, 16: 219-245.
- 37) Betoni J.E.C, Mantovani R.P, Barbosa L.N, Di Stasi L.C, Fernandes Júnior A., (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 4, 387–390.
- 38) Bishr M.M, Desoukey S.Y, Magdy M., (2014). The effect of soil on *Ammi visnaga* L. plant grown in several localities of Egypt and Sudan. *IOSR-JPBS*, 9(3):62-68.
- 39) Blacquièrè T, Smagghè G, Gestel C. A. M. van, Mommaerts V., (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*. 21(4): 973–992.
- 40) Blois M.S., (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181:1199-1200.
- 41) Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyyat A., (2002). *Ethnopharmacology Forum*: medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes . Metabolism*, 10 : 33-50.
- 42) Bocchio E., (1985). Hydrodistillation des huiles essentielles : Théorie et applications. *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 63: 61-62.
- 43) Boeke S.J, Auger I.R, Van Loon J.J.A, Van Huis A, Di cke M, Kossou D.K., (2004). Toxicity and repellence of African plants traditionally used for the protection of stored cowpea against *Collosobruchus maculatus*. *J. Stored Prod. Res.*, 40(4): 423-438.

- 44) Boizot N, Charpentier J.P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de l'INRA Bulletin de Liaison Interne (numéro spécial : Numéro spécial 2006 sur les méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques : 79-82.
- 45) Botineau M., (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. *Ed. Tec. and Doc, Paris* ,1335p.
- 46) Boulogne I, Petit P, Ozier-Lafontaine H, Desfontaines L, Loranger-Merciris G., (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environ. Chem. Letters*, 10 (4): 325-347.
- 47) Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B., (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 331: 48–55.
- 48) Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhsine M, Chaouch A, Satrani B., (2009). Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agro Solutions*, 20(1):44-48.
- 49) Bouzouita N, Kachouri F, Ben Halima M, Chaabouni M. M., (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *J. de la Société Chimique de Tunisie*, 10:119-125
- 50) Boyd B, Ford C, Koepke C, Horn E, McAnalley S, McAnalley B., (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glyo. Sc. Nut*, 4 (6): 7p.
- 51) Brand-Williams W, Cuvelier M.E, Berset C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel–Wissenschaft und Tech.*, 28: 25-30.
- 52) Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3<sup>eme</sup> Ed. *Lavoisier Tec & DOC*. Paris, France, 1120 p.
- 53) Bruneton J., (2009). Pharmacognosy, Phytochemistry, medicinal Plants, 4<sup>eme</sup> Ed. *Tec & Doc*. Edition Médicale Internationale. Paris, France, 1270p.
- 54) Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Jokić S, Mujić I, Bilić M, Velić D., (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 61(3):195-199.
- 55) Buronzo A.M., (2008). « Grand guide des huiles essentielles : Santé, Beauté, Bien être ». *Ed. Hachette Pratique*, 256p.
- 56) Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food. Microbiol*, 94(3):223-253.

- 57) Bustaf F, Foegeding P.M., (1983). «Chemical food preservatives», in Block S. *Ed. Lea and Febiger*. Philadelphia U.S.A, 656p.
- 58) Calliste C.A, Trouillas P, Allais D.P, Simon A, Duroux J.L., (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 3321-3327.
- 59) Cespedesa C.L, Molinaa S.C, Muñoz E, Lamillaa C, Alarconb J, Palaciosc S.M, Carpinellac M.C, Avilad J.G., (2013). The insecticidal molting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. (*Rhamnaceae*). *Ind. Crops and Prod.*, 42: 78– 86.
- 60) Chang S.T, Wang S.Y, Wu C.L, Su Y.C, Kuo Y.H., (1999). Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) *Heartwood. Holzforschung*, 53: 487-490.
- 61) Chang S.T, Wang S.Y, Wu C.L, Chen P.F, Kuo Y.H., (2000). Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata). *Heartwood. Holzforschung*, 54: 241-245.
- 62) Charafi S, Kzaiber F, Hafid A, Berkani M, Abdelkhalek O., (2012) .Study of *Ammi visnaga* L on oxalocalcic crystallization. *Global. J. Trad. Med. Sys.*, 1(1): 7-12.
- 63) Charai M, Mosaddak M, Faid M., (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *Origanum compactum* Benth. *J. Essent. Oil Res.*, 8: 657-664.
- 64) Chen J.H, Ho C.T., (1997). "Antioxydant Activity of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds." *J. Agricult. Food .Chem.*, 45: 2374-2378.
- 65) Chiffelle I, Huerta A, Celis M , Araya J.E., (2013). Proximal analysis and insecticidal effects of extracts from pepper tree (*Schinus molle*) leaves on elm leaf beetle (*Xanthogaleruca luteola*) larvae. *Ind. Crops Prod.*, 43: 523– 528.
- 66) Choi W.S, Park B.S, Lee Y.H, Jang D.Y, Yoon H.Y, Lee S.E., (2006). Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. *Crops Protection*, 25: 398-401.
- 67) Claude G, Sylvie E, Michèle V., (2004). Comment protéger les acides gras polyinsaturés à longues chaînes oméga 3 (AGPI -- LC ω3) vis-à-vis de l'oxydation? *O.C.L*, 11(2) : 41-133.
- 68) Clemente S, Mareggiani G, Broussalis A, Martino V, Ferraro G., (2003). Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products insects. *Bol. San. Veg. Plagas*, 29: 1–8.
- 69) Comhair S.A.A, Erzurum S.C., (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 283: 246 - 255.

- 70) Conner D.E., (1993). Naturally occurring compounds. In Davidson P.M, Branen A.L. Antimicrobials in foods. 2<sup>nd</sup> Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y, 441-468.
- 71) Cox S.D, Mann C.M, Markham J.L., (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.*, **91**: 492-497.
- 72) Cuvelier M, Richard H, Berset C., (1992). "Comparaison of the antioxydant activity of some acid-phenols: structure-activity relationship." *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 324-325.
- 73) Damintoti K, Mamoudou H.D, Simpore J, Traore A.S., (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afric. J. Biotech.*, **4** (8): 823-828.
- 74) De Gaulejac S.C, Provost N, Vivas N., (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J. Agri. Food Chem.*, **47**: 425-431.
- 75) De Rijke E, Out P, Nissen W.M.A, Ariese F, Gooijer C, Brinkman U.AT.,(2006).Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromato. A*, **1112**: 31-63.
- 76) Deans S.G, Svoboda K.P., (1990). The antimicrobial properties of *Origanum majorana* L. volatile oil. *Flav. Fragr. J.*, **5**:187-190.
- 77) Decourtye A, Devillers J., (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **683**:85-95.
- 78) Degryse A.C, Delpla I, Voinier M.A., (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.
- 79) Del Campo J, Amiot M.J, Nguyen C., (2000). The Antimicrobial effect of Rosemary extracts. *J. Food Prot.*, **63**(10):1359-1368.
- 80) Delaquis P.J, Stanich K, Girard B, Mazza G., (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *I. J. Food Microbio.*,
- 81) 74(1-2):101-109.
- 82) Desport J.C, Couratier P., (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nut. clinique et Métab.* ,**16** : 253–259.
- 83) Deysson G., (1979). Organisation et classification des plantes vasculaires, cours de botanique générale. 4<sup>eme</sup> Ed., tome II, Paris, 529 pp.
- 84) Dorman H.J.D, Deans S.G., (2000). Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, **88**: 308-316.
- 85) Dufresne C., (2008). Documentation d'une technologie simple pour le séchage de plantes médicinales à la ferme. Filière des plantes médicinales biologiques du Québec, Magog, 35 p.

- 86) Dupont F, Guignard J.L., (2007). Systématique moléculaire, Abrégé de botanique, 14<sup>ème</sup> Ed, Masson, Issy-les-Moulineaux, 285 pp.
- 87) Duraffourd C, Hervicourt L, Lapraz J.C., (1990). Cahier de phytothérapie clinique, examen de laboratoire galénique, éléments thérapeutiques synergique. *Ed. Masson, Tome I.* Paris, 89p.
- 88) Duraffourd C, Lapraz J.C, Chemli R., (1997). La plante médicinale de la tradition à la science. 1<sup>er</sup> congrès International Tunis : De l'usage empirique à la phytothérapie clinique. *Ed. Granche.* Paris, 222p.
- 89) Eldomiaty M.M., (1992). Improved High-Performance Liquid-Chromatographic determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits and Pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Sci.*, 81:475-478.
- 90) El-Kalamouni C., (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, Thèse de Doctorat en Sciences des Agroressources, l'Institut National Polytechnique, université de Toulouse, 263p.
- 91) Epifano F, Genovese S, Menghini L, Curini M., (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Rev. Phytochem.*, 68:939-953.
- 92) Erkmén O, Özcan M., (2004). Antimicrobial effects of essential oils on growth of bacteria, yeasts and molds. *J. Ess. Oil Bear. Plants*, 7 (3):279-287.
- 93) Escribano-Bailon M.T, Santos-Buelga C., (2003). Polyphenols Extraction from Foods. *in: Methods in Polyphenol Analysis* (eds.C. Santos-Buelga, G.Williamson). Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, pp. 1–16.
- 94) Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C., (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.*, 331: 372-379.
- 95) Farag R.S, Salem H, Badei A, Hassanein D.E., (1986). Biochemical studies on the essential oil of some medicinal plants. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 88 (2): 69–72.
- 96) Favier A., (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*: 108-115.
- 97) Ferhat M.A, Meklati B.Y, Smadja J, Chemat F., (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J. Chromatogr. A*, 1112: 121-126.
- 98) Ferrell J.E, Chang-Sing P.D, Loew G, King R, Mansour J.M, Mansour T.E., (1979). Structure/ activity studies of flavonoids as inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase and relationship to quantum chemical indices. *Mol. Pharmacol.*, 16:556-568.

