

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels



Thèse De Doctorat En Sciences

Spécialité : **Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse**

Présentée et Soutenue le : **14-04-2015** par :

M^{me} CHAUCHE née HADDOUCHI Farah

Titre

**Etude des activités antioxydantes, antimicrobiennes et
caractérisation par CPG-SM et HPLC-SM,
des huiles essentielles et des extraits de quelques
plantes (Astéracées et Rutacées) d'Algérie**

Jury :

Présidente	↘ Pr. Fawzia ATIK-BEKKARA	Université de Tlemcen
Directeur de thèse	↘ Pr. Abdelhafid BENMANSOUR	Université de Tlemcen
Examineurs	↘ Pr. Abderrahmane H. LAZOUNI	Université de Tlemcen
	↘ Pr. Chahrazed BOUTEKEDJIRET	Ecole Nationale Polytechnique d'Alger
	↘ Pr. Mohamed YOUSFI	Université de Laghouat
	↘ Pr. Riadh KSOURI	Université de Tunis

Année universitaire 2014-2015

Avant propos

Notre étude a été menée grâce à la contribution de quatre laboratoires.

L'activité antimicrobienne des extraits hydro-méthanoliques et quelques tests antioxydants sont réalisés au Laboratoire des Produits Naturels «LAPRONA», Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers (SNV-STU), Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen.



Les dosages et l'étude de l'activité antioxydante par six méthodes sont réalisés au Laboratoire des Plantes Extrémophiles «LPE», Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria (CBBC) de Tunis, Tunisie.

L'analyse par CG-SM est réalisée au Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT), Tunisie.



L'analyse par HPLC Orbitrap-MSⁿ est réalisée au Laboratoire Agronomie & Environnement UMR 1121 (Université de Lorraine-INRA), de Nancy, France.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux responsables de ces laboratoires pour m'avoir apporté les moyens humains et matériels me permettant de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon directeur de thèse Mr BENMANSOUR A/Fid, Professeur au département de l'Ecologie et Environnement, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Je lui suis reconnaissant pour la confiance et le soutien permanent qu'il m'a témoigné dans ce travail ainsi que pour sa disponibilité et pour la grande autonomie qu'il m'a accordé.

Mes remerciements vont également à Mme ATIK BEKKARA F., Professeur au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen et chef d'équipe « Etude des composés volatils et des composés phénoliques » au laboratoire des Produits naturels « LAPRONA », pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de présidente. Je lui suis particulièrement reconnaissante de m'accompagner dans cette dernière étape du travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Mme BOUTEKEDJIRET C., Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, en acceptant d'être parmi les rapporteurs externes de ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de ses observations et je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance.

Je suis également très redevable à Mr KSOURI R., Maître de Conférences au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria, Université de Tunis, pour son aide précieuse dans la réalisation d'une partie de ce travail, pour ses conseils et pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteur externe.

Mes remerciements vont également à Mr YOUSFI M., Professeur à l'Université Amar Telidji Laghouat, qui m'a fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteur externe. Je suis très heureuse de bénéficier de vos observations et je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Je remercie très sincèrement Mr LAZOUNI H.A., Professeur au département de l'Ecologie et Environnement, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance et mon plus profond respect.

Je remercie mon cher époux, Mr CHAOUCHÉ T.M., Docteur au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, qui m'a accompagné au quotidien pendant ces années de thèse. Je le remercie pour sa disponibilité, son aide, ses conseils et pour m'avoir toujours encouragé à aller plus loin.

Mes remerciements vont vers Mme ZAOUALI Y., Maître de Conférences à l'Institut National des Sciences Appliquées et Technologie, Tunis, de m'avoir permis de réaliser les analyses par CG-SM au sein de son unité. De même, je tiens à remercier Mr LARBAT R., chargé de recherche au laboratoire d'Agronomie & Environnement et enseignant à l'Université de Nancy en France, pour son aide précieuse au niveau des analyses des extraits par HPLC-SM. Je voudrais également adresser mes remerciements à toute l'équipe de Mr Ksouri R., qui m'ont aidé à travailler en toute confiance dans le laboratoire.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mes parents pour la liberté qui m'ont toujours accordé dans mes choix et pour leur inquiétude quant à l'avancée de mes travaux. Un grand merci à mon père pour avoir relu et corrigé très soigneusement ce manuscrit. Merci à mes beaux parents, mes frères, mes beaux frères, ma sœur et ma belle sœur, pour leurs soutiens et leurs encouragements.

A mon fils Mohammed Riad

Table des matières

Résumé en Français	
Résumé en Arabe	
Résumé en Anglais	
Table des illustrations	
Liste des tableaux	
Liste des photos	
Liste des figures	

Introduction générale

1

1^{ère} Partie: Synthèse bibliographique

Chapitre I.

Composés phénoliques et huiles essentielles

I. Introduction.....	3
II. Composés phénoliques	3
II.1. Phénols, acides phénols et phénylpropanoïdes.....	4
II.2. Flavonoïdes	5
II.3. Stilbènes	7
II.4. Tanins.....	8
II.5. Emodols.....	8
III. Huiles essentielles	9
IV. Activités biologiques des composés phénoliques et des huiles essentielles	10
V. Caractérisation et identification des composés phénoliques et des huiles essentielles.....	10
V.1. Résonance magnétique nucléaire.....	11
V.2. Chromatographie liquide haute performance.....	11
V.3. Chromatographie en phase gazeuse.....	12

Chapitre II.

Activités antioxydantes et antimicrobiennes

Résumé.....	13
I. Activités antioxydantes	13
I.1. Oxydants et antioxydants	13
I.1.1. Les antioxydants enzymatiques.....	14
I.1.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	14
I.2. Polyphénols, huiles essentielles et activités antioxydante	14
I.3. Mode d'action des antioxydants	15
I.3.1. Les antioxydants préventifs par inhibition d'enzymes ou par chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux.....	15
I.3.2. Les antioxydants piègeurs des ERO.....	16
I.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	16
I.4.1. Le test de la capacité antioxydante totale.....	17
I.4.2. Le test de piégeage du radical DPPH°.....	17
I.4.3. Le test de la réduction de fer.....	17

I.4.4. Le test d'inhibition de blanchiment du β -carotène.....	17
I.4.5. Le test de piégeage du radical ABTS ^{•+}	17
I.4.6. Le test de chélation de fer.....	18
II. Activités antimicrobiennes.....	18
II.1. Microbes et antimicrobiens.....	18
II.2. Polyphénols, huiles essentielles et activité antimicrobienne.....	18
II.3. Spectre d'action des antimicrobiens naturels.....	19
II.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	20
II.4.1. Méthode des disques dans un milieu gélosé.....	20
II.4.2. Méthodes des dilutions.....	20
a. En milieu liquide.....	20
b. En milieu solide.....	20

Chapitre III.

Plantes choisies pour la réalisation de ce travail

I. Famille des <i>Rutacées</i>	21
I.1. <i>Ruta chalepensis</i> var. <i>bracteosa</i> (DC.) Boiss.....	22
I.1.1. Description botanique et répartition géographique.....	22
I.1.2. Composition chimique.....	23
I.1.3. Propriétés et utilisations.....	23
I.2. <i>Ruta graveolens</i> L.....	23
I.2.1. Description botanique et répartition géographique.....	23
I.2.2. Composition chimique.....	24
I.2.3. Propriétés et utilisations.....	24
I.3. <i>Ruta tuberculata</i> Forsk.....	25
I.3.1. Description botanique et répartition géographique.....	25
I.3.2. Composition chimique.....	25
I.3.3. Propriétés et utilisations.....	25
I.4. <i>Ruta angustifolia</i> Pers.....	26
I.4.1. Description botanique et répartition géographique.....	26
I.4.2. Composition chimique.....	27
I.4.3. Propriétés et utilisations.....	27
II. Famille des <i>Astéracées</i>	28
II.1. <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>Rupestre</i> auct.....	28
II.1.1. Description botanique et répartition géographique.....	28
II.1.2. Composition chimique.....	29
II.1.3. Propriétés et utilisations.....	29
II.2. <i>Phagnalon saxatile</i> (L.) Cass. subsp. <i>saxatile</i>	30
II.2.1. Description botanique et répartition géographique.....	30
II.2.2. Composition chimique.....	31
II.2.3. Propriétés et utilisations.....	31

2^{ème} Partie: Matériel et méthodes

I. Méthodologie.....	32
II. Matériel et méthodes utilisés.....	33
II.1. Provenance des plantes étudiées.....	33
II.2. Méthodes d'extractions.....	34

II.2.1. Procédures d'isolement des huiles essentielles et calcul de leurs densités relatives	34
a. Hydrodistillation.....	34
b. Entraînement à la vapeur d'eau.....	34
II.2.2. Préparation des extraits hydro-méthanoliques.....	35
II.2.3. Extraction par des solvants organiques à polarité croissante.....	35
II.3. Quantification de quelques classes phénoliques dans les extraits.....	36
II.3.1. Polyphénols totaux.....	36
II.3.2. Flavonoïdes totaux.....	37
II.3.3. Tanins condensés.....	37
II.4. Estimation des activités biologiques, <i>in vitro</i>	37
II.4.1. Détermination de l'activité antioxydante.....	37
a. Capacité antioxydante totale.....	37
b. Piégeage du radical DPPH [°]	38
c. Piégeage du radical ABTS ^{°+}	39
d. Pouvoir réducteur du fer.....	39
e. Pouvoir chélateur du fer.....	39
f. Inhibition de blanchiment du β-carotène.....	40
II.4.2. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	40
a. Méthode de diffusion en disque.....	41
b. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	42
II.5. Identification des huiles essentielles et des composés phénoliques.....	43
II.5.1. Analyse des huiles essentielles par CG-SM.....	43
II.5.2. Analyse des composés phénoliques par CLHP Orbitrap-SM ⁿ	43
II.6. Analyses statistiques.....	44

3^{ème} Partie: Résultats et discussion

Chapitre I.

Activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles et de quelques extraits de deux espèces d'Astéracées « Helichrysum stoechas subsp. rupestre auct. et Phagnalon saxatile (L.) Cass. subsp. saxatile »

Résumé.....	45
I. Introduction.....	46
II. Résultats.....	48
II.1. Les huiles essentielles.....	48
II.1.1. Rendements.....	48
II.2. Les extraits hydro-méthanoliques	48
II.2.1. Rendements en extraits.....	48
II.2.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins	49
II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	49
a. Capacité antioxydante totale.....	50
b. Capacité de piégeage du radical DPPH [°]	51
c. Capacité de réduction du fer.....	52
d. Capacité de piégeage du radical ABTS ^{°+}	53
e. Pouvoir chélateur du Fer.....	54
f. Inhibition de blanchiment du β-carotène	54
II.2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne	55

a. Méthode des disques.....	55
II.3. Les extraits préparés par des solvants à polarité différente.....	56
II.3.1. Rendements en extraits.....	56
II.3.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins.....	56
II.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	57
a. Capacité antioxydante totale.....	58
b. Capacité de piégeage du radical DPPH°.....	59
c. Capacité de réduction du fer.....	60
d. Capacité de piégeage du radical ABTS ^{•+}	60
e. Pouvoir chélateur du Fer.....	61
f. Inhibition de blanchiment du β-carotène.....	62
II.3.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	63
a. Méthode des disques.....	63
b. Méthode des dilutions.....	65
III. Discussion.....	65
IV. Conclusion.....	70

Chapitre II.

***Activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles et de quelques extraits de quatre espèces de Rutacées
« Ruta chalepensis var. bracteosa (DC.) Boiss., R. graveolens L.,
R. angustifolia Pers. et R. tuberculata Forsk.»***

Résumé.....	71
I. Introduction.....	72
II. Résultats.....	72
II.1. Les huiles essentielles.....	72
II.1.1. Rendements en huiles essentielles et leurs densités relatives.....	72
II.2. Les extraits hydro-méthanoliques.....	73
II.2.1. Rendements en extraits.....	73
II.2.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins.....	73
II.3. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits hydro-méthanoliques...	73
II. 3.1. Capacité antioxydante totale.....	74
II. 3.2. Capacité de piégeage du radical DPPH°.....	75
II. 3.3. Capacité de réduction du fer.....	75
II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits hydro-méthanoliques.	76
II.4.1. Activité antibactérienne.....	76
a. Méthode des disques.....	76
b. Méthode de dilutions.....	77
II.4.2. Activité antifongique.....	77
a. Méthode des disques.....	77
b. Méthode de dilutions.....	78
III. Discussion.....	79
IV. Conclusion.....	81

Chapitre III.

Caractérisations chimiques

Résumé.....	82
I. Introduction.....	83
II. Résultats.....	83
II.1. Analyse par CLHP Orbitrap-SM ⁿ des extraits méthanoliques et aqueux d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	83
II.1.1. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i>	84
a. Dérivés d'Acide hydroxycinnamique.....	87
b. Flavonoïdes.....	89
II.1.2. Identification des composés phénoliques dans l'extrait aqueux des tiges feuillées d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i>	94
a. Dérivés d'Acide hydroxycinnamique.....	97
II.1.3. Identification des composés phénoliques dans l'extrait aqueux des fleurs d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i>	99
a. Dérivés d'acide hydroxycinnamique.....	102
b. Flavonoïdes.....	103
II.1.4. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	105
a. Dérivés d'Acide hydroxycinnamique.....	107
b. Flavonoïdes.....	107
II.2. Analyse par CG-SM des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i>	109
III. Discussion.....	113
III.1. Analyse par CLHP Orbitrap-SM ⁿ des extraits méthanoliques et aqueux d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	113
III.1.1. Relation Activité antioxydante / Composition des extraits.....	114
III.2. Analyse par CG-SM des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i>	117
III.2.1. Relation Activité antimicrobienne / Composition des huiles essentielles.....	119
IV. Conclusion.....	

Conclusion générale et Perspectives	120
--	------------

Références bibliographiques	123
------------------------------------	------------

Annexe

Annexe 1 : Courbes d'étalonnage.....	135
Annexe 2 : Activité antioxydante des extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> , et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	136
Annexe 3 : Activité antioxydante des extraits obtenus par des extractions successives d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> , et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	137
Annexe 4 : Activité antioxydante des extraits et des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i>	139
Annexe 5 : Activité antifongique des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i>	140

Valorisation des travaux de recherche	141
--	------------

Liste des tableaux

Tableau 1: Les principales classes des composés phénoliques.....	4
Tableau 2: La transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D).....	42
Tableau 3: Les rendements en huiles essentielles (moyenne \pm écart type) d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	48
Tableau 4: Les rendements et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne \pm écart type) dans les extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	48
Tableau 5: Les activités antioxydantes des extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> et des standards par les différentes méthodes.....	50
Tableau 6: Les coefficients de corrélation (r) de la relation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	51
Tableau 7: Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne \pm écart type) dans les extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , préparés pas des solvants de polarité croissante.....	57
Tableau 8: Les activités antioxydantes des extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , préparés par différents solvants, et des standards par les différentes méthodes...	58
Tableau 9: Les coefficients de corrélation (r) de la relation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits méthanoliques et aqueux d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus pas des solvants de polarité croissante.....	59
Tableau 10: Les diamètres des zones d'inhibition obtenus, pour les extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus pas des solvants de polarité croissante.....	64
Tableau 11: Les concentrations minimales inhibitrices de quelques extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , testées contre les bactéries les plus sensibles.....	65
Tableau 12: Les rendements en huiles essentielles (moyenne \pm écart type) des espèces de <i>Ruta</i> étudiées et leurs densités.	72
Tableau 13: Les rendements et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne \pm écart type) dans les extraits hydro-méthanoliques des espèces de <i>Ruta</i> étudiées.....	73
Tableau 14: Les activités antioxydantes des extraits hydro-méthanoliques des espèces de <i>Ruta</i> et des standards par les différentes méthodes.....	74
Tableau 15: Les pourcentages d'inhibition (%) (moyenne \pm écart type) du radical libre DPPH ^o des extraits et des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i> étudiées.....	75
Tableau 16: L'activité antibactérienne, <i>in vitro</i> , des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i> étudiées...	77
Tableau 17: Les valeurs des CMI des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i> , testées contre les bactéries les plus sensibles.....	77
Tableau 18: L'activité antifongique, <i>in vitro</i> , des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i> étudiées.....	78
Tableau 19: Les valeurs de CMI des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i> testées contre <i>Candida albicans</i> et les champignons filamenteux.....	79
Tableau 20: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SM ⁿ dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d' <i>H. stoechas</i> subsp.	85
Tableau 21: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SM ⁿ dans l'extrait aqueux des tiges feuillées d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i>	95
Tableau 22: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SM ⁿ dans l'extrait aqueux des fleurs d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i>	100
Tableau 23: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SM ⁿ dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées de <i>Phagnalon saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>	106
Tableau 24: La composition des huiles essentielles (CG-SM) de <i>R. chalepensis</i> var. <i>bracteosa</i> (RCb), <i>R. graveolens</i> (RG) et <i>R. angustifolia</i> (RA)	111
Tableau 25: La composition de l'huile essentielle (CG-SM) de <i>R. tuberculata</i>	112
Tableau 26: Les pourcentages d'inhibition des champignons par les huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i>	140

Liste des photos

Photo 1: <i>Ruta chalepensis</i> var. <i>bracteosa</i> (DC.) Boiss.	22
Photo 2 : <i>Ruta graveolens</i> L.	23
Photo 3: <i>Ruta tuberculata</i> Forsk.....	25
Photo 4 : <i>Ruta angustifolia</i> Pers.....	26
Photo 5: <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> auct.	28
Photo 6: <i>Phagnalon saxatile</i> (L.) Cass. subsp. <i>saxatile</i>	30

Liste des figures

Figure 1: Principaux acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques.....	5
Figure 2: Principaux types de coumarines.....	5
Figure 3: Structure générale des flavonoïdes.....	5
Figure 4: Structures chimiques des chalcones et auronnes.....	6
Figure 5: Structures chimiques des flavones et des flavonols.....	6
Figure 6: Structures chimiques des Flavanones et flavanonol.....	6
Figure 7: Structures chimiques des flavanols et flavan-3,4-diols.....	7
Figure 8: Structures chimiques des anthocyanes.....	7
Figure 9: Structure de base des Isoflavones.....	7
Figure 10: Structure de trans-resveratrol.....	7
Figure 11: Structure de base des xanthones.....	8
Figure 12: structure d'un tanin hydrolysable et des tanins condensés.....	8
Figure 13: Structure de base d'emodols et d'anthraquinones.....	9
Figure 14: Structure d'isoprène.....	9
Figure 15: Sites de liaison proposés pour chélater les traces de métaux par les flavonoïdes.....	15
Figure 16: Propriétés réductrices des polyphénols.	16
Figure 17 : Méthodologie du travail.....	33
Figure 18: Carte de localisation des stations de récoltes.....	34
Figure 19: Forme réduite du radical DPPH°.....	38
Figure 20: Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits testés.	51
Figure 21: Valeurs de CI ₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> et du standard par la méthode du piégeage du radical libre DPPH°.....	52
Figure 22: Valeurs de CE ₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> et des standards par la méthode de la réduction du fer.....	53
Figure 23: Valeurs de CI ₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> et des standards par la méthode de piégeage du radical ABTS ^{•+}	54
Figure 24: Valeurs de CI ₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> et de l'EDTA par la méthode du pouvoir chélateur du Fer.....	54
Figure 25: Valeurs de CI ₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> et du standard par la méthode d'inhibition de blanchiment du β-carotène.....	55
Figure 26: Histogramme des rendements en extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus par des solvants de polarité croissante.....	56
Figure 27: Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus pas des solvants de polarité croissante.....	58
Figure 28: Valeurs de CI ₅₀ des extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus pas des solvants de polarité croissante, et du standard par la méthode du piégeage du radical libre DPPH°.....	59
Figure 29: Valeurs de CE ₅₀ des extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus pas des solvants de polarité croissante, et des standards par la méthode de la réduction du fer.....	60
Figure 30: Valeurs de CI ₅₀ des extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus pas des solvants de polarité croissante, et des standards par la méthode de piégeage du radical ABTS ^{•+}	61
Figure 31: Valeurs de CI ₅₀ des extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> ,	

obtenus pas des solvants de polarité croissante, et du standard par la méthode du pouvoir chélateur du Fer.....	61
Figure 32: Valeurs de CI_{50} des extraits d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>P. saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , obtenus pas des solvants de polarité croissante, et du standard par la méthode de blanchiment du β -carotène.....	62
Figure 33: Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i> étudiées.....	74
Figure 34: Valeurs de CE_{50} des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i> étudiées et des standards, testés par la méthode de la réduction du fer.....	75
Figure 35: Chromatogramme CLHP de l'extrait méthanolique des tiges feuillées d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> , enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif.....	84
Figure 36: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide Caféoylquinique et de sa fragmentation.....	87
Figure 37: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide Caféoylquinique et de sa fragmentation.....	87
Figure 38: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide di- <i>O</i> -Caféoylquinique et de sa fragmentation.....	88
Figure 39: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide di- <i>O</i> -Caféoylquinique et de sa fragmentation.....	88
Figure 40: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'acide Coumarique hexose et de sa fragmentation.....	89
Figure 41: Spectre de masse SM en mode positif de l'acide Coumarique hexose et de sa fragmentation.....	89
Figure 42: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Quercétine glucoside et de sa fragmentation.....	90
Figure 43: Spectre de masse SM en mode positif de la Quercétine glucoside et de sa fragmentation....	90
Figure 44: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Kaempférol-3-glucoside et de sa fragmentation.....	90
Figure 45: Spectre de masse SM en mode positif de la Kaempférol-3-glucoside et de sa fragmentation	91
Figure 46: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Kaempférol 3-feruloyldiglusoside-7-glucoside et de sa fragmentation.....	91
Figure 47: Spectre de masse SM en mode positif de Kaempférol 3-feruloyldiglusoside-7-glucoside et de sa fragmentation.....	92
Figure 48: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Kaempférol dihexose glucuronide et de sa fragmentation.....	92
Figure 49: Spectre de masse SM en mode positif de Kaempférol dihexose glucuronide et de sa fragmentation.....	92
Figure 50: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'Amentoflavone et de sa fragmentation.....	93
Figure 51: Spectre de masse SM en mode positif de l'Amentoflavone et de sa fragmentation.....	93
Figure 52: Chromatogramme CLHP de l'extrait aqueux des tiges feuillées d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> , enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif.....	94
Figure 53: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide Malonyl-caféoylquinique et de sa fragmentation.....	97
Figure 54: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide Malonyl- caféoylquinique et de sa fragmentation.....	97
Figure 55: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide Malonyl-di caféoylquinique et de sa fragmentation.....	98
Figure 56: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide Malonyl-di caféoylquinique et de sa fragmentation.....	98
Figure 57: Chromatogramme CLHP de l'extrait aqueux des fleurs d' <i>H. stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> , enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif.....	99
Figure 58: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif d'un dimère de l'Acide caféique - <i>O</i> -hexoside et de sa fragmentation.....	103
Figure 59: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif d'un Hexahydroxyflavone glycosylé et de sa fragmentation.....	103
Figure 60: Spectre de masse SM en mode positif d'un Hexahydroxyflavone glycosylé et de sa	