- 99) Festy D, Pacchioni I., (2014). Guide de poche d'aromathérapie : des huiles essentielles pour se soigner en toute simplicité. *Ed Leduc*, 160p.
- 100) Fontaine E, Barnoud D, Schwebel C, Leverve X., (2002). Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11: 411-420.
- 101) Gadjeva V, Kuchukova D, Georgieva R., (2005). Vitamin combinations reduce oxidative stress and improve antioxidant status in patients with iron deficiency anemia. *Comp. Clin. Path.*, 14: 99–104.
- 102) Garnéro J., (1996). Huiles essentielles. *Techniques de l'Ingénieur*, traité Constantes physicochimiques ; K 345-1:39p.
- 103) Gattefossé J., (1952). L'*Ammi visnaga* et la Khelline. *Revue Int. Bota. Appl. Agri. Tropic*: 116-123.
- 104) Ghareeb A.M, Zedan T.H, Gharb L.A., (2011). Antibacterial and antifungal activities of *Ammi visnaga* extracts against pathogenic microorganisms. *Iraqi J. Sci.*, 52: 30-36.
- 105) Ghoneim<sup>(a)</sup> K, Amer M, Al-Daly A, Mohammad A, Khadrawy F, Mahmoud M.A., (2014). Disturbed acid and alkaline phosphatase activities in desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae) by extracts from the khella plant *Ammi visnaga* L. (*Apiaceae*). *Int. J. Adva. Res.*, 2 (5): 584-596.
- 106) Ghoneim<sup>(b)</sup> K, Amer M, Al-Daly A, Mohammad A, Khadrawy F, Mahmoud M.A., (2014). Effects of *Ammi visnaga* L. (*Apiaceae*) extracts on the main metabolites in haemolymph and fat bodies of *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). *J. Adva. Zoology*, 1 (1):11-23.
- 107) Gil M.I, Tomas-Barberan F.A, Hess-Pierce B, Kader A.A., (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4976-4982.
- 108) Gitenay D, Lyan B, Rambeau M, Mazur A, Rock E., (2007). Comparison of lycopene and tomato effects on biomarkers of oxidative stress in vitamin E deficient rats. *Eur. J. Nutr.*, 46:468–475.
- 109) Gomez-Caravaca A.M, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A., (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 41: 1220-1234.
- 110) Goudable J, Alain F., (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Metabol.*, 11:115-120.
- 111) Grange J.M, Davey R.W., (1990). Detection of antituberculous activity in plant extracts. *J. Appl. Bact.*, 68:587-591.

- 112) Greiner T, Gold H, Cattell M, Travell J, Bakst H, Rinzler S.H, Benjamin Z. H, Warshaw L. J, Bobb A. L, Kwit N. T, Modell W, Rothendler H.H, Messei C.R, Kramer M.L., (1950). Clinical Studies: A method for the evaluation of the effects of drugs on cardiac pain in patients with Angina of Effort: *A Study of Khellin (Visammin)*. *Am. J. Med.*, 9: 143-144.
- 113) Günaydin K, Beyazit N., (2004). The chemical investigations on the ripe fruits of *Ammi visnaga* (Lam.) Lamarck growing in Turkey. *Nat. Pro. Res.*, 18(2):169–175.
- 114) Günaydin K, Erim F.B., (2002). Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits by capillary electrophoresis. *J. Chromat. A*, 954:291–294.
- 115) Gurbuz I, Yesilada E, Ito S., (2009). An antiulcerogenic flavonols diglucoside from *Equisetum palustre* L. *J. Ethnopharmacol.*, 121:360-365.
- 116) Hashimi S, Asad J, Khan B.M, Muhammad Azim K., (2014). Phytochemistry and medicinal properties of *Ammi Visnaga* (APIACEAE). *Pak. J. Bot.*, 46(3): 861-867.
- 117) Hajji F, Fkih-Tantaoui S, Tantaoui-Eiaraki A., (1993). Antimicrobial activity of twenty one *Eucalyptus* essential oils. *Fitoterapia*, (1): 71-78.
- 118) Hammouda F.M, Ismail S.I, Abdel-Azim N.S, Shams K.A., (2005). *Ammi visnaga* L. Apiaceae (Umbelliferae). *A Guide to Medicinal Plants in North Africa* : 27-28.
- 119) Hegnauer R., (1973). *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, 6, 761p.
- 120) Hemaiswarya S, Kruthiventi A.K, Doble M., (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639-652.
- 121) Hitara T, Fujii M, Akita K, Yanaka N, Ogawa K, Kuroyanagi M, Hongo D., (2009). Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorganic & Med. Chem.*, 17: 25- 28.
- 122) Hitokoto H, Morozumi S, Wauke T, Sakai S Kurata H., (1980). Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39 : 818-828.
- 123) Ho S.H, Ma Y, Goh P.M, Sim K.Y., (1995). Star anise, *illicium verum* Hook F. as a potential grain protectant against *Tribulium castateum* (Herbst) and *Silophilus zeumais* Motsch. *Postharvest Biol. Tech.*, 6: 341-347.
- 124) Hopkins W.G., (2003). *Physiologie végétale. Ed. De Boeck Supérieur*, 532 p.
- 125) Hörhammer L, agner H, Kraemer-Heydweiller D., (1966). Terephthalsäure dimethyl ester in den Blüten von *Sarothamnus scoparius* L. *Naturwissenschaften*, 53(2):584p.
- 126) Hoyaux J.M., (2002). *Vocabulaire de l'apiculture: illustré d'extraits littéraires. Press Agronomique de Gembloux*, 279p.

- 127) Hua L, Xiaoyu W, Peihong L, Yong L, Hua W., (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *J. Food. Drug Analysis*, 16 (6): 67-73.
- 128) Huang D, Ou B, Prior R.L., (2005). "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *J. Agric. Food Chem.*, 53 (6), 1841–1856.
- 129) Hudsin J, Tower G.H.N., (1999). Phytomedicines as antivirals. *Drugs of the Future*, 24: 295-320.
- 130) Hussain A.I, Anwar F, Sherazi T.H.S, Przybylski R., (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemi.*, 108: 986-995.
- 131) IRAC., (2009). All Methods\_2. Susceptibility test methods series. Version 2. Method N° 1. Site Web <http://www.illac-online.org>
- 132) Iserin P *et al.*, (2001). Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, Préparations, Soins. *Ed. Larousse*, 335p.
- 133) Isikber A.A, Alma M.H, Kanat M, Karci A., (2006). Fumigant toxicity of essential oils from *Laurus nobilis* and *Rosmarinus officinalis* against all life stages of *Tribolium confusum*. *Phytoparasitica*, 34 (2): 167–177.
- 134) Islam M.S, Hasan M.M, Xiong W, Zhang S.C, Lei C.L., (2009). Fumigant and repellent activities of essential oil from *Coriandrum sativum* (L.) (Apiaceae) against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. of Pest Sci.*, 82:171–177.
- 135) Ito C, Itoogawa M, Onoda S, Hosokawa A, Ruabgrungsi N, Okuda T, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H., (2005). Chemical constituents of *Murraya Siamensis* : three coumarins and their antitumor promoting effect. *Phytochem.*, 66:567-572.
- 136) Jeong S.M, Kim S.Y, Kim D.R, Jo S.C, Nam K.C, Ahn D.U, Lee S.C., (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J. Agri. Food Chem.*, 52: 3389–3393.
- 137) Joffin J.N, Leyral G., (2006). Microbiologie technique : Dictionnaire de la technique. 4<sup>ème</sup>ED. Centre régionale de documentation pédagogique d'Aquitaine, 368p.
- 138) Jouad H, Maghrani M, Eddouks M., (2002). Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Ammi visnaga* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Herb. Pharmacotherapy*, 2(4):19-29.
- 139) Keskitalo M, Pehu E, Simon J. E., (2001). Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29(3): 267-285.

- 140) Khadhri A, El Mokni R, Mguis K, Ouerfelli I, Araújo M.E.M., (2011). Variability of two essential oils of *Ammi visnaga* (L.) Lam. a traditional Tunisian medicinal plant. *J. Med. Plants. Res.*, 5(20): 5079-5082.
- 141) Khalfallah A, Labed S.Z, AI Kaki B, Kabouche A, Touzani R, Kabouche Z., (2011). Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) from Constantine, Algeria. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 1(3):302-305.
- 142) Kiehlbauch J.A, Hannett G.E, Salfinger M, Archinal W, Monserrat C, Carlyn C., (2000) Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards Guidelines for Disk Diffusion Susceptibility Testing in New York State Laboratories . *J. Clinic. Microbiol.*: 3341–3348.
- 143) Kilicaslan I, Coskun S., (2012). Spontaneous stone passage: is it *Ammi visnaga* effect?. *Urol. Res.*: 508-509.
- 144) Kim J.Y, Lim H.J, Lee D.Y, Kim D.H, Jeon R, Ryu J.H., (2009). In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic. Med. Chem. Letters*, 19: 937 -940.
- 145) Kothe W.H., (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales de A à Z propriétés et usages. *Terre Ed.*, 335p.
- 146) Kubata B.K, Nagamune K, Murakami N, Merkel P, Kabututua Z, Martin S.K, Kalulug T.M, Mustakuk H, Hoshida M, Ohnishi-kameyama M, Kinoshita T, Duszenko M, Uradea Y., (2005). *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *Int. J. Parasit.*, 35: 91- 103.
- 147) Kubas J., (1972). Investigations on known or potential antitumoural plants by means of microbiological tests. Part III. Biological activity of some cultivated plant species in *Neurospora crassa* test. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 15: 87-100.
- 148) Lahlou M., (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *Phytotherapy Res.*, 18:435-448.
- 149) Lamiri A, Lhaloui S, Benjilali B, Berrada M., (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field .Crops. Res.*, 71: 9–15.
- 150) Lanzmann-Petthory D, Odile J., (2002). La diététique de la longévité, 357p.
- 151) Larson R.A., (1997). "Naturally occurring antioxidants." *Ed. Boca Raton* : Lewis publishers, CRC Press, 208p.
- 152) Le Floc'h E, Boulos L, Vela E., (2010). Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie, 499p.

- 153) Leccia M.T., (2008). Antioxydants et photoprotection : prudence. *Annales de dermat.et de vénéréologie*, 135(12) :807-809.
- 154) Legrand P., (2007). Les acides Gras : Structures, Fonctions, Apports Nutritionnels Conseillés. *Cah. Nutr. Diét.*, 42 (1) :7-12.
- 155) Libbey J., (2009). Progrès en dermato-allergologie. *Ed Eurotext*, Bordeaux, 391p.
- 156) Lutge U, Kluge M, Bauer G., (2002). Botanique 3<sup>ème</sup> Ed. *Tec. et Doc. Lavoisier. Paris*, 211p.
- 157) Maataoui B.S, Hmyene A, Hilali S., (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Sc.J.*, 7(1):3-8.
- 158) Macheix J.J, Fleuriet A, Jay-Allemand C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, 1<sup>ère</sup> Ed., 192 p.
- 159) Madan Pandey M, Vijayakumar M, Rastogi S, Ajay Rawat K.S.,(2012). Phenolic content and antioxidant properties of selected Indian spices of *Apiaceae*. *J. of Herbs, Spices & Medic. Plants*, 18:246–256.
- 160) Madhavi D.L, Deshpande S.S, Salunkhe D.K., (1996). Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspective. New York: Marcel Dekker, CRS Press: 515p.
- 161) Magan N, Olsen M., (2004). Mycotoxines in food: Detection and control. *Woodhead Publishing in Food Science and Technology*: 190-203.
- 162) Mahmoud, A.L.E., (1999). Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29: 334-336.
- 163) Maihebiau P., (1994). La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. *Lausanne*, 635p.
- 164) Malan K, Dusart G, Marion C., (1986). Activité antibactériennes de l'huile essentielle d'*Hyptis pectinata*. *Plant. Med. Phytother.*, 20 (4) : 323-329.
- 165) Mamyrbékova-Békro J.A, Konan K.M, Békro Y.A, Djié Bi M.G, Zomi Bi T.J, Mambo V, Boua Boua B., (2008). Phytocompounds of the extracts of four medicinal plants of Cote D'Ivoire and assessment of their potential antioxydant by thin Layer Chromatography. *Europ. J. Scient. Res.*, 24 :219-228.
- 166) Mann J, Daridson R.S, Hobbs J.B, Banthorope D.V, Harborne J.B., (1994). Natural products: Their Chemistry and biological Significance, 1<sup>ère</sup> Ed. *Addison Wesley Longman* , Harlow, UK 11.
- 167) Mantell Serrano C, Munoz Cueto M. J, Galan Vallejo M, Rodriguez Rodriguez M., (1995). Estudio de mezclas de disolventes orgánicos y triglicéridos de aceite de linaza o los ácidos grasos libres. I: Volumen molar, refracción molar y viscosidad dinámica = A study

- of mixtures of organic solvents and triglycerides of linseed oil or the free fatty acids. I: Molar volume, molar refraction and dynamic viscosity. *Grasas y aceites*, 46(3): 183-195.
- 168) Marhuenda Requena E, Alarcon de la Lastra C, Garcia-Gimenez M.D., (1987). Demonstration of antibacterial properties of phenolic acids from *Thymus camosus* Boiss. Isolation of caffeic, vanillic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic and syringic acids *Plant. Med. Phytother.*, 21(2):153-159.
- 169) Marinova E, Yanishlieva N., (1992). "Inhibited oxidation of lipids II: comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids". *Fat Scie. Tec.*, 94: 428-432.
- 170) Markham K.R., (1982). Techniques of flavonoid identification. Biological Techniques Series. Ed. Treherne J.E et Rubery P.H. Academic Press, 113p.
- 171) Markowicz Bastos D.H, Saldanha L.A, Catharino R.R, Sawaya, A.C.H.F, Cunha I.B.S, Carvalho P.O, Eberlin M.N., (2007). Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*, 12: 423-432.
- 172) Martelli P, Bovalini L, Ferri S, Franchi G.G., (1984). Rapid separation and quantitative determination of Khellin and Visnagin in *Ammi visnaga* (L.) Lam Fruits by High Performance Liquid-Chromatography. *J. Chromato*, 301:297-302.
- 173) Masquelier J, Dumon M, Dumas J., (1979). Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique*, 1 : 101-104.
- 174) Maupetit P., (1994). Nouveaux constituants de l'essence d' *Ammi visnaga* (L.) Lam. Actes des 11es journées internationales des huiles essentielles. Digne-les-Bains. Rivista Italiana EPPoS, n' spe., 95-246.
- 175) Mayachiew P, Devahastin S., (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food .Sci. Tech.*, 41: 1153-1159.
- 176) Meddour A, Yahia M, Benkiki N, Ayachi A., (2013). Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis spinosa* L. *Lebanese Scie. J.*, 14(1):49-59.
- 177) Meiouet F, El Kabbaj S, Daudon D., (2011). Étude in vitro de l'activité litholytique de quatre plantes médicinales vis-à-vis des calculs urinaires de cystine. *Prog. Urol.*, 21(1): 40-47.
- 178) Melts M.L, Mac Gregor J.T., (1981). Activity of the plant flavanol quercetin in the mouse lymphoma L5178Y TKp/- mutation, DNA single-strand break, and Balb/c 3T3 chemical transformation assays. *Mutat. Res.*, 88:317- 324.
- 179) Menghini A, Louini A, Caprio A., (1987). Activité anti microbienne en contact direct et en microatmosphère de certaines huiles essentielles. *Plant Med. Phytother.*, 21 (1) : 36-42.

- 180) Miller N.J, Castelluccio C, Tijburg L, Rice-Evans C., (1996). "The antioxidant properties of the aflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators." *FEBS Letters*, 392: 40-44.
- 181) Millet J, Michel D., (1987). Etude préliminaire des propriétés fongistatiques de la propolis. *Plant Med. Phytother.*, 21 (1):3-7.
- 182) Modesto R.R , Tejada-Cano A, Pinto M. D. C, Macias P., (2004). Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation. *J. Molec. Str: THEOCHEM*, 674, (1-3), 121-124.
- 183) Molyneux P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity .*Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26: 211-219.
- 184) Monpon B, Mengal P, Behn Dm Bellido M., (1993). Extraction of essential oil by microwave. *Parfums Cosmet. Aromes*, 114:66–67.
- 185) Morel Y, Barouki R., (1999). Repression of the gene expression by oxydatif stress. *Biochem. J.*, 342 (3): 481- 496.
- 186) Moure A, Cruz J.M, Franco D, Dominguez J.M.t, Sineiro J., (2001). "Natural antioxydants from residual sources." *Food Chem.*, 72: 145-171.
- 187) Muanda F.N., (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques .Thèse de Doctorat de l'Université Paul Verlaine-Metz, 294p.
- 188) Namiki M., (1990). "Antioxidants/Antimutagens in Food". *CRC critical reviews in Food Sci. Nut.*, 29: 273-300.
- 189) NCCLS<sup>(a)</sup>: National committee for clinical laboratory standards: performance standards for antimicrobial disk susceptibility; Approved standard- Ninth Edition M2-A9.,(2006), 26 (1): 57p.
- 190) NCCLS<sup>(b)</sup>: National committee for clinical laboratory standards: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard- Seventh Edition.,(2006) M7-A7, 26 (2):64p.
- 191) Nebeling L., (2002). Phytochemicals: The color of a Healthy Diet. *Pediatric Basics*, 98:1-9.
- 192) Neuzil J, Stocker R., (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *F.E.B.S Lett*, 331 (3): 281 - 284.
- 193) Nève J., (2002). Modulation de l'apport alimentaire en antioxydants Optimisation of dietary intake of antioxidants. *Nut. Clin. Métab.*, 16: 292–300.
- 194) Newman D.J, Cragg G.M, Snader K.M., (2000). *Natural. Prod. Rep.*, 17: 175-285.

- 195) Nielson B. E, Lemmich J., (1964). Constituents of Umbelliferous plants: III. The structure of Archangelician, a coumarin from *Angelica archangelica* L. subsp. *litoralis* Thell. *Acta. Chem. Scand*, 18: 932- 936.
- 196) Nordman R, Ribiere C, Rouach H., (1992). Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad. Biol. Med.*, 12: 219-40.
- 197) Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y., (1993). Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem.*, 33: 557-561.
- 198) Oke F, Aslim B, Ozturk S, Altundag S., (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem.*, 112: 874–879.
- 199) Ouahas R, Devalez B., (1988). Chimie générale, *Ed. 4: OPU, Paris*, 504p.
- 200) Oyaizu M., (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. *Jpn. J. Nutr.*, 44: 307 - 314.
- 201) Paloma F., (2012). Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. Thèse de Doctorat en pharmacie, faculté de Pharmacie de Grenoble. Université JOSEPH FOURIER, 139p.
- 202) Papachristos D.P, Stamopoulos D.C., (2002). Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored. Prod. Res.*, 38:117-128.
- 203) Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C., (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food. Chem.*, 50:6882–6890.
- 204) Paris R.R, Moyse H., (1965). Précis de matière médicale. *Ed. Masson et Cie*, Tome I, 416p.
- 205) Pascual-Villalobos M.J, Robledo A., (1998). Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Ind. Crops Prod.*, 8:183–194.
- 206) Pattnaik S, Subramanyam V.R, Bapaji M, Kale C.R., (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89 (358): 39-46.
- 207) Pavela R., (2008). Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Res.*, 102: 555–559.
- 208) Pavela R., (2009). Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae), *Parasitology Res.*, 105: 887-892.
- 209) Pelczar M.J, Chan E.C.S, Krieg N.R., (1993). Control of Microorganism: Chemical Agents in Microbiology: Concepts and Applications. McGraw-Hill, New York, 926p.