fragmentation.....	104
Figure 61: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Rutine et de sa fragmentation.....	104
Figure 62: Spectre de masse SM en mode positif de la Rutine et de sa fragmentation.....	104
Figure 63: Chromatogramme CLHP de l'extrait méthanolique de <i>Phagnalon saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> , enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif.....	105
Figure 64: Nomenclature adoptée pour les différentes rétro-cyclisations.....	108
Figure 65: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'Apigénine et de sa fragmentation.....	108
Figure 66: Spectre de masse SM en mode positif de l'Apigénine et de sa fragmentation.....	108
Figure 67: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de <i>R. chalepensis</i> var. <i>bracteosa</i>	110
Figure 68: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de <i>R. angustifolia</i>	110
Figure 69: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de <i>R. graveolens</i>	110
Figure 70: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de <i>R. tuberculata</i>	112
Figure 71: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	135
Figure 72: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	135
Figure 73: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.....	135
Figure 74: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale.....	135
Figure 75: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [°] pour la substance de référence et les extraits testés.....	136
Figure 76: Pouvoirs réducteurs des standards et des extraits testés.....	136
Figure 77: Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS ^{°+} pour les substances de référence et les extraits testés.....	136
Figure 78: Pouvoir chélateur du standard EDTA.....	136
Figure 79: Pouvoir chélateur des extraits testés.....	136
Figure 80: Capacité du standard BHA à inhiber le blanchiment du β -carotène.....	136
Figure 81: Capacité des échantillons à inhiber le blanchiment du β -carotène.....	137
Figure 82: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [°] pour la substance de référence et les extraits d'hexane (Hx) et de dichlorométhane (D).....	137
Figure 83: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [°] pour la substance de référence et les extraits méthanoliques (M).....	137
Figure 84: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [°] pour la substance de référence et les extraits aqueux (A).....	137
Figure 85: Pouvoirs réducteurs de la substance de référence et des extraits d'hexane (Hx) et de dichlorométhane (D).....	137
Figure 86: Pouvoirs réducteurs des substances de référence et des extraits méthanoliques (M) et aqueux (A).....	138
Figure 87: Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS ^{°+} pour les substances de référence et les extraits méthanolique (M).....	138
Figure 88: Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS ^{°+} pour les substances de référence et les extraits aqueux (A).....	138
Figure 89: Pouvoir chélateur des extraits méthanoliques (M).....	138
Figure 90: Pouvoir chélateur des extraits aqueux (A).....	138
Figure 91: Capacité des échantillons méthanoliques (M) et aqueux (A) à inhiber le blanchiment du β -carotène.....	138
Figure 92: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [°] pour les extraits hydro-méthanoliques des espèces de <i>Ruta</i>	139
Figure 93: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [°] pour les huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i>	139
Figure 94: Pouvoirs réducteurs des extraits hydro-méthanoliques des espèces de <i>Ruta</i>	139
Figure 95: Pouvoirs réducteurs des huiles essentielles des espèces de <i>Ruta</i>	139

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent d'une part, à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes de quelques plantes d'Algérie et d'autre part à la caractérisation de ces plantes par l'étude de la composition chimique des huiles essentielles et des extraits (macérâts hydro-méthanoliques, extraits obtenus successivement par soxhlet par des solvants de polarité croissante -hexane, Dichlorométhane, méthanol, eau-) par des outils d'analyse des mélanges complexes naturels. Il s'agit de deux Astéracées : *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. et *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* et de quatre Rutacées : *Ruta angustifolia* Pers., *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *Ruta graveolens* L. et *Ruta tuberculata* Forsk.

Pour les deux espèces d'Astéracées, les extraits hydro-méthanoliques, et ceux obtenus successivement par des solvants polaires, généralement le méthanol, contiennent des composés phénoliques et ont une activité antioxydante intéressante, à l'exception des fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile*. Les extraits des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* sont les plus actifs, avec les teneurs les plus élevées en composés phénoliques. Ces activités sont comparables à celles des standards à l'exception des pouvoirs de réduction et de chélation du fer. La meilleure activité est obtenue en piégeant le radical DPPH[•] avec des valeurs de CI₅₀ comprises entre 5.47 et 6.58 µg/mL. Une activité antifongique puissante, des huiles essentielles des espèces de *Ruta*, a été révélée contre les champignons filamenteux. *Aspergillus fumigatus* et *Cladosporium herbarum* sont les souches les plus sensibles à ces huiles avec des valeurs de CMI inférieures à 4 µl/mL pour certaines huiles, atteignant 9 µl/mL pour les autres.

La relation entre les potentiels étudiés et les compositions des extraits et des huiles essentielles a été établie, respectivement, par CLHP-SM et CG-SM. *H. stoechas* subsp. *rupestre* et *P. saxatile* subsp. *saxatile*, de l'ouest algérien, constituent une nouvelle source des dérivés d'acide hydroxycinnamique à activité antioxydante. Riches en cétones (jusqu'à 95%), les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* var. *bracteosa*, *R. angustifolia* et de *R. graveolens*, possèdent des compositions chimiques fréquemment décrites dans la littérature. En revanche, l'huile essentielle de *R. tuberculata* présente une composition différente et rarement décrite, caractérisée par la présence majoritaire des alcools monoterpéniques (40.79%). Les propriétés antifongiques de ces huiles essentielles permettent de les proposer comme un outil potentiel à surmonter le problème de l'incidence croissante de maladies d'origine alimentaire.

Mots-clés : *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*, *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, *Ruta*, activité antioxydante, activité antimicrobienne, composés phénoliques, huile essentielle, CG-SM, CLHP-SM.

ملخص

يساهم العمل المقدم، في هذه الأطروحة، من جهة في دراسة تقدير النشاطات المضادة للأوكسدة، والمضادة للميكروبات لبعض النباتات في الجزائر، و من جهة أخرى في وصف هذه النباتات من خلال دراسة مفصلة عن التركيب الكيميائي للزيوت العطرية و المستخلصات: (مستخلصات الميثانول المائية، ومستخلصات أعدت عن طريق الإستخلاص المتعاقب باستعمال مذيبات مختلفة - الهكسان، ثنائي كلوروميثان، الميثانول والماء-) وذلك بإستخدام تقنيات تحليل مركبات طبيعية معقدة. ويتعلق الأمر بنبتتين من عائلة Asteraceae : *Rutaceae* *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* و *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. وأربعة من عائلة *Rutaceae* : *Ruta graveolens* L., *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *Ruta angustifolia* Pers., *Ruta tuberculata* Forsk. فيما يخص نبتتي Asteraceae ، مستخلصات الميثانول المائية وتلك التي نتحصل عليها بالمذيبات القطبية عن طريق الإستخلاص المتعاقب، خاصة الميثانول، تحتوي على مركبات فينولية ولها نشاط مضاد للأوكسدة مثير للاهتمام من خلال ست طرق مختلفة باستثناء زهور *P.saxatile* . مستخلصات زهور *Helichrysum stoechas* والسيقان ذات الأوراق ل *P.saxatile* هي الأكثر نشاطا، ولها أعلى المستويات من المركبات الفينولية. هذه الأنشطة هي مماثلة لمضادات الأوكسدة النموذجية ماعدا في اختباري قوة تثبيط و إزالة الحديد. ولقد تم الحصول على أفضل نشاط لتثبيط جذر DPPH مع قيم IC_{50} تتراوح بين 5.47 و 6.58 $\mu\text{g/ml}$. كما تبين لنا نشاط قوي مضاد للفطريات للزيوت العطرية من أنواع *Ruta* و ذلك ضد الفطريات الخيطية. *Cladosporium herbarum* و *Aspergillus fumigatus* هي السلالات الأكثر حساسية لهذه الزيوت مع قيم CMI أقل من 4 $\mu\text{l/ml}$ لبعض الزيوت، وقد تصل إلى 9 $\mu\text{l/ml}$ لبعض الأخر. تم ربط نشاطات المستخلصات والزيوت العطرية والتراكيب التي تمت دراستها، على التوالي، من خلال *CG-SM*, *CLHP-SM*. *H.stoechas* و *P.saxatile* ، المتواجدتان في غرب الجزائر، تمثلان مصدر جديد لمشتقات حمض الهيدروكسيسيناميك الذي يتميز بنشاط مضاد للأوكسدة، حيث يمكن أن تستخدم في الوقاية من الأمراض الناجمة عن الأوكسدة. الزيوت الأساسية ل *Ruta graveolens*، الغنية بالكيتونات بنسب تصل حتى 95%، تختص بتراكيب كيميائية وصفت كثيرا في الأعمال السابقة. أما زيت *R. tuberculata* فلها تكوين مختلف، ونادرا ما وصف، إذ تتميز بوجود ساند لمنوتربين الكحولي (40.79%). تسمح الخصائص المضادة للفطريات لهذه الزيوت العطرية باقتراحها كأداة للتغلب على مشكلة تزايد الإصابة بالأمراض المتعلقة بالأغذية.

الكلمات الرئيسية: *Ruta*, *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. Subsp. *saxatile*, *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. ، النشاط المضاد للأوكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، المركبات الفينولية، الزيوت العطرية ، *CG-SM*, *CLHP-SM*.

Abstract

The work presented in this thesis contribute one hand, the study of antioxidant and antimicrobial activities of some plants in Algeria and also in the characterization of these plants by studying the chemical composition of essential oils and extracts (hydro-methanolic macerates, extracts obtained successively by soxhlet with solvents of increasing polarity -hexane, dichloromethane, methanol, water-) by analytical tools of natural complex mixtures. There are two Asteraceae: *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. and *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* and four Rutaceae: *Ruta angustifolia* Pers., *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *Ruta graveolens* L. and *Ruta tuberculata* Forsk.

For both species Asteraceae, aqueous-methanolic extracts, and those obtained successively by polar solvents, typically methanol, contain phenolic compounds and have an interesting antioxidant activity, with the exception of *P. saxatile* subsp. *saxatile* flowers. Extracts of *H. stoechas* subsp. *rupestre* flowers and of *P. saxatile* subsp. *saxatile* leafy stem are the most active, with the highest levels of phenolic compounds. These activities are comparable to those of standards with the exception of iron reducing power and iron chelation method. The best activity is obtained by scavenging radical DPPH° with IC₅₀ values between 5.47 and 6.58 µg/mL. Potent antifungal activity of essential oils of species of *Ruta*, was revealed against filamentous fungi. *Cladosporium herbarum* and *Aspergillus fumigatus* are the most sensitive to these oils strains with MIC values below 4 µl/mL for some oils, up to 9 µl/mL for the others.