- 210) Perry R.J, Watson P, Hodges J.R ., (2000). The nature and staging of attentional dysfunction in early (minimal and mild) Alzheimer's disease: Relationship to episodic and semantic memory impairment. *Neuropsychologia*, 38: 252-271.
- 211) Pibiri M.C., (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, Lausanne, Canada, 177p.
- 212) Pietta P.G., (2000). "Flavonoids as antioxidants." *J. Nat. Prod.*, 63: 1035-1042.
- 213) Pincemail J, Lecomte J, Collart E, Castiaux J.P, Defraigne J.O., (2001). Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 6 (5) :1-3.
- 214) Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J.O., (2002). Nutrition et stress oxydant: Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante, Physiological action of antioxidant defences. *Nut. Clin. Métab.*, 16:233–239
- 215) Pirali-Kheirabadi K, Da Silva J.A.T., (2010). *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) control. *Exper. Parasitol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.012>.
- 216) Pitasawat B., (2006). Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. *Parasitol. Res.*, 99: 715– 721.
- 217) Podsedek, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol.*, 40: 1-11.
- 218) Prakash A., (2001). Antioxidant activity. *Medallion Laboratories analytical progress*, Plymouth Ave North, Minneapolis, 1-4.
- 219) Pratt D.E ., (1980). "Natural antioxidants of soybean and other oil seeds". *Autoxidation in food and biolog. Sys*: 283-293.
- 220) Price M.L, Van Scoyoc S, Butler L.G., (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 1214-1218.
- 221) Queiroga C.L, Teixeira Duarte M.C, Baesa Ribeiro B, Magalhães P.M., (2007). Linalool production from the leaves of *Burseraaloeoxylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia*, 78: 327–328 .
- 222) Quézel P, Santa S., (1962 - 1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. Ed. du Centre National de la Recherche Scientifique(CNRS), Paris : 677p.
- 223) Rana T, Kashmiri M.A, Ahmed M., (2010). Studies of antioxydant activity of essential oils of Umbelliferae family. *Pakistan J. Sci.*, 62(2):67-70.
- 224) Rasooli I, Taghizadeh M, Astaneh S.D, Rezaei M. B, Jaimand K ., (2007). *Int. J. Essent. Oil Ther.* , 1:72.

- 225) Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice- Evans C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 26: 1231-1237.
- 226) Regnault -Roger C., (2005). Molécules allélochimiques et extraits végétaux dans la protection des plantes : nature, rôle et bilan de leur utilisation au XX<sup>e</sup> siècle. In : Regnault R C : enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. *Ed. Tec. et Doc., Lavoisier.* Paris : 625-650.
- 227) Regnault-Roger C, Hamraoui A., (1997). Lutte contre les insectes phytophages par les plantes aromatiques et leurs molécules allélochimiques. *Acta bot. Galica*, 144 (4) : 401-412.
- 228) Regnault-Roger C., (2014). Produits de protection des plantes : Innovation et sécurité pour une agriculture durable. *Ed Lavoisier*, 368p.
- 229) Reverchon E, De Marco I., (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. of Supercritical Fluids*, 38 : 146–166.
- 230) Riberau-Gayon P., (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Ed. Dunod*, 243p.
- 231) Ricardo da Silva J.M, Darmon N, Fernandez Y, Mitjavila S., (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agr. and Food Chem.*, 39: 549-1552.
- 232) Rice-Evans C.A, Miller N.J, Paganga G., (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20:933–956.
- 233) Richard F., (1992). Manuel des corps gras. *Ed. Lavoisier, Tec. et Doc.*, Paris:1228-1242.
- 234) Robert K.M.H, Waterman K.M, Peter G., (1993). Volatil oil crops: Their biology, Biochemistry and production. *Longman Scientific and Technical*, U.K, 185p.
- 235) Robert L.B, Wilson L.T., (1989). *Ammi visnaga* (L.) Lamarck (*Apiaceae*) associated beneficial insects and implications for biological Control, with Emphasis on the Bell-Pepper Agroecosystem. *Biol. Agr. Hort.*, 6: 24 1-268.
- 236) Rodolfo J, Koroch A, Simon J, Hitimana N., (2006). Quality of geranium oils: case studies in southern and eastern Africa. *J. Essent. Oil Res*, 18: 116-121.
- 237) Ronchetti F, Russo G., (1971). A new alkaloid from *Rauvolfia*. *Phytochem*, 10: 1385-1388.
- 238) Rose J, Hulbud J, Edouard V, Norton T., (1992). The aromatherapy book: Application and Inhalations. *North Atlantic Books. Berkeley*, 377 p.
- 239) Ross J.D, Sombrero C., (1991). Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. *Clarendon Press*, Oxford, 439 p.

- 240) Roux D, Kluwer W., (2008). Conseil en aromathérapie. 2<sup>ème</sup> Ed. *Wolters Kluwer, France*, 187p.
- 241) Ruščić M, Nikolić T., (2011). *Ammi visnaga* (L.) Lam. (*Apiaceae*), a new taxon in Croatian flora. *Acta Bot. Croat.*, 70 (2):301–306.
- 242) Said S, Moselhy Æ, Al mslmani M.A.B., (2008). Chemopreventive effect of lycopene alone or with melatonin against the genesis of oxidative stress and mammary tumors induced by 7, 12 dimethyl(a) benzanthracene in sprague dawely female rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 319:175–180.
- 243) Salah N, Miller N.J, Paganga G, Tijburg L, Bolwell G.P, Rice-Evans C.A., (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochem. and Biophysics*: 339-346.
- 244) Sallé J.L, Pelletier J., (2004). Les huiles essentielles : Synthèse d'aromathérapie. 2<sup>ème</sup> Ed., *Frison –Roche*. Paris, 168p.
- 245) Sallé J.L., (1999). Le Totum en phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie. Ed. *Frison-Roche*. Paris, 239p.
- 246) Sánchez-Moreno C, Larrauri J.A, Saura-Calixto F., (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sc. Food. Agr.*, 76:270-276.
- 247) Sannomiya M, Fonseca V.B, Da Silva M.A., Rocha L.R.M, Dos Santos L.C, Hiruma-Lima A, Britoc A.R.M.S, Vilegas W., (2005). Flavonoids and antiulcerogenic activity from *rsonima crassa* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol*, 97: 1- 6.
- 248) Sanon A, Garba M, Auger J, Huiganrt J., (2002). Analysis of insecticidal activity of methulisocyanate on *Callosobruchus maculatus* and its parasitoid *Dinarmus basalis*. *J. Stored Prod. Res.*, 38:129-138.
- 249) Satrani B, Farah A, Fechtal M, Talbi M, Bouamrani L.M., (2004). Composition chimique et activité antibacterienne et antifongique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (L.) Lam . du Maroc. *Acta Bot. Gallica*, 151(1): 65-71.
- 250) Scandalios J.G., (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian .J. Med. Biolog. Res.*, 38: 995-1014.
- 251) Sellami H.K, Flamini G, Cioni P.L, Smiti S., (2011). Composition of essential oils in various organs at different development stages of *Ammi visnaga* (L.) from Tunisia. *Chem and Biod*, 8:1990-2004.
- 252) Sellami H.K, Napolitano A, Masullo M, Smiti S, Piacente S, Pizza S., (2013). Influence of growing conditions on metabolite profile of *Ammi visnaga* umbels with special reference to bioactive furanochromones and pyranocoumarins. *Phytochem*. 95: 197-206.

- 253) Sergent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J., (2002). Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.*, 49: 689-95.
- 254) Seshadri T.R, Vishwapaul., (1973). Recent Advances in Naturally Occurring Coumarins. *J. Sci. Ind. Res.*, 32: 227.
- 255) Seu-Saberno M, Blakway J., (1987). La mousse de chêne, une base de la parfumerie. *Pour la science, Ed. Française de Scientific American*, 83p.
- 256) Sharma Om P, Bhat Tej K., (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chem.*, 113 (4): 1202-1205.
- 257) Shon H.Y, Son K.H, Kwon C.S, Kang S.S., (2004). Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medical plants: *Morus alba Echinosophara koreesis Nakai*. *Phytomed.*, 11: 666 - 672.
- 258) Singleton V.L, Rossi J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enology. Viticult.*, 16:144-158.
- 259) Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L., (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food borne pathogens. *Let. Appl. Microbiol.*, 26: 118-122.
- 260) Smyth T, Ramachandran V.N, Smyth W.F., (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int. J. antimicrob. Agents*, 33:421-426.
- 261) Soine T.O., (1964). Naturally occurring coumarins and related physiological activities. *J. Pharm. Sci*, 53(3): 231-264.
- 262) Stefan M, Zamfirache M, Padurariu C, Truta E, Gostin I., (2013). The composition and antibacterial activity of essential oils in three *Ocimum* species growing in Romania. *Cent. Eur. J. Biol*, 8: 600–608.
- 263) Subhash K, Bose C, Agrawal B.K., (2007). Effect of short term supplementation of tomatoes on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type –II diabetes. *Indian. J. Clin. Biochem.*, 22 (1): 95-98.
- 264) Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger S.W., (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *J. Agric. Food. Chem.*, 51: 3197–3207.
- 265) Svoboda K.P, Hampson J.B., (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Proceedings of the chemicals speciality for the 21<sup>st</sup> century ADEME/IENICA Seminar, Sept.16-17, ADEME, Paris : 43-49.
- 266) Svoboda K.P, Svoboda T., (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants: A Review and Atlas of micrographs. *Ed. Microscopix Publications*, Knighton: 7-12.

- 267) Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommes J., (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.*, 113: 1226-1233.
- 268) Talaat I.M, Khattab H.I, Ahmed A.M., (2014). Changes in growth, hormones levels and essential oil content of *Ammi visnaga* L. plants treated with some bio-regulators. *Saudi. J. Biol. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.10.008>.
- 269) Tang G.W, Yang C.J, Xie L.D., (2007). Extraction of *Trigonella foenum-graecum* L. by supercritical fluid CO<sub>2</sub> and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). *J. Pest. Sci.*, 80: 151–157.
- 270) Tantaoui-Eiaraki A , Lattaoui Nerrifi A ., (1993). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus broussonetti*, *T. zygis* and *T. saturei* oides. *J. Essent. Oil Res.*, 5: 45-53.
- 271) Tawaha K, Alali F.Q , Gharaibeh M , Mohammad M , El-Elimat T., (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*, 104(4) : 1372–1378.
- 272) Teissière P., (1977). «L'actualité chimique», La chimie des parfums (1<sup>ère</sup> partie), 7.
- 273) Teuscher E, Anton R, Lobstein A., (2005). Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Edition Tec & Doc, Lavoisier*, 521p.
- 274) Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros- Zevallos L, Bryne D.H., (2006). Comparaison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Composition and analysis*, 19: 669-675.
- 275) Thukaa Z.A, Kawkab S, Abdul- Mutalib A.N., (2010). Phytochemical study of some flavonoids present in the fruits of Two *Ammi* L. species wildly grown in Iraq. *Iraqi. J. Pharm. Sci.*, 19 (1):48-57.
- 276) Tomi F, Casanova J., (2000). Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles. *Ann. Fals. Expert. Chim.*, 93 (952): 313-329.
- 277) Torres de pinedo A, penalver P, Morales J.C., (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic- based antioxydants: Structure- activity relationship. *Food Chem.*, 103:55-61.
- 278) Tripoli E, Guardia M .L, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M., (2007). Review Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: *Food Chem.*, 104: 466 - 479.
- 279) Turkmen N, Velioglu Y.S, Sari F, Polat G., (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12: 484-496.

- 280) Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C.J, Telser J., (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 266: 37–56.
- 281) Vallée C, Bilodeau G., (1999). Les techniques de culture en multicellules. *Press Université Laval*, 394p.
- 282) Valnet J, Duraffourd C.H, Duraffourd P, Cilapraz J., (1978). L'aromatogramme: nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant Med. Phytother.*, 1: 43-52.
- 283) Vanachayangkul P., (2008). *Ammi visnaga* L. for the prevention of Urolithiasis . Thèse de Doctorat. Université de Florida, 116p.
- 284) Vansant G., (2004). Radicaux libres et antioxydants : Principe de base. *Symposium « antioxydant et alimentation »*. Institut DANONE.
- 285) Viswanath V, Urooj A, Malleshi N.G., (2009). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of finger millet polyphenols (*Eleusinecoracana*). *Food Chem.*, 114:340–346.
- 286) Vuorela S., (2005). Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. *Ed. University of Helsinki*, 76p.
- 287) Wagner H, Blatt S., (2001). Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas. (2<sup>nd</sup> Ed.) Springer, Berlin: 349-364.
- 288) Wanasundara U.N, Shahidi F., (1994). "Stabilization of canola oil with flavonoids". *Food Chem.*, 50: 393-396.
- 289) Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R., (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, 105: 940-949.
- 290) Wollgast J, Anklam E., (2000). Review on polyphénols in *Theobroma cacao* / changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.*, 33:423-447.
- 291) Yang F.L, Liang G.W, Xu Y.J, Lu Y.Y, Zeng L., (2010) . Diatomaceous earth enhances the toxicity of garlic, *Allium sativum*, essential oil against stored-product pests. *J. Stored Prod. Res.*, 46: 118–123.
- 292) Yrjonent T., (2004). Extraction and planar chromatographic separation techniques of analysis of natural products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, 64p.
- 293) Zaid A, Alaoui T, Benadelkrim I., (1992). Hypoglycémiant effects on rats of an association of *Ammi visnaga*, *Erythrea centarium* and *Thymus ciliatus* used by Moroccan traditional medicine. *Revue Marocaine de Pharmacognosie*, 8: 37-44.
- 294) Zaika L.L., (1988). Spices and herbs-their antimicrobial activity and its determination. *J. food and safety*: 9(2):97-118.

- 295) Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W., (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. *Food chem.*, 64 (4): 555-559.
- 296) Zrira S, Elamrani A, Pellerin P, Bessière J.M, Menut C, Benjilali B., (2008). Isolation of Moroccan *Ammi visnaga* oil: Comparison between Hydrodistillation, Steam Distillation and Supercritical Fluid Extraction. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 11(1): 30-35.

# *Annexes*

## Annexe 01:

**Tableau 1 :** Appareillages et verreries utilisés au laboratoire.

Appareillages	Verreries et autres matériels
<ul style="list-style-type: none"><li>-Balance électrique.</li><li>-Balance de précision.</li><li>-Broyeur électrique.</li><li>-Etuve.</li><li>-Spectrophotomètre.</li><li>-Rotavapeur.</li><li>-Centrifugeuse.</li><li>-Vortex.</li><li>-Agitateur magnétique.</li><li>-Micro-onde.</li><li>-Autoclave.</li><li>-Réfrigérateur.</li><li>-Plaque chauffante.</li><li>-Chambre à UV.</li><li>- Chauffe ballon</li><li>- Rota vapeur</li><li>- Chromatographie en phase gazeuse.</li><li>- Spectroscopie de masse</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Fioles.</li><li>-Tubes à essais.</li><li>- Entonnoirs.</li><li>-Pipettes pasteur.</li><li>-Pipettes graduée.</li><li>-Béchers.</li><li>-Ballon.</li><li>-Eprouvettes graduée.</li><li>-Erlenmeyer.</li><li>-Ballons à fond rond.</li><li>- Flacons.</li><li>- Portoir de tubes.</li><li>-Bec bunsen.</li><li>-Spatule.</li><li>- Cuiller.</li><li>- Boîtes pétri.</li><li>-L'anse de platine.</li><li>-Papier filtre.</li><li>-Plaques CCM.</li><li>-Cuve de CCM.</li><li>-Micropipette.</li><li>-Les embouts.</li><li>-Pince.</li><li>-Barreaux magnétiques.</li><li>-Cuve de CCM.</li><li>-Parafilm .</li><li>- Fioles.</li><li>- Pipette graduée.</li><li>- Ballon à col rodé</li><li>- Eprouvette.</li><li>- Papier filtre.</li></ul>

## Annexe 02:

### 1/ Les milieux de cultures :

- ✓ Milieux pour les cultures bactériennes :

#### Gélose nutritif(GN) :

- Bouillon nutritive ..... 1000ml.
- Agar-agar ..... 20g.
- Ajuster le PH à .....7,0.

#### Gélose de Mueller- Hinton:

- Extrait de viande ou de foie ..... 2g.
- Hydrolysate acide de caséine ..... 17,5g.
- Amidon ..... 1,5g.
- Eau distillée ..... 1000ml.
- Agar-agar ..... 20g.
- Ajuster le PH à ..... 7,4.

- ✓ Milieux pour les cultures fongiques :

#### Milieu PDA: (Gélose de pomme de terre dextrose agar).

- L'extrait de pomme de terre ..... 1000ml.
- Glucose ..... 20g.
- Agar-agar ..... 20g.
- Ajuster le PH à ..... 5,6 ±0,2.

#### L'extrait de pomme de terre est préparé comme suit :

200g de pomme de terre sont lavés, découpés en petites cubes et portés à l'ébullition pendant une heure dans 1000ml de l'eau distillée. Le filtrat est récupéré et est complété à 1000ml avec de l'eau distillée. après ajout de glucose et ajustement de PH, la solution à chaud est additionnée de 20g de agar-agar. Après tout le milieu est stérilisé par Autoclavage à 120°C pendant 30 minutes.