The relationship between potential studied and the compositions of the extracts and essential oils has been established, respectively, by HPLC-MS and GC-MS. *H. stoechas* subsp. *rupestre* and *P. saxatile* subsp. *saxatile*, of western Algeria, providing a new source of hydroxycinnamic acid derivatives with antioxidant activity. Rich ketones (up 95%), essential oils of *Ruta chalepensis* var. *bracteosa*, *R. graveolens* and *R. angustifolia*, possess chemical compositions frequently described in the literature. However, the essential oil of *R. tuberculata* has a different composition and rarely described, characterized by the predominant presence of monoterpene alcohols (40.79%). The antifungal properties of those essential oils allow them to provide a tool to overcome the problem of the increasing incidence of foodborne illness.

Keywords: *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*, *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, *Ruta*, antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic compounds, essential oil, GC-MS, HPLC-MS.

Introduction générale

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer l'utilisation des plantes comme source essentielle de médicaments. Aujourd'hui, ces plantes et certains de leurs principes actifs rentrent dans la composition d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins, grâce à leurs richesses en métabolites secondaires potentiels. Ces métabolites ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et possèdent un très large éventail d'activités biologiques, telles que les activités antivirale, anti-inflammatoire, antimicrobienne et antioxydante. L'évaluation de ces activités est une tâche très intéressante et a fait l'objet de nombreuses études et publications (**Proestos et al., 2006; Trabelsi et al., 2010; Chaouche et al., 2014**).

Parmi les composés potentiellement intéressants, les antioxydants, généralement des polyphénols, sont particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. L'objectif de ces études est de chercher des molécules susceptibles de protéger l'organisme contre les effets du stress oxydant et de remplacer les antioxydants synthétiques tel que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), largement utilisés pour empêcher ou retarder l'oxydation des lipides des aliments, et qui présentent une certaine toxicité pour les consommateurs (**Albayrak et al., 2010**). Les métabolites des plantes peuvent constituer aussi une source intéressante largement inexplorée pour la création et le développement de nouveaux médicaments qui pourraient aider à résoudre le problème croissant de la résistance, de la toxicité et de la cancérogénicité des antibiotiques actuellement disponibles dans le commerce et qui finissent par perdre leur efficacité (**Falconner et Brown, 2009**). La meilleure alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des huiles essentielles (**Dorman et Deans, 2000**).

Par sa situation géographique, l'Algérie offre une végétation riche en plantes aromatiques qui poussent spontanément. Il est donc intéressant d'étudier leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, face aux obstacles que présente l'utilisation des antibiotiques et des additifs alimentaires de synthèse. C'est dans ce contexte que le présent travail a pris naissance, sur l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles et des extraits de quelques plantes aromatiques d'Algérie. Il s'agit de quatre espèces appartenant à la famille des Rutacées : *Ruta angustifolia* Pers., *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *Ruta graveolens* L. et *Ruta tuberculata* Forsk., collectées respectivement des régions suivantes : Tlemcen (Nedroma), Ain Temouchent (Ain Tolba), Anaba et Béchar, et de deux espèces de la famille des Astéracées : *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. de Honaine et *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* de Fellaoucene, les deux dans la région de Tlemcen.

Plusieurs raisons, sont à la base du choix de ces plantes. Tout d'abord, il est judicieux de choisir des plantes peu ou pas étudiées. C'est le cas de *Ruta tuberculata* et de *Phagnalon saxatile*

subsp. *saxatile* qui sont rarement investiguées. Cependant, une approche différente serait employée pour les plantes largement étudiées comme dans le cas des espèces de *Ruta* et d'*Helichrysum*, généralement réputées pour leur contenu en huiles essentielles. Ainsi, l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle est l'un des principaux critères de choix, même s'il n'y a pas de reconnaissance, à l'heure actuelle, des vertus thérapeutiques des espèces d'*Helichrysum* et de *Phagnalon* en Algérie. Enfin, ces espèces qui poussent dans des milieux riches en microorganismes et parasites, seraient susceptibles de produire des métabolites secondaires qui leur permettent de faire face à ces agressions et donc être une source inestimable de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes.

Ce travail de thèse a été réalisé en trois parties :

- La première aborde une étude bibliographique qui donne des approches sur : Les composés phénoliques et les huiles essentielles ; Les activités antioxydantes et antimicrobiennes et Les plantes étudiées.
- La deuxième illustre le matériel et les méthodes utilisés.
- La troisième est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Enfin, cette étude s'achève par une conclusion générale et des perspectives pour le futur

1^{ère} Partie: présentation bibliographique

Chapitre I.

Composés phénoliques et huiles essentielles

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle les métabolites secondaires. Les principales familles sont les composés phénoliques, les isoprénoïdes et les composés azotés.

Sommaire

- I. Introduction
- II. Composés phénoliques
 - II.1. Phénols, acides phénols et phénylpropanoïdes
 - II.2. Flavonoïdes
 - II.3. Stilbènes
 - II.4. Xanthones
 - II.5. Tanins
 - II.6. Quinones et Emodols
- III. Huiles essentielles
- IV. Activités biologiques des composés phénoliques et des huiles essentielles
- V. Caractérisation et identification des composés phénoliques et des huiles essentielles

I. Introduction

Les métabolites secondaires sont des composés très hétérogènes tant par leurs compositions que par leurs structures. On les trouve dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à une autre. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. Cette opinion a changé du fait de nombreuses recherches qui ont largement montré que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers, d'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés, pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticarcinogènes ou mutagènes (**Macheix et al., 2005**).

II. Composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles. Cette désignation 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 peuvent aller des molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins (**tab. 1**). Ces différentes classes se différencient par la complexité du squelette de base élaboré par la voie de shikimate, par le degré de modification de ce squelette et par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules tel que les métabolites primaires et secondaires. Elles peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées, etc.) (**Harborne, 1998**).

Ces composés peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, etc.) et dans l'interaction des plantes avec leur environnement biologique et physique (relation avec les bactéries, les champignons, les insectes et la résistance aux UV) (**Macheix et al., 2005**).

Tableau 1: Les principales classes des composés phénoliques

<i>Squelette carboné</i>	<i>Classe</i>
C ₆	Phénols simples
C ₆ -C ₁	Dérivés d'acides hydroxybenzoïques
C ₆ -C ₃	Dérivés d'acides hydroxycinnamiques, Coumarines
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes
(C ₁₅) _n	Tanins

II.1. Phénols, acides phénols et phénylpropanoïdes

Les phénols (C₆) sont les dérivés hydroxylés du benzène et des hydrocarbures aromatiques, dans lesquels le groupe OH est lié à un atome de carbone du cycle benzénique. Il est rare de trouver les phénols libres (catéchol, orcinol, phloroglucinol, pyrogallol, vanilline) dans les plantes (**Harborne, 1998**).

Les acides phénoliques sont contenus dans de nombreuses plantes agricoles et médicinales. On distingue deux principales classes, les dérivés de l'acide benzoïque (C₆-C₁) et les dérivés de l'acide cinnamique (C₆-C₃) (**fig. 1**) (**Macheix et al., 2005**). La plupart des composés en C₆-C₃ proviennent de l'acide cinnamique. Les composés en C₆-C₁ formant les tanins hydrolysables et la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés, sont issus de la voie de l'acide shikimique (**Paris et Hurabielle, 1981**).

Les acides hydroxybenzoïques					Les acides hydroxycinnamiques				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. salicylique	OH	H	H	H	Ac. <i>o</i> -coumarique	OH	H	H	H
Ac. <i>p</i> -hydroxy- benzoïque	H	H	OH	H	Ac. <i>m</i> -coumarique	H	OH	H	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH	Ac. <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
Ac. syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ac. férulique	H	H	OH	OCH ₃
Ac. gentisique	OH	H	H	OH	Ac. sinapique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ac. protocatéchique	H	OH	OH	H	Ac. caféique	H	OH	OH	H

Figure 1: Principaux acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques

Les phénylpropanoïdes peuvent contenir un ou plusieurs résidus C₆-C₃. On distingue les coumarines (dérivés par cyclisation) (**fig. 2**), les phénylpropènes (dérivés directs), les lignanes ((C₆-C₃)₂) et les lignines ((C₆-C₃)_n) (**Macheix et al., 2005**).

	R ₁	R ₂	R ₃
Umbelliférol	H	OH	H
Aescultol	OH	OH	H
Scopolétole	OCH ₃	OH	H
Fraxétole	OCH ₃	OH	OH
Daphnétole	H	OH	OH

Figure 2: Principaux types de coumarines

II.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont des fonctions très différentes dans la plante, y compris la pigmentation et la défense. Ces substances ont tous une origine biosynthétique commune, la 4,2',4',6' tétrahydroxychalcone, et par conséquent, possèdent tous la même structure du diphenylpropane (C₆-C₃-C₆). Les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (**fig. 3**). Les génines sont divisés en trois classes, les 2-phénylchromanes (flavan-3-ols, flavan-4-ols et flavane-3,4-diols), les 2-phénylchromones (flavones, flavonols, flavonones et flavononols) et les flavyliums (anthocyanidines, chalcones et auronnes) (**De Rijke et al., 2006**).

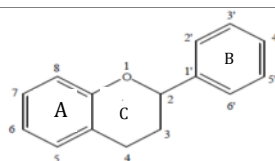
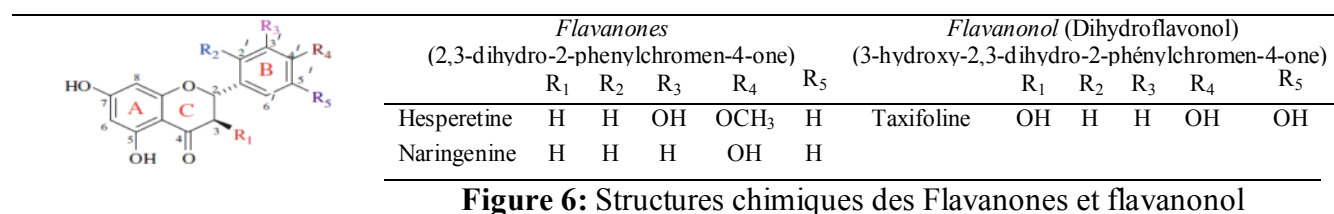
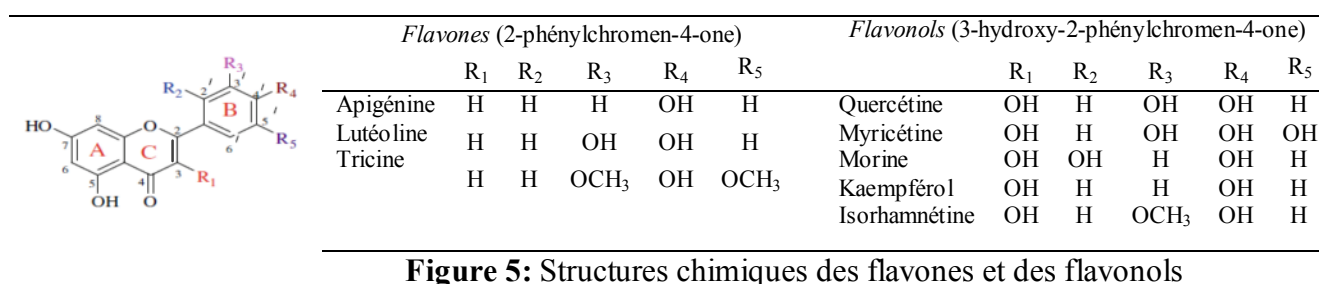
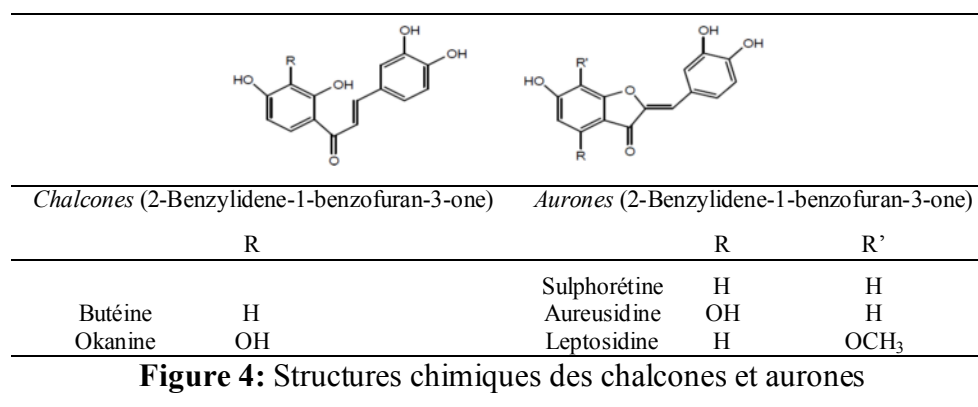


Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes

Les différentes classes diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyles, la présence ou non de substituant sur la génine et le degré de polymérisation. Les formes les plus rencontrées sont issues d'une hydroxylation, alkylation (méthylation ou prénylation), glycosylation et acylation soit sur la génine, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose (Rice-Evans et al., 1996). Ils apparaissent généralement sous forme glycosylée ce qui les rend moins réactifs et plus solubles dans l'eau. Le glucose est le sucre le plus fréquemment rencontré (Bruneton, 1999; Macheix et al., 2005).

Les différentes classes, représentées dans les figures 4-6, sont les flavonoïdes au sens strict. Leur structure porte le noyau aromatique B en position 2 et la distinction des sous-classes se fait suivant la conformation de la structure centrale C (pyrone). Au sens large, il faut inclure aussi les flavanols (flavan-3-ols), les flavanediols (flavane-3,4-diols ou leucoanthocyanidines) (fig. 7) et les anthocyanidols (anthocyanidines) (fig. 8).



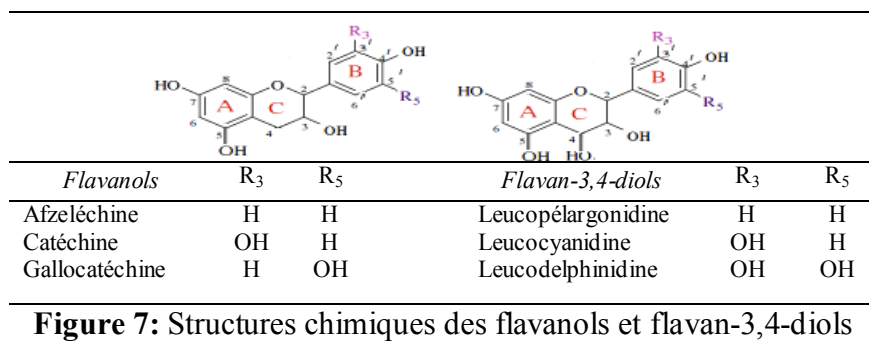


Figure 7: Structures chimiques des flavanols et flavan-3,4-diols

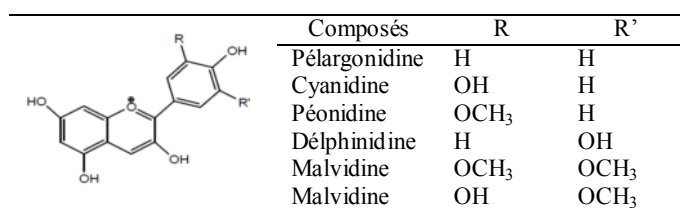


Figure 8: Structures chimiques des anthocyanes

D'autres auteurs ajoutent au groupe des flavonoïdes, les isoflavonoïdes et les biflavonoïdes. Les premiers sont structurellement rattachés aux flavonoïdes, dont le noyau aromatique B est en position 3. Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales parmi lesquelles : isoflavanes, isoflavones (**fig.9**), 3-arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavènes, roténoïdes, ptérocarpanes. Ainsi, les biflavonoïdes sont des formes dimères de flavonoïdes

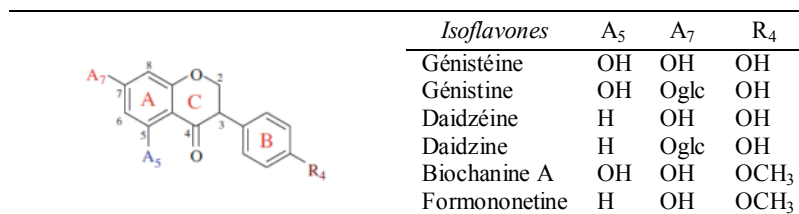


Figure 9: Structure de base des Isoflavones

II.3. Stilbènes

Les Stilbènes ont une structure de base C₆-C₂-C₆. Parmi ces composés on trouve le resveratrol (**fig. 10**) qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales (**Macheix et al., 2005**).

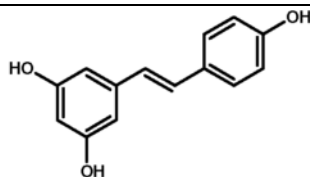


Figure 10: Structure de trans-resveratrol

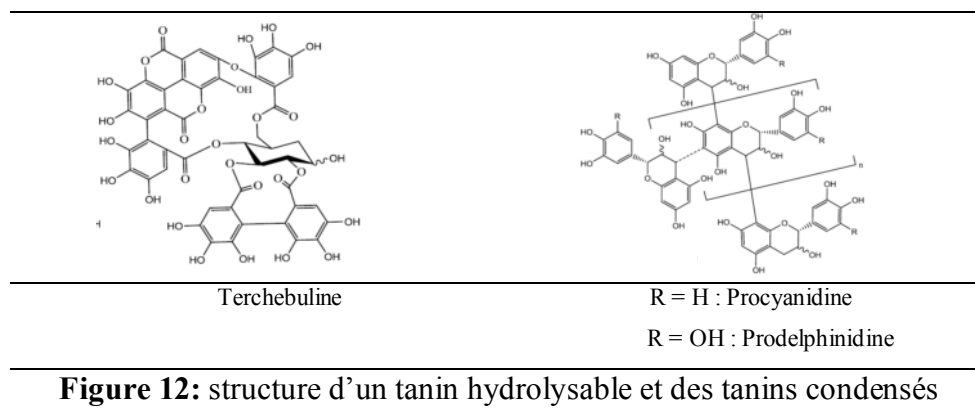
II.4. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques en $(C_{15})_n$, polaires, de saveur astringente, de structures variées et de haut poids moléculaire (> 3000 Da). Ils sont capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter ce qui leur confert la propriété de tanner la peau (Macheix et al., 2005).

Ils sont classés en deux groupes distincts (fig. 12) :

■ **Tanins hydrolysables** : Ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre qui est très généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide- phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques*, soit l'acide hexahydroxy di- phénique et ses dérivés d'oxydation dans le cas des *tanins éllagiques* (Bruneton, 1999).

■ **Tanins condensés ou proanthocyanidols** : Ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Paris et Hurabielle, 1981). Ils sont formés par la condensation de catéchines ou gallocatéchines en formant des dimères (unités de flavanes), puis des oligomères par de liaisons C_4-C_8 ou C_6-C_8 . Ils libèrent, après hydrolyse acide, un anthocyanidol, leur donnant leur nom spécifique (Harborne, 1998).



II.5. Emodols

Les emodols sont des dérivés hydroxyanthracéniques (fig. 13) (Harborne, 1998).

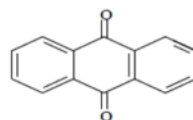


Figure 13: Structure de base d' emodols et d' anthraquinones

III. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, de la classe des Isoprénoïdes, sont produites soit par distillation (hydrodistillation, entraînement à la vapeur), expression de l'écorce des fruits. Elles peuvent être stockées dans divers organes et sont synthétisées par des cellules ou des organes spécialisés variables (poils sécréteurs externes, cellules sécrétrices, poches sécrétrices ou canaux sécréteurs) suivant les familles botaniques (**Bruneton, 1999**).

La plupart sont constituées de mono- et sesquiterpènes issus de la voie de l'acide mévalonique, et des dérivés du phénylpropane C₆-C₃, associés en nombre et en proportions très variables. L'isoprène est le point de départ de la biosynthèse des terpènes (**fig. 14**) (**Belaiche, 1979**). Des composés en C₆-C₁ et des lactones dérivées des acides cinnamiques peuvent être également présents dans certaines huiles essentielles (**Bruneton, 1999**). Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés (des acides organiques de faible poids moléculaire, des cétones de faible poids moléculaire et des coumarines volatiles) (**Paris et Hurabielle, 1981**).

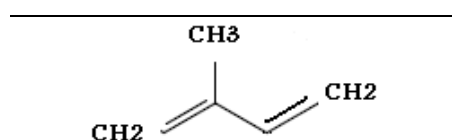


Figure 14: Structure d'isoprène

La composition des huiles varie en fonction du nombre d'atomes de carbone (les monoterpènes C₁₀, les sesquiterpènes C₁₅ et plus rarement les diterpènes C₂₀), du caractère saturé ou insaturé des liaisons, de leur agencement (linéaire ou cyclique), de la configuration spatiale et de la nature des groupes fonctionnels (terpènes, alcools terpéniques, cétones, phénols, aldéhydes, esters et éthers) (**Valnet, 2005**).

A part quelques exceptions et malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques: très odorantes, généralement incolores ou jaunes pâles, fluides, densité inférieure à celle de l'eau, point d'ébullition entre 160°C et 240°C, indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée, entraînables à la vapeur d'eau, dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore, réduisent certains sels, solubles dans les solvants organiques usuels, liposolubles (**Bruneton, 1999 ; Valnet, 2005**).

Grace à leur richesse en terpénoïdes, les huiles essentielles possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales et des interactions végétal- animal. Elles interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs. Pour les plantes désertiques, les

huiles essentielles sont nécessaires à la conservation de l'humidité indispensable à leur milieu de vie (**Belaiche, 1979**).

IV. Activités biologiques des composés phénoliques et des huiles essentielles

Les métabolites secondaires sont recherchés parce qu'ils sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactérienne, anticancéreuse, antifongique, analgésique, anti-inflammatoire, diurétique, antioxydante, etc. (**Dorman et Deans, 2000**).