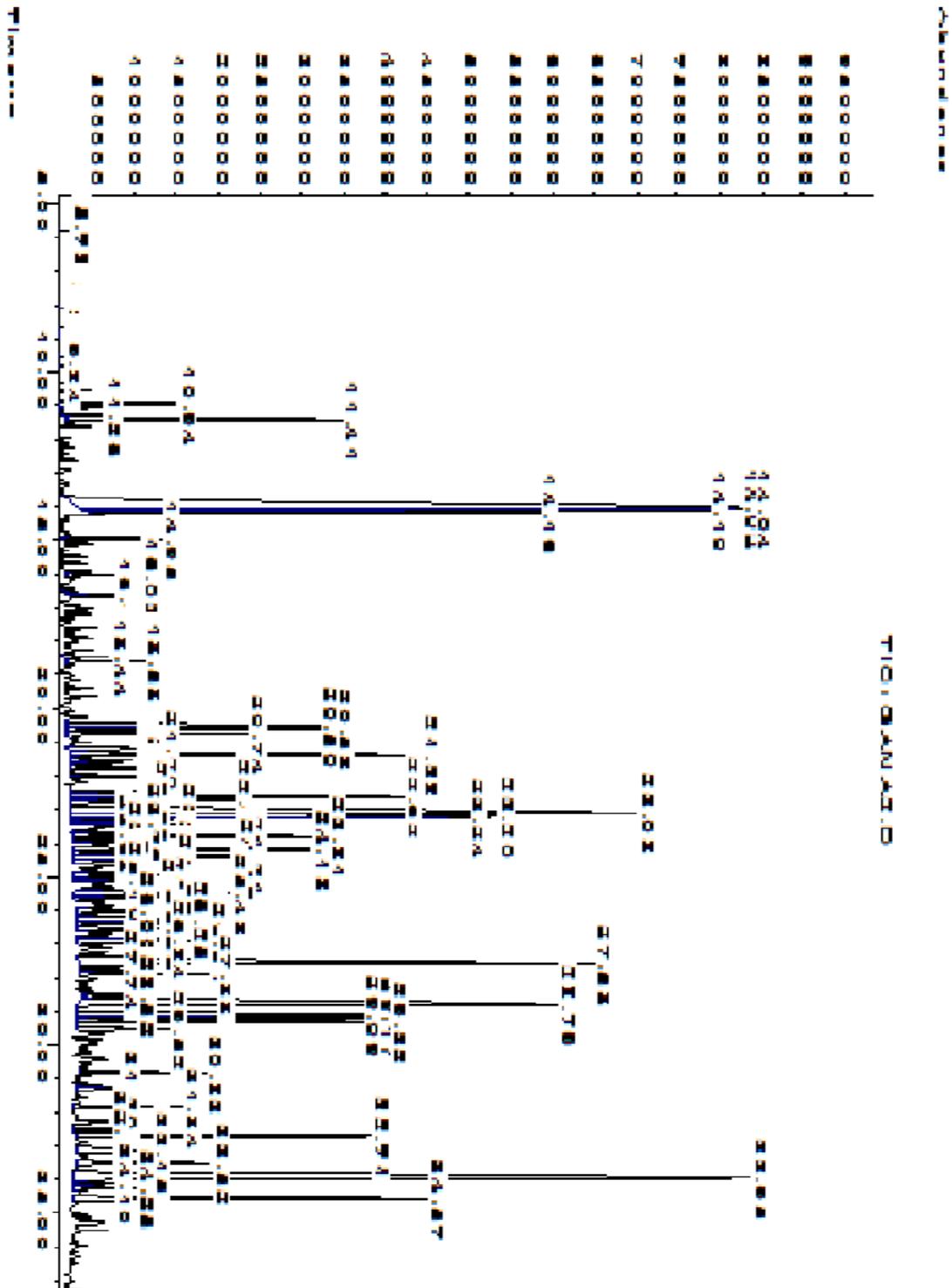
## 2/ Préparation des réactifs

**Tableau 2: Préparation des réactifs**

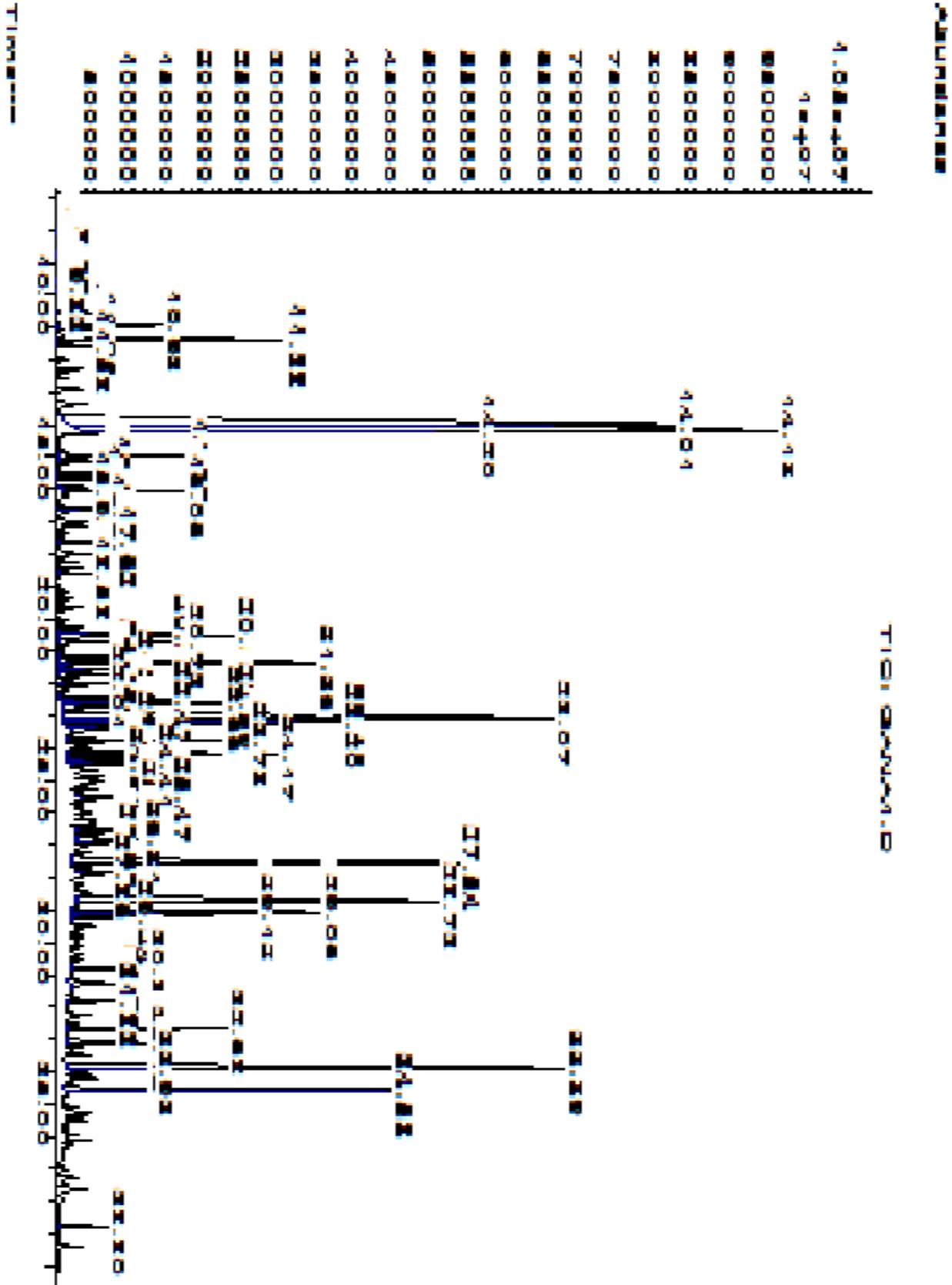
Réactifs	Préparation
Réactif d'amidon	1,2 g d'Iode + 50 ml d'eau distillée +2,5 g KI <sub>2</sub> dilué jusqu'à 50 ml d'eau
Réactif de Mayer	1,35 g MgCl <sub>2</sub> + 60 ml d'eau distillée mélanger puis ajuster à 100 ml
Réactif de Wagner	2 g de KI + 1,27 g I <sub>2</sub> + 75 d'eau distillée
AlCl <sub>3</sub> à 2%	2 g AlCl <sub>3</sub> + 100 ml de méthanol
Solution de DPPH	0,0025 g DPPH + 100 ml de méthanol
HCl (10%)	10 g HCl + 100 ml de méthanol
NaOH (10%)	10 g NaOH + 100 ml de méthanol
HCl (2%)	2 g HCl + 100 ml de méthanol
NH <sub>4</sub> OH (10%)	10 g NH <sub>4</sub> OH + 100 ml de méthanol

Annexe 03:

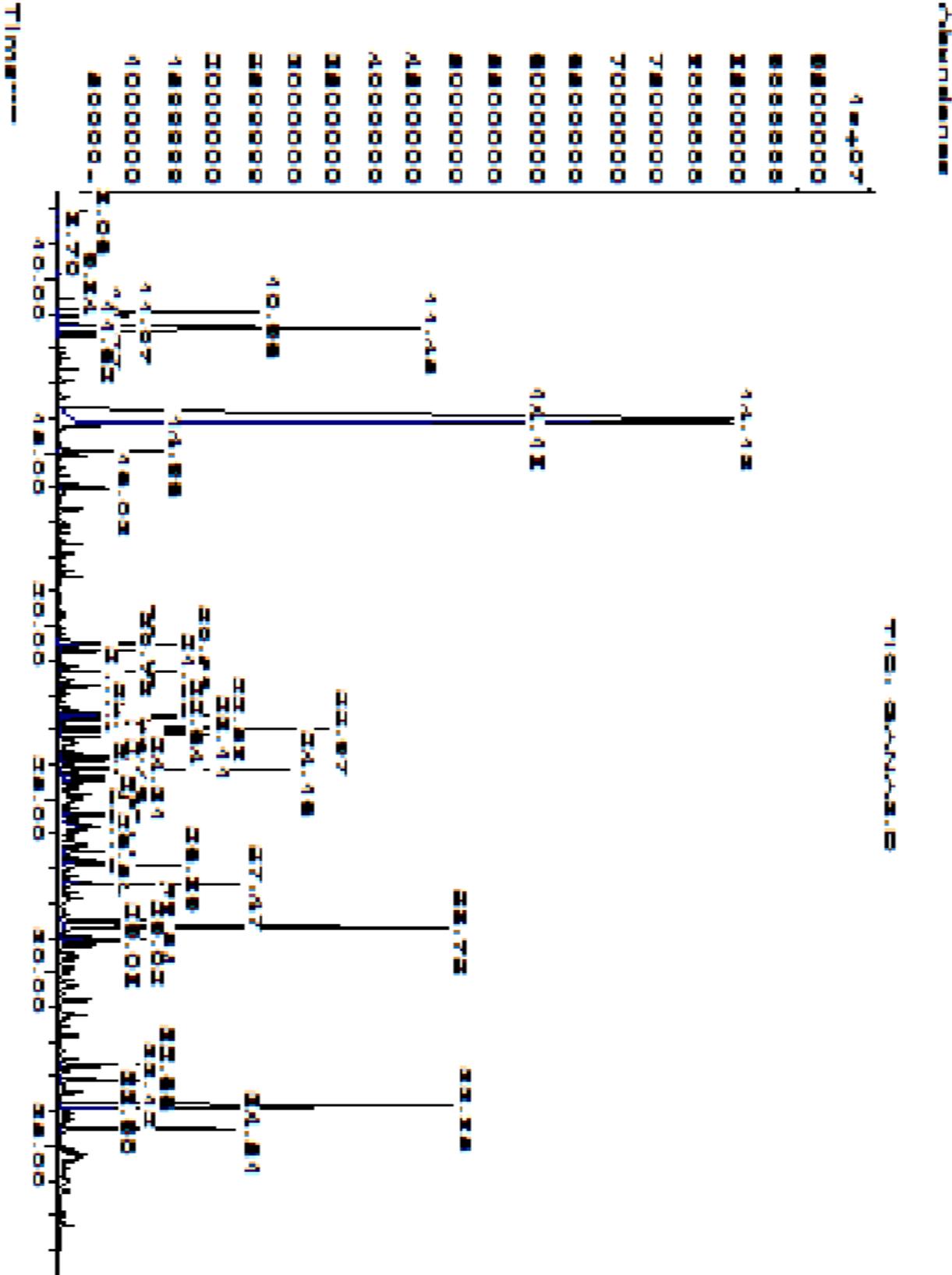
Chromatogramme 1: Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. de la période d'avant floraison



Chromatogramme 2: Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. de la période de pleine floraison



Chromatogramme 3: Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. de la période de fructification



## Annexe 04

**Tableau 3 :** Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton 1999 ; Hennebelle, 2006).

<b>Composés</b>	<b>Phénoliques</b>	<b>Activité biologique</b>
<b>Acides Phénols</b>	Acide Caféique Acide Salicylique	Antibactérienne Antifongique, anti-oxydante
<b>Tanins</b>	Tanin gallique Pro-anthocyanidine	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, anti- diarrhéique. effet antiseptique. effet vasoconstricteur.
<b>Flavonoïdes</b>	Lutéoléine Catéchine Hespéridine Quercétine Naringénine	Anti-tumorale, Anti-carcinogène, Anti-inflammatoire, Anti-oxydante, Antiallergique, Antiulcéreuse, Antivirale, Antimicrobienne, Hypotenseur diurétique.
<b>Coumarines</b>	Dicoumarol	Anticoagulant, Anti-oxydante, Protectrice vasculaire et Anti-cédémateuse

**Tableau 4** : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques (**Prescott et al., 2003**).

<b>Antibiotique</b>	<b>Structure inhibée</b>	<b>Mécanisme d'action</b>
Pénicilline	Inhibition de la synthèse de la paroi	Active les enzymes lytiques de la paroi.
Ampicilline	--	Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne.
Vancomycine	--	Se fixe directement sur la terminaison D-Ala- D-Ala et inhibe la transpeptidation
Bacitracine	--	Inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec l'action des transporteurs lipidiques qui transfèrent les précurseurs de ce polymère à travers la membrane cellulaire.
Gentamicine, Streptomycine	Inhibition de la synthèse protéique	Se fixe à la sous unité 30S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoquer des erreurs dans la lecture de l'ARNm
Chloramphénicol	--	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation des liaisons peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase.
Erythromycine	--	Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique
Ciprofloxacine et autres quinolones	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la réplication de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN.
Polymyxine B	Destruction de la membrane cellulaire	Se fixe à la membrane cellulaire et perturbe sa structure et ses propriétés de perméabilité.
Sulfamide	Antagonisme métabolique	Inhibe la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide p-aminobenzoïque.

## Annexe 5 : Analyse statistique ANOVA

### Produit 1 : Feuilles d'avant floraison

Mortalité après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	300,000	6	50,000	10,194	,000
Intra-groupes	68,667	14	4,905		
Total	368,667	20			

Mortalité après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	605,810	6	100,968	16,437	,000
Intra-groupes	86,000	14	6,143		
Total	691,810	20			

Mortalité après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	628,286	6	104,714	24,165	,000
Intra-groupes	60,667	14	4,333		
Total	688,952	20			

Mortalité après 96h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	682,476	6	113,746	31,022	,000
Intra-groupes	51,333	14	3,667		
Total	733,810	20			

## Produit 2 : Tiges d'avant floraison

mortalité après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	2400,333	6	400,056	24,064	,000
Intra-groupes	1280,083	77	16,624		
Total	3680,417	83			

Mortalité après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	594,571	6	99,095	21,454	,000
Intra-groupes	64,667	14	4,619		
Total	659,238	20			

Mortalité après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	773,619	6	128,937	159,275	,000
Intra-groupes	11,333	14	,810		
Total	784,952	20			

Mortalité après 96h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	864,286	6	144,048	3025,000	,000
Intra-groupes	,667	14	,048		
Total	864,952	20			

### Produit 3 : Feuilles de pleine floraison

#### Mortalité après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	555,333	6	92,556	19,833	,000
Intra-groupes	65,333	14	4,667		
Total	620,667	20			

#### Mortalité après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	637,619	6	106,270	37,825	,000
Intra-groupes	39,333	14	2,810		
Total	676,952	20			

#### Mortalité après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	699,143	6	116,524	101,958	,000
Intra-groupes	16,000	14	1,143		
Total	715,143	20			

#### Mortalité après 96h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	689,810	6	114,968	219,485	,000
Intra-groupes	7,333	14	,524		
Total	697,143	20			

## Produit 4 : Fleurs

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne		Minimum	Maximum
					Borne inférieure	Borne supérieure		
témoin	3	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
dose1	3	17,67	,577	,333	16,23	19,10	17	18
dose2	3	17,67	,577	,333	16,23	19,10	17	18
dose3	3	14,67	2,517	1,453	8,42	20,92	12	17
dose4	3	15,00	4,583	2,646	3,62	26,38	11	20
dose5	3	13,00	2,646	1,528	6,43	19,57	10	15
dose6	3	10,00	5,568	3,215	-3,83	23,83	5	16
Total	21	12,57	6,376	1,391	9,67	15,47	0	20

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	681,143	6	113,524	12,040	,000
Intra-groupes	132,000	14	9,429		
Total	813,143	20			

Mortalité après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	641,810	6	106,968	47,794	,000
Intra-groupes	31,333	14	2,238		
Total	673,143	20			

Mortalité après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	813,238	6	135,540	203,310	,000
Intra-groupes	9,333	14	,667		
Total	822,571	20			

Mortalité après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	822,571	6	137,095	239,917	,000
Intra-groupes	8,000	14	,571		
Total	830,571	20			

Mortalité après 96h

## Produit 5 : Tiges de pleine floraison

### Mortalité après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
<b>Inter-groupes</b>	722,571	6	120,429	63,225	,000
<b>Intra-groupes</b>	26,667	14	1,905		
<b>Total</b>	749,238	20			

### Mortalité après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	Signification
<b>Inter-groupes</b>	795,333	6	132,556	,000
<b>Intra-groupes</b>	10,667	14	,762	
<b>Total</b>	806,000	20		

### Mortalité après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
<b>Inter-groupes</b>	761,143	6	126,857	140,211	,000
<b>Intra-groupes</b>	12,667	14	,905		
<b>Total</b>	773,810	20			

### Mortalité après 96h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
<b>Inter-groupes</b>	761,238	6	126,873	177,622	,000
<b>Intra-groupes</b>	10,000	14	,714		
<b>Total</b>	771,238	20			

## Produit 6: Feuille de la période de fructification

Mortalité après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	696,667	6	116,111	221,667	,000
Intra-groupes	7,333	14	,524		
Total	704,000	20			

Mortalité après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	769,619	6	128,270	134,683	,000
Intra-groupes	13,333	14	,952		
Total	782,952	20			

Mortalité après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	738,286	6	123,048	86,133	,000
Intra-groupes	20,000	14	1,429		
Total	758,286	20			

Mortalité après 96h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	792,667	6	132,111	184,956	,000
Intra-groupes	10,000	14	,714		
Total	802,667	20			

## Produit 7: Graine

Mortalité après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
<b>Inter-groupes</b>	<i>548,952</i>	<i>6</i>	<i>91,492</i>	<i>12,316</i>	<i>,000</i>
<b>Intra-groupes</b>	<i>104,000</i>	<i>14</i>	<i>7,429</i>		
<b>Total</b>	<i>652,952</i>	<i>20</i>			

Mortalité après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
<b>Inter-groupes</b>	<i>696,952</i>	<i>6</i>	<i>116,159</i>	<i>54,207</i>	<i>,000</i>
<b>Intra-groupes</b>	<i>30,000</i>	<i>14</i>	<i>2,143</i>		
<b>Total</b>	<i>726,952</i>	<i>20</i>			

Mortalité après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
<b>Inter-groupes</b>	<i>849,238</i>	<i>6</i>	<i>141,540</i>	<i>28,308</i>	<i>,000</i>
<b>Intra-groupes</b>	<i>70,000</i>	<i>14</i>	<i>5,000</i>		
<b>Total</b>	<i>919,238</i>	<i>20</i>			

Mortalité après 96h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
<b>Inter-groupes</b>	<i>819,238</i>	<i>6</i>	<i>136,540</i>	<i>27,308</i>	<i>,000</i>
<b>Intra-groupes</b>	<i>70,000</i>	<i>14</i>	<i>5,000</i>		
<b>Total</b>	<i>889,238</i>	<i>20</i>			

## Produit 8: Tige de la période de fructification

*Mortalité* après 24h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	764,286	6	127,381	95,536	,000
Intra-groupes	18,667	14	1,333		
Total	782,952	20			