Les acides phénoliques ont des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et chélatrices. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (**Pšotová et al., 2003**). La phytoalexine populaire, Resvératrol, un agent anticancéreux, est un exemple de composés phénoliques, comme le sont les flavonoïdes et les tanins qui ont des activités antivirale, antitumorale, antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne et hypoglycémiant. L'hypéricine, une anthraquinone isolée de *Hypericum perforatum*, possède également des propriétés antifongiques (**Cowan, 1999**). Les coumarines et les anthocyanosides ont des propriétés anti-œdémateuses. Il est prouvé actuellement que ces composés offrent des possibilités chimio-préventives intéressantes contre certains cancers, en particulier ceux de la région gastro-intestinale (**Peters et al., 2003**). Les coumarines exercent aussi des activités antibactériennes et antifongiques. Elles sont plus efficaces contre les Gram positifs et inhibent la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et la germination des spores d'*Aspergillus niger* (**Cowan, 1999**).

En dehors de leurs propriétés antiseptiques et antimicrobiennes largement utilisées à l'heure actuelle, les huiles essentielles possèdent des propriétés antitoxique, antivenimeuse, antivirale, antiparasitaire et antioxydante (**Valnet, 2005**).

V. Caractérisation et identification des composés phénoliques et des huiles essentielles

La caractérisation de ces produits nécessite l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires avec un dispositif d'outils analytiques rapides et fiables. La résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG), sont celles qui sont les plus employées pour l'analyse qualitative et/ou quantitative des extraits naturels. L'utilisation des couplages multiples a néanmoins démontré son efficacité. Élucider la structure d'un composé nouveau (non décrites dans la littérature) nécessite l'isolement préalable des constituants avant leur analyse, par les diverses techniques séparatives (partition acido-basique, distillation fractionnée, cristallisation,

extraction sélective par les solvants, chromatographie sur colonne (CC), sur couche mince (CCM), CLHP ou CPG préparatives (**Bruneton, 1999**).

V.1. Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN ^{13}C) est préférée aux autres noyaux dans le domaine analytique. L'identification des constituants d'un mélange est réalisée par comparaison des déplacements chimiques du mélange avec ceux des composés de référence contenus dans une ou plusieurs bibliothèques de spectres.

C'est une technique d'identification des constituants d'un mélange complexe, à savoir les huiles essentielles. Il est possible d'identifier par cette méthode la plupart des molécules organiques, même dans les cas de molécules ayant des structures très proches (**Tomi et al., 1995**).

V.2. Chromatographie liquide haute performance

Cette méthode a majoritairement été utilisée pour l'analyse des substances peu ou pas volatiles, thermolabiles ou polaires. Elle demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection. Les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultraviolet visible (UV-Vis), fluorescence, diffusion de lumière (DEDL), électrochimie, spectrométrie de masse (SM) et résonance magnétique nucléaire. Avec le développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique, l'electrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (CL-SM) est devenu la technique la plus efficace et de ce fait la plus utilisée pour l'analyse des composés phénoliques, en particulier des flavonoïdes, dans des mélanges complexes (**Cuyckens et Claeys, 2004**). Ce couplage fournit, en fonction du type de technique de masse employée, divers éléments relatifs à la masse moléculaire de chaque constituant d'un mélange mais également des informations découlant du comportement en chromatographie liquide (temps de rétention en fonction du type de colonne), de l'absorbance UV et permet des comparaisons avec des standards ou des données préalablement acquises (**Prasain et al., 2004**).

V.3. Chromatographie en phase gazeuse

C'est une méthode d'analyse qui est préférentiellement utilisée dans le cas des molécules naturellement volatiles comme celles qui sont présentes dans les huiles essentielles. Elle peut être utilisée pour des molécules plus lourdes en utilisant une température isotherme élevée. Ces molécules lourdes peuvent également être rendues volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition par des réactions de dérivatisation (acétylation, silylation). L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée et qui dépend des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, etc). Une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation des indices de rétention. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. La CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM) en mode impact électronique (IE), dite CPG-SM(IE), est la technique la plus utilisée pour l'analyse des produits naturels (**Rojas-Escudero et al., 2004**).

Chapitre II.

Activités antioxydantes et antimicrobiennes

L'exploration des huiles essentielles et des composés phénoliques pour la recherche de molécules à activités antimicrobienne et antioxydante semble être une voie intéressante. Il serait donc nécessaire de s'intéresser à ces activités et de comprendre le rapport entre elles et la structure chimique de ces composés.

Sommaire

- I. Activités antioxydantes
 - I.1. Oxydants et antioxydants
 - I.2. Polyphénols, huiles essentielles et activités antioxydante
 - I.3. Mode d'action des antioxydants
 - I.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante
- II. Activités antimicrobiennes
 - II.1. Microbes et antimicrobiens
 - II.2. Polyphénols, huiles essentielles et activité antimicrobienne
 - II.3. Spectre d'action des antimicrobiens naturels
 - II.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

I. Activités antioxydantes

I.1. Oxydants et antioxydants

Le stress oxydant est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules lorsqu'ils sont soumis à une production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui dépasse leurs capacités antioxydantes, à savoir l'oxygène moléculaire (O_2), le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) (**Favier, 2006**). Ces éléments réactifs sont instables et sont connus sous le nom des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou encore des Formes Réactives de l'Oxygène (FRO) (**De Moffarts et al., 2005**).

L'excès de radicaux libres non neutralisés par les défenses est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules, entraînant des anomalies d'expression des gènes et des récepteurs membranaires, prolifération ou mort cellulaire, troubles immunitaires, mutagenèse, dépôts de protéines ou de lipofuschine dans les tissus. Donc, le stress oxydant est le facteur déclenchant de plusieurs **maladies** graves (cancers, Alzheimer, pathologies oculaires, etc.) (**Favier, 2006**).

Pour se protéger contre l'effet toxique de ces radicaux, l'organisme a développé des systèmes de défense composés d'antioxydants : enzymes, vitamines, oligo-éléments, protéines (la ferritine) et qui permettent de réguler la production des ERO. Ces antioxydants peuvent être définis comme des substances qui, présentes à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, préviennent significativement ou retardent l'initiation du processus

d'oxydation (**Halliwell, 1995**). Ils sont d'origine endogènes (synthétisés et sous contrôle de l'expression de gènes) ou exogènes (alimentation et complémentation) (**De Moffarts et al., 2005**), enzymatiques ou non-enzymatiques (**Droge, 2002**).

I.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Ce type d'antioxydants possède une action directe sur les ERO et sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme. Les trois enzymes antioxydants majeurs sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (**De Moffarts et al., 2005**).

I.1.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les substances non enzymatiques représentent la deuxième ligne de défense contre les oxydants. Le système glutathion (GSH) reste un acteur majeur dans cette défense (**Sen et Packer, 2000**). Deux autres groupes d'antioxydants participent à la défense antioxydante :

- **Les antioxydants lipophiles** : les tocophérols, les rétinoïdes, les polyphénols, l'ubiquinol, la bilirubine et la mélatonine.
- **Les antioxydants hydrophiles** : l'acide urique, la vitamine C, les dérivés thiol et l'acide hyaluronique, les polyphénols (**De Moffarts et al., 2005**).

I.2. Polyphénols, huiles essentielles et activité antioxydante

Les composés phénoliques sont des antioxydants puissants avec des propriétés réductrices, de piégeage des radicaux libres, d'inhibition des systèmes enzymatiques responsables de la génération de radicaux libres et de chélation des métaux (**Kumaran et Karunakaran, 2007; Bourgou et al., 2008**).

Yu-Ling et al. (2008) ont montré récemment que les antioxydants phénoliques dans les plantes sont principalement composés d'acides phénoliques et de flavonoïdes qui ont des capacités d'inhiber l'oxydation lipidique, de prévenir les dommages oxydatifs de l'ADN et de piéger les ERO.

L'efficacité antioxydante des huiles essentielles a été rapportée dans de nombreux travaux antérieurs et semble être liée à l'activité de certains types de composés tels que les monoterpènes oxygénés, en particulier les alcools et les phénols (**Bourgou et al., 2008**). Des travaux montrent une activité antiradicalaires intéressante de terpinène-4-ol, géraniol, eugénol et thymol (**Ruberto et Baratta, 2000 ; Dorman et Deans, 2000**). Cependant, les hydrocarbures sesquiterpéniques et leurs dérivés oxygénés ont une très faible activité antioxydante (**Ruberto et Baratta, 2000**).

Les huiles essentielles de l'origan, du thym et du girofle ont été largement étudiées pour leurs activités antioxydantes, en raison de la teneur élevée en composés phénoliques (thymol, carvacrol et eugénol) (Wei et Shibamoto, 2010). Il en est de même pour les huiles essentielles de la cannelle, du fenouil, de l'ail et du gingembre (Atarés et al., 2010).

Dans l'huile essentielle de citronnelle, l'activité antioxydante peut être expliquée par la présence du β -citronellol et du β -citronellal. Les huiles essentielles de la coriandre, de la sauge, du romarin, de l'estragon, du basilic et de la marjolaine ont montré des activités antioxydantes importantes. Les composés γ -terpinène, (-)-camphre, (-)-bornylacetate, eucalyptol et méthylchavicol, ont été détectés dans leurs compositions chimiques (Ruberto et Baratta, 2000).

I.3. Mode d'action des antioxydants

Les antioxydants peuvent réagir à différentes étapes du procédé d'oxydation et ils peuvent avoir plus d'un mécanisme d'action, ce qui ne facilite pas leur classification (Frankel et Meyer, 2000).

I.3.1. Les antioxydants préventifs par inhibition d'enzymes ou par chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2^{\cdot -}$ et d'autres ERO, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, la lipooxygénase, la monooxygénase microsomal et la glutathion S-Transférase. Les flavonoïdes ayant un groupe catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000).

Ils peuvent aussi chélater les catalyseurs des réactions d'oxydation tels que les ions métalliques (fer et cuivre), c'est le cas par exemples des flavonoïdes (tels que la quercétine) et du sélénium (Cuyckens et Claeys, 2004). Les sites de liaison proposés pour chélater les traces de métaux par les flavonoïdes sont la fraction catéchol dans le cycle B, le 3-hydroxyle, les groupes 4-oxo dans le noyau hétérocyclique, et les 4-oxo, les groupes 5-hydroxy entre l'hétérocycle et le cycle A (fig. 15).

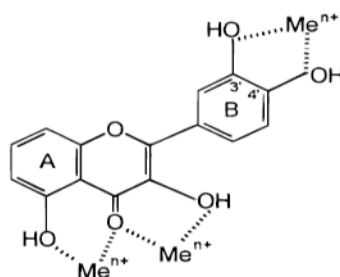


Figure 15: Sites de liaison proposés pour chélater les traces de métaux par les flavonoïdes

I.3.2. Les antioxydants piègeurs des ERO

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes: la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivés phénoliques) et d'un électron (cinétique lente des dérivés glycosylés et des anthocyanes). Les antioxydants rentrent en compétition avec des radicaux déjà existants et contribuent à bloquer la phase de propagation. Dans le cas des composés phénoliques, le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome d'hydrogène. À cause de leur faible potentiel redox, ils sont capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\cdot) comme le superoxyde, le radical peroxy, le radical alkoxy et le OH^\cdot par transfert d'hydrogène (**fig. 16**). Le radical aroxyte résultant peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable. Les flavonoïdes sont aussi des principaux donneurs d'électrons. Cette capacité est appelée pouvoir réducteur (**Rice-Evans et al., 1996 ; Huang et al., 2005**).

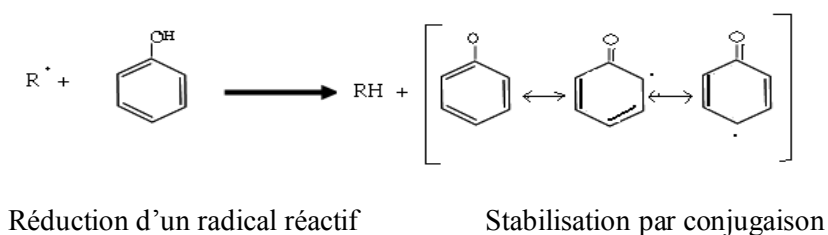


Figure 16 : Propriétés réductrices des polyphénols

I.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), le tertbutylhydroquinone (TBHQ) sont des antioxydants synthétiques qui sont utilisés depuis de nombreuses années dans l'industrie alimentaire. Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur leurs toxicité élevée (**Albayrak et al., 2010**). L'intérêt pour les antioxydants naturels, qui a commencé depuis les années 1990, a stimulé le développement de méthodes efficaces et fiables afin de déterminer la capacité antioxydante de ces produits. Il n'existe pas de test de référence, *in vitro*, pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon, sachant de plus que cet échantillon peut présenter divers mécanismes d'action. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester.

Les lipides sont les principaux constituants alimentaires vulnérables à l'oxydation, qui se traduit par une détérioration généralisée de l'aliment. Diverses méthodes de dosage de l'activité antioxydante, *in vitro*, dans des aliments ou dans des systèmes biologiques, induisent l'oxydation

de lipides ou lipoprotéines dans des conditions standardisées. L'activité antioxydante est déterminée à partir de la mesure de l'inhibition de cette oxydation. D'autres protocoles de dosage mesurent l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres, c'est-à-dire l'activité antiradicalaire (Test au DPPH° et à l'ABTS^{°+}). Le test du pouvoir réducteur (Test de réduction du Fer) met en avant la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron alors que celui de la chélation des ions Fe²⁺ repose sur la capacité d'une molécule à fixer les ions Fe²⁺. Ces ions jouent un rôle important lors de la production des radicaux libres notamment lors de la réaction de Fenton, qui survient à chaque fois qu'une molécule d'H₂O₂ est en contact d'ions Fe²⁺ et qui est à l'origine de la production des radicaux hydroxyles (OH), un des radicaux les plus réactifs. Le fer joue aussi un rôle dans la phase de propagation de la lipoperoxydation ainsi que dans la formation du radical O₂ (Huang et al., 2005).

Les tests qui ont été réalisés dans le cadre de ce travail sont les suivants :

I.4.1. Le test de la capacité antioxydante totale: Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte (Prieto et al., 1999).

I.4.2. Le test de piégeage du radical DPPH°: Le corps à doser est ajouté à une solution de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) qui est un radical stable et coloré. Le maximum de son absorption dans le visible se situe vers 515-517 nm, dans le méthanol et l'éthanol. La réduction de ce radical par un donneur d'atome H (AH) conduit à la formation de DPPH-H de couleur jaune et du radical (A°) (Gouveia et Castilho, 2012).

I.4.3. Le test de la réduction de fer: C'est une méthode basée sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe (II). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986).

I.4.4. Le test d'inhibition de blanchiment du β-carotène: Dans ce système, le β-carotène, considéré comme une molécule cible, est exposé à des radicaux libres formés par oxydation de l'acide linoléique, en présence d'un piègeur de radicaux libres, c'est à dire l'extrait testé. C'est l'inhibition du blanchiment du β-carotène qui va être mesurée à 470 nm (Koleva et al., 2002).

I.4.5. Le test de piégeage du radical ABTS^{°+}: En réagissant avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈), l'ABTS [acide 2,2'- azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)] forme le radical ABTS^{°+}, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoque une décoloration mesurée à 734 nm (Re et al., 1999).

I.4.6. Le test de chélation de fer: La quantification de complexe ferrozine-Fe²⁺ par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à piéger cet élément (**Zhao et al., 2006**).

II. Activités antimicrobiennes

II.1. Microbes et antimicrobiens

Notre organisme est constamment confronté à la possibilité de pénétration de micro-organismes pathogènes. Face aux problèmes de l'émergence de germes multi-résistants aux antibiotiques, de la néphrotoxicité dose-dépendante de l'amphotéricine B et de la tolérance hépatique pour quelques antifongiques, notamment les azolés, la découverte de nouvelles molécules, capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action, est devenue une nécessité absolue. Les nouveaux antibactériens devraient pouvoir induire la mort cellulaire en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant des mécanismes d'action originaux et les nouveaux agents antifongiques doivent avoir un large spectre d'action fongicide, de nouveaux mécanismes d'action et moins d'effets secondaires (**Falconner et Brown, 2009 ; Dannaoui, 2013**).

II.2. Polyphénols, huiles essentielles et activité antimicrobienne

Pour se protéger contre les bactéries et les champignons, les plantes synthétisent une multitude de molécules antimicrobiennes. Ces ressources naturelles, délaissées au profit des molécules de synthèse, sont à nouveau exploitées pour mener les recherches sur les antimicrobiens. La meilleure alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des huiles essentielles. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée *in vitro* et *in vivo* (**Dorman et Deans, 2000**).

L'activité antimicrobienne des polyphénols a été largement étudiée contre un large éventail de micro-organismes. Parmi lesquels, les flavan-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu le plus d'attention en raison de leur large spectre d'activité antimicrobienne. Les propriétés antimicrobiennes de certaines classes de polyphénols ont été proposées soit pour développer de nouveaux conservateurs alimentaires (**Rodriguez Vaquero et al., 2010**) ou pour le traitement des infections microbiennes diverses (**Saavedra et al., 2010**).

II.3. Spectre d'action des antimicrobiens naturels

Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont plus élevées pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/mL et 1000 µg/mL. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI, variant de 0.01 µg/mL à 10 µg/mL, suffisent à générer une activité inhibitrice (**Tegos et al., 2002**).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. L'activité des molécules qui les constituent dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Les composés chimiques de plus grande efficacité antibactérienne et à plus large spectre, dans les huiles essentielles, sont des phénols, des aldéhydes, des alcools et des cétones (**Valnet, 2005**).

L'acide caféique du thym et le catéchol du piment de Bethel, sont responsables des propriétés antimicrobiennes de ces plantes. Leur mécanisme d'action n'est pas bien connu, mais, il pourrait inclure une inhibition enzymatique, probablement à travers une réaction avec les groupes sulfhydryles ou des interactions non-spécifiques avec les protéines. De plus, le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique pourraient être en relation avec leur toxicité relative sur les microorganismes (**Cowan, 1999**). L'activité des flavonoïdes est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Cependant, les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires (**Daglia, 2012**). Les principales cibles des quinones dans la cellule microbienne sont les adhésines, les polypeptides et les enzymes membranaires (**Cowan, 1999**), alors que les tanins exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines (**Gescher et al., 2005**).

II.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des substances d'origine naturelle, peut être mise en évidence, *in vitro*, par un grand nombre de techniques classiques. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'extrait testé ou selon la nature du contact de l'extrait testé avec le germe. Les tests qui ont été réalisés dans le cadre de ce travail sont les suivants (NCCLS, 2001):

II.4.1. Méthode des disques dans un milieu gélosé

Des disques de papier wattman, imprégnés des agents antimicrobiens à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure des souches à étudier. L'activité est déterminée par le calcul de diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne, produite autour des disques après incubation, exprimée soit en centimètre soit en millimètre.

II.4.2. Méthodes des dilutions

Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose ou en bouillon. L'efficacité de l'agent antimicrobien peut être fournie par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB), qui sont respectivement, la concentration la plus faible capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier, et la concentration la plus faible capable de tuer ce microorganisme.

Il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les CMI mesurées par les techniques de dilution. Dans cette relation, appelée droite de concordance ou droite de régression, la zone d'inhibition est inversement proportionnelle à la CMI de l'essai.

a- En milieu liquide

L'inoculum microbien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'agent antimicrobien où aucune croissance n'est visible.

b- En milieu solide

L'agent antimicrobien est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose est ensemencée avec un inoculum microbien à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'agent antimicrobien.

Chapitre III.

Plantes choisies pour la réalisation de ce travail

L'intérêt porté aux plantes aromatiques n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à quatre espèces appartenant à la famille des *Rutacées* et à deux espèces de la famille des *Astéracées*. Pour chaque espèce, nous détaillons la description botanique, sa répartition géographique, la composition chimique, ses propriétés et son utilisation médicinale.

Sommaire

- I. Famille des *Rutacées*
 - I.1. *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss.
 - I.2. *Ruta graveolens* L.
 - I.3. *Ruta tuberculata* Forsk.
 - I.4. *Ruta angustifolia* Pers.
- II. Famille des *Astéracées*
 - II.1. *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*
 - II.2. *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*

I. Famille des *Rutacées*

Ruta vient du grec « rhyté » qui signifie sauvé, prévenir, ou de « reô » qui signifie qui coule, faisant certainement référence à ses vertus emménagogues. Les *Rutacées* sont caractérisées par leur ovaire générale ou leur fruit qui, au moins dans sa partie supérieure, est divisé en autant de parties qu'il y a de sépales dans la fleur. Il y a 4 ou 5 sépales, 4 ou 5 pétales et 8 ou 20 étamines. Ce sont des plantes odorantes, à feuilles alternes, composées chacune de folioles distinctes. Les espèces de *Ruta* ont des fleurs régulières, un calice persistant à la base du fruit. Les plus connues sont très proches en forme, composition et en propriétés pharmacologiques (Bonnier, 1999).

Selon Bramwell et Bramwell (2001), il existe huit espèces d'arbustes vivaces, avec quatre espèces du pourtour méditerranéen (*R. chalepensis* L., *R. graveolens* L., *R. angustifolia* Pers. et *R. montana* (L.) L.), une espèce endémique aux îles de Corse et de Sardaigne (*R. corsica* DC.), et trois espèces endémiques des îles Canaries (*R. pinnata* Lf, *R. oreojasme* Webb et Berth. , *R. microcarpa* Svent.). Une neuvième espèce a été décrite, à la place de *R. corsica* de la Sardaigne, sur la base morphologique, caryologique et les différences écologiques. Il s'agit de *R. lamarmorae* (Bacchetta et al., 2006). Selon Ozenda (1991), une espèce de *Ruta* est commune dans tout le Sahara septentrional. Il s'agit de *R. tuberculata* Forsk. Son synonyme est *Haplophyllum tuberculatum* Juss.

Les études phytochimiques réalisées sur des espèces de *Ruta* caractérisent la présence d'alcaloïdes, des flavonoïdes, des coumarines, des tanins, une huile volatile, des glucosides, des

stéroïdes et triterpènes (Chen et al., 2001), des acides aminés et des saponines (Hnatyszyn et al., 1974).

I.1. *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss. « Rue à grandes bractées »

I.1.1. Description botanique et répartition géographique

Ruta chalepensis (photo 1) est une plante vivace de 30-80 cm de haut. Elle est verte, glabre, non glanduleuse dans le haut. Elle se caractérise par des feuilles étroites avec des segments oblongs-lancéolés ou ovales et inflorescence en cyme (Hnatyszyn et al., 1974). Les fleurs jaunes sont à 4-5 sépales et 4-5 pétales frangés, égalant seulement la moitié de la largeur des pétales. Les bractées sont ovales ou lancéolées, beaucoup plus large que la tige à laquelle elles sont rattachées. Floraison : Mai- Juillet (Bonnier, 1999).



Photo 1: *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss.

Cette plante pousse en général sur les pentes rocheuses. Elle est originaire de la région méditerranéenne et pousse actuellement dans de nombreuses régions du monde, notamment en Amérique latine et ce après la conquête espagnole (Cáceres, 1999).

- **Noms communs :**

En France : Rue d'Alep (Cáceres, 1999).

En Arabe: *Southab ù ùb* (Baba Aissa, 1999).

- **Noms vernaculaires en Algérie :** *aouermi* أورمي, *fidjela* فذيلة (Baba Aissa, 1999).

- **Position systématique (Dupont et Guiguard, 2007)**

Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous Classe :	Eurosidiées II
Ordre :	Sapindales
Famille:	Rutaceae
Genre Espèce :	<i>Ruta chalepensis</i> (DC.) Boiss.
Variété :	<i>bracteosa</i>

- **Synonymes :** *Ruta chalepensis* (L.), *Ruta bracteosa* (DC.), *Ruta chalepensis* subsp. *bracteosa* (DC.) Batt. (Hudaib et al., 2008).

I.1.2. Composition chimique

Ruta chalepensis contient des alcaloïdes (choloridone, skimmianine, kokusaginine) (Ulubelen et Terem, 1988), des coumarines (rutalpinine, chalepine, bergaptène, chalepensine) (Ulubelen et Terem, 1988 ; Shehadeh et al., 2007), un flavonoïde glycosidique (rutine) (Shehadeh et al., 2007) et une huile essentielle riche en cétones (2-undécane, 2-décane, 2-dodécane, 2-nonane, pulégone et camphre) (Ben Bnina et al., 2010 ; Mejri et al., 2010).

I.1.3. Propriétés et utilisations

Cette espèce est connue pour être utilisée comme emménagogue, abortif, anthelminthique (Di Stasi et al., 1994). C'est un dépresseur de système nerveux central à pouvoir névralgique, analgésique, sédatif, hypnotique, anxiolytique et anticonvulsivant (Gonzalez-Trujano et al., 2006). Elle est souvent utilisée en cas d'hystérie, d'épilepsie, de vertiges, des maux de tête, de l'anxiété (Bejar et al., 1997) et des troubles mentaux (Mansour et al., 1990).

Elle a également des propriétés anti-inflammatoires (Atta et Alkofahi, 1998), antihypercholestérolémiant, antidiarrhéique (Novais et al., 2004), sudorifique, antispasmodique, antidiabétique, anti-venin (Hudaib et al., 2008), immunopharmacologiques (Iauk et al., 2004), antifongique contre les dermatophytes (Ali-Shtayeh et Abu-Ghdeib, 1999 ; Ben Bnina et al., 2010), stérilisantes (Gijon et al., 1995), antipyrétique et est utilisée pour le traitement de l'hydropisie, des rhumatismes, des troubles menstruels (Mansour et al., 1990), des coliques, des vers intestinaux et des problèmes oculaires (Bejar et al., 1997).

Les résultats d'une étude sur la toxicologie périnatale de *Ruta chalepensis* chez la souris, confirment l'effet embryotoxique de cette plante (Zeichen de Sa et al., 2000).

I.2. *Ruta graveolens* L.

I.2.1. Description botanique et répartition géographique

Ruta graveolens L. (photo 2) est une vivace, glauque, glabre, non glanduleuse dans le haut, à feuilles persistantes pouvant atteindre un mètre de haut, avec une couleur caractéristique vert grisâtre et une forte odeur désagréable.

Les feuilles sont petites, de forme oblongue, deux à trois fois profondément divisées inégalement, pennées, glandulaires en pointillés. Les tiges sont très ramifiées.



Photo 2 : *Ruta graveolens* L.

Ses fleurs sont petites, jaunes en grappes au printemps et en été. Ils ont 4 pétales non frangés, à l'exception de la fleur centrale, qui dispose de 5 pétales. Les fruits, un peu plus courts que leurs pédoncules, sont arrondis au sommet, brun, petit à 4-5 lobes. Floraison : Mai- Juillet (**Bonnier, 1999**).

C'est une plante qui préfère les rochers, le bien-drainés et elle résiste à la sécheresse. Elle est originaire d'Europe, spécialement de la région Méditerranéenne, mais largement distribuée dans toutes les régions tempérées et les régions tropicales (**Bonnier, 1999**).

- **Noms communs**

En France : Rue-officinale, rue-puante, rue fétide, rue des jardins, herbe à la belle-fille, rue des murailles (**Bonnier, 1999**), rue odorante, herbe de grâce (**Font Quer, 1983**).

En Anglais : Rue, herbygrass (**Font Quer, 1983**).

- **Nom vernaculaire en Algérie : Fidjen فيجن (Abdulbasset et Abde Tawab, 2008).**

- **Position systématique (Dupont et Guiguard, 2007)**

Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous Classe :	Eurosides II
Ordre :	Sapindales
Famille:	Rutaceae
Genre espèce:	<i>Ruta graveolens</i> L.

1.2.2. Composition chimique

Cette plante contient différentes classes de produits naturels tels que les alcaloïdes acridone, des coumarines, une huile essentielle, des flavonoïdes (rutine) et des furoquinolines (**Kuzovkina et al., 2004**).

1.2.3. Propriétés et utilisations

Cette plante a des effets établis comme excitant, sudorifique, antihelminthique (**Bonnier, 1999**), antimicrobien, cytotoxique (**Ivanova et al., 2005**), fongicide (**Meepagala et al., 2005**), herbicide (**Hale et al., 2004**), anti-inflammatoire (**Raghav et al., 2006**), hypotensif (**Chiu et Fung, 1997**), antispasmodique, vermifuge, emménagogues (**Mantle et al., 2000**), anti-fertilité féminine, abortifs (**De Freitas et al., 2005**), immobilisant des spermatozoïdes et antiandrogènes (**Khouri et El-Akawi, 2005**). Elle peut contribuer à l'amélioration de la mémoire et la cognition (**Rodrigues et al., 2008**).

Elle peut être utilisée comme calmant, analgésique et pour le traitement de l'hystérie, des convulsions, des crises chez les nourrissons et les enfants (**Watt, 1967**), des rhumatismes, de la dermatite (**Conway et Slocumb, 1979**) et des problèmes oculaires (**Mantle et al., 2000**).

I.3. *Ruta tuberculata* Forsk.

I.3.1. Description botanique et répartition géographique

Ruta tuberculata Forsk. (photo 3) est une herbe à tiges de 30 à 60 cm de haut, très rameuses dans leur partie supérieure. Les feuilles sont lancéolées ou souvent très allongées (en apparence fasciculées par suite du développement des feuilles du bourgeon axillaire), enroulées en dessous par leurs bords, à face supérieure couverte. Les fleurs sont petites en corymbe au sommet de la tige, à 4 pétales jaunes, 8 étamines et 4 carpelles donnant une capsule. Floraison : Printemps (Ozenda, 1991).



Photo 3 : *Ruta tuberculata* Forsk.

Elle est commune dans tout le Sahara septentrional, dans les dépressions peu sablonneuses, jusqu'au Tadmait au sud. Elle semble absente ou très rare dans le Sahara central et méridional (Ozenda, 1991).

- **Noms vernaculaires en Algérie :** *Fidjel* (YN, JZ), *Mzabia* (UN, JZ), *Hamliche* et *Maiza*, (2006)
- **Position systématique (Dupont et Guiguard, 2007)**

Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous Classe :	Eurosidées II
Ordre :	Sapindales
Famille :	Rutaceae
Genre espèce :	<i>Ruta tuberculata</i> Forsk.

- **Synonyme:** *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. (Ozenda, 1991).

I.3.2. Composition chimique

Les études phytochimiques menées sur cette espèce caractérisent la présence d'acides aminés, des saponines (Hnatyszyn et al., 1974), des lignanes (Sheriha et al., 1987), des alcaloïdes, des flavonoïdes, des coumarines, des tanins, de l'huile essentielle, des glycosides, des stérols et des triterpènes (Chen et al., 2001).

I.3.3. Propriétés et utilisations

Cette plante est utilisée pour enlever les tâches de rousseur, pour traiter la décoloration de la peau, les maladies infectieuses et parasitaires (Mossa et al., 1987), le paludisme, la polyarthrite rhumatoïde, les troubles gynécologiques (Al-Yahya et al., 1992), les douleurs osseuses et

articulaires, la dysménorrhée, la stérilité féminine, l'accouchement difficile, l'anémie, les problèmes de foie et des intestins, la fièvre et les maux de tête (**Hammiche et Maiza, 2006**).

L'extrait éthanolique des parties aériennes de cette plante possèdent une bonne activité insecticide contre les moustiques *Culex quinquefasciatus* (**Zohair et al., 1989**).

I.4. *Ruta angustifolia* Pers. « la rue à feuilles étroites »

I.4.1. Description botanique et répartition géographique

Ruta angustifolia Pers. (**photo 4**) est une vivace à tiges dressées, de taille moyenne (30 à 80cm), glauque, glanduleuse dans le haut, à feuilles ovales dans leur contour général, 2 à 3 fois divisées en segments oblongs, disposées en spirale. L'inflorescence est en phase terminale ou axillaire de la feuille supérieure et combine souvent en corymbe.



Photo 4 : *Ruta angustifolia* Pers.

Les bractées sont lancéolées et petites. Les fleurs sont jaunes assez grandes, sur des pédoncules ramifiés partant de l'aisselle des feuilles ou au sommet de la tige. Le calice à 4 (5) sépales ovales, ciliés-frangés, est nettement plus court que les pétales étalés (4 ou 5), de 7-10 mm, oblongue et bordés de cils plus longs que la largeur du pétale. La capsule est lisse, avec des segments acuminés (**Austin, 2002**), à 4 ou 5 lobes aigus au sommet. Floraison : Mai à Juillet/Aout (**Lieutaghi, 2006**).

Cette espèce prospère dans des conditions assez sèches à l'ombre partielle, mais survit avec succès en plein soleil. Elle est facile à cultiver sur tous les sols, mais préfère un sol bien drainé calcaires argileux. C'est une plante originaire de la région méditerranéenne (Europe méridionale, nord de l'Afrique) (**Bonnier, 1999**). Elle a été introduite dans le Proche-Orient, en Inde et en Asie du Sud (**Austin, 2002**).

- **Noms communs (Lieutaghi, 2006)**

En français : Rue à feuilles étroites.

En Anglais: Narrow-leaved fringed Rue.

- **Noms vernaculaires en Algérie : Fidjel yYNJ(Lieutaghi, 2006)**

- **Position systématique (Dupont et Guiguard, 2007)**

Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous Classe :	Eurosidiées II
Ordre :	Sapindales
Famille:	Rutaceae
Genre espèce:	<i>Ruta angustifolia</i> Pers.

- **