*Mortalité* après 48h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	780,952	6	130,159	248,485	,000
Intra-groupes	7,333	14	,524		
Total	788,286	20			

*Mortalité* après 72h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	764,476	6	127,413	167,229	,000
Intra-groupes	10,667	14	,762		
Total	775,143	20			

*Mortalité* après 96h

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	793,238	6	132,206	555,267	,000
Intra-groupes	3,333	14	,238		
Total	796,571	20			

## Annexe 6

### Activité antioxydante

#### Les huiles essentielles

#### DPPH

#### Descriptives

la moyenne de I%

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
					Borne inférieure
Acide ascorbique	11	72,0912	30,18182	9,10016	51,8148
avant floraison	12	63,5095	29,15498	8,41632	44,9853
plein floraison	12	67,4235	30,86347	8,90952	47,8138
durant fructification periode	12	73,9506	28,01663	8,08771	56,1497
Total	47	69,1831	28,87797	4,21228	60,7042

#### Descriptives

la moyenne de I%

	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne	Minimum	Maximum
	Borne supérieure		
Acide ascorbique	92,3676	17,26	98,71
avant floraison	82,0337	15,21	94,73
plein floraison	87,0332	14,09	96,18
durant fructification periode	91,7515	15,48	97,23
Total	77,6620	14,09	98,71

### ANOVA à 1 facteur

la moyenne de I%

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	789,204	3	263,068	,301	,824
Intra-groupes	37571,900	43	873,765		
Total	38361,105	46			

### FRAP

la moyenne de DO

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
					Borne inférieure
Acide ascorbique	8	2,2663	,31841	,11257	2,0001
avant floraison	7	,8654	,44386	,16776	,4549
plein floraison	7	,9940	,58741	,22202	,4507
durant fructification periode	7	1,1569	,54525	,20608	,6526
Total	29	1,3532	,73809	,13706	1,0725

	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne	Minimum	Maximum
	Borne supérieure		
Acide ascorbique	2,5324	1,77	2,74
avant floraison	1,2759	,34	1,57
plein floraison	1,5373	,32	1,83
durant fructification periode	1,6611	,51	1,92
Total	1,6340	,32	2,74

#### ANOVA à 1 facteur

la moyenne de DO

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	9,508	3	3,169	13,789	,000
Intra-groupes	5,746	25	,230		
Total	15,254	28			

## Les extrait méthanolique

### DPPH

#### Descriptives

la moyenne de I%

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
					Borne inférieure
Plein feuille	8	36,2731	20,16231	7,12845	19,4170
Plein Tige	8	47,1381	11,49102	4,06269	37,5314
Plein fleur	8	34,1875	14,94279	5,28307	21,6950
Avan floraison Tige	8	65,1075	21,51008	7,60496	47,1246
Avant feuille	8	32,5744	14,17524	5,01171	20,7236
Fin floraison feuille	8	34,5506	10,35974	3,66272	25,8897
Graine	8	51,1744	11,62571	4,11031	41,4550
Tige fin floraison	8	74,2675	18,84841	6,66392	58,5098
Total	64	46,9091	21,08607	2,63576	41,6420

#### Descriptives

la moyenne de I%

	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne	Minimum	Maximum
	Borne supérieure		
Plein feuille	53,1292	14,40	67,00
Plein Tige	56,7449	35,25	67,27
Plein fleur	46,6800	15,34	58,87
Avan floraison Tige	83,0904	39,22	93,70

Avant feuille	44,4252	13,32	56,93
Fin floraison feuille	43,2116	23,62	52,05
Graine	60,8937	38,89	73,92
Tige fin floraison	90,0252	45,88	95,90
Total	52,1763	13,32	95,90

### ANOVA à 1 facteur

la moyenne de l%

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	13848,705	7	1978,386	7,823	,000
Intra-groupes	14162,497	56	252,902		
Total	28011,202	63			

### DPPH

la moyenne de DO

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
					Borne inférieure
acide ascorbique	8	2,2663	,31841	,11257	2,0001
AVANT FEUILLE	7	,1080	,05234	,01978	,0596
AVANT TIGE	7	,6301	,55055	,20809	,1210
PLEIN FEUILLE	7	,1400	,10600	,04006	,0420
PLEIN FLEUR	7	,1859	,15219	,05752	,0451

PLEIN TIGE	7	,1755	,15328	,05794	,0337
FIN FEUILLE	7	,0689	,04740	,01792	,0251
FIN GRAINE	7	,2008	,21359	,08073	,0032
FIN TIGE	7	,5281	,47655	,18012	,0873
Total	64	,5061	,74492	,09311	,3200

la moyenne de DO

	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne	Minimum	Maximum
	Borne supérieure		
acide ascorbique	2,5324	1,77	2,74
AVANT FEUILLE	,1564	,04	,17
AVANT TIGE	1,1393	,06	1,55
PLEIN FEUILLE	,2380	,03	,29
PLEIN FLEUR	,3266	,04	,47
PLEIN TIGE	,3173	,01	,44
FIN FEUILLE	,1128	,02	,15
FIN GRAINE	,3983	,02	,61
FIN TIGE	,9688	,24	1,54
Total	,6922	,01	2,74

la moyenne de DO

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	30,417	8	3,802	46,041	,000
Intra-groupes	4,542	55	,083		
Total	34,959	63			

## Annexe7

## Cas des bactéries

Les différents extraits méthanoliques

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
					Borne inférieure
Escherichia Coli	8	15,2463	1,31738	,46576	14,1449
Pseudomonas aeruginosa	8	14,7050	2,50452	,88548	12,6112
Staphylococcus aureus MRS +	8	16,1250	3,90741	1,38148	12,8583
Staphylococcus aureus MRS -	8	14,1638	3,53637	1,25029	11,2073
Klebsiella pneumoniae	8	16,2050	3,08616	1,09112	13,6249
Proteus mirabilis	8	16,4550	,77353	,27348	15,8083
Bacillus subtilus	8	8,4138	6,72868	2,37895	2,7884
Selmonella sp.	8	19,9975	3,03289	1,07229	17,4619
Selmonella H2S(+)	8	19,7463	2,31450	,81830	17,8113
Enterococcus faecium sp.	8	13,7463	,93796	,33162	12,9621
Enterobacter aeruginosa sp.	8	21,4163	3,09568	1,09449	18,8282
Serratia Sp	8	18,1225	2,58095	,91250	15,9648
Total	96	16,1952	4,49010	,45827	15,2854

Les différents extraits méthanoliques

	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne	Minimum	Maximum
	Borne supérieure		
Escherichia Coli	16,3476	13,33	17,33
Pseudomonas aeruginosa	16,7988	12,00	18,33
Staphylococcus aureus MRS +	19,3917	9,00	20,00
Staphylococcus aureus MRS -	17,1202	7,33	18,00
Klebsiella pneumoniae	18,7851	11,33	22,33
Proteus mirabilis	17,1017	15,33	17,66
Bacillus subtilus	14,0391	,00	18,00
Selmonella sp.	22,5331	16,00	24,66
Selmonella H2S(+)	21,6812	15,66	23,66
Enterococcus faecium sp.	14,5304	12,66	15,66
Enterobacter aeruginosa sp.	24,0043	17,33	26,00
Serratia sp.	20,2802	15,66	23,66
Total	17,1050	,00	26,00

**ANOVA à 1 facteur**

Les différents extraits méthanoliques

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	1055,281	11	95,935	9,370	,000
Intra-groupes	860,016	84	10,238		
Total	1915,297	95			

## Cas des levure

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
					Borne inférieure
Candida albicans (prélèvement d'angle)	8	16,7063	3,33016	1,17739	13,9222
Candida albicans (prélèvement d'urine)	8	18,6213	2,98348	1,05482	16,1270
Candida albicans (prélèvement vaginal)	8	18,9988	3,33738	1,17994	16,2086
Candida tropicalis (prélèvement d'urine)	8	17,4975	1,35600	,47942	16,3639
Saccharomyces bulgari	8	8,8738	8,41459	2,97501	1,8390
Saccharomyces cerevisiae	8	21,2063	9,07083	3,20702	13,6228
Total	48	16,9840	6,56854	,94809	15,0767

## diamètre

	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne	Minimum	Maximum
	Borne supérieure		
Candida albicans (prélèvement d'angle)	19,4903	11,00	19,66
Candida albicans (prélèvement d'urine)	21,1155	12,33	22,33
Candida albicans (prélèvement vaginal)	21,7889	14,00	24,33
Candida tropicalis (prélèvement d'urine)	18,6311	15,00	19,33
Saccharomyces bulgari	15,9085	,00	19,00
Saccharomyces cerevisiae	28,7897	,00	30,00
Total	18,8913	,00	30,00

### ANOVA à 1 facteur

diamètre

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	725,473	5	145,095	4,679	,002
Intra-groupes	1302,372	42	31,009		
Total	2027,846	47			

Les huiles essentielles

Cas des levures

	N	Moyenne	Ecart-type	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95% pour la moyenne
					Borne inférieure
Candida albicans (prélèvement d'angle)	3	4,6667	,57735	,33333	3,2324
Candida albicans (prélèvement d'urine)	3	4,6667	1,52753	,88192	,8721
Candida albicans (prélèvement vaginal)	3	5,3333	1,52753	,88192	1,5388
Candida tropicalis (prélèvement d'urine)	3	4,0000	2,00000	1,15470	-,9683
Saccharomyces cerevisiae	3	,0000	,00000	,00000	,0000
Saccharomyces bulgari	3	6,6667	1,33500	,77076	3,3503
Total	18	4,2222	2,40109	,56594	3,0282

ANOVA à 1 facteur

Diamètres d'inhibitions des huiles essentielles

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	76,444	5	15,289	8,508	,001
Intra-groupes	21,564	12	1,797		
Total	98,009	17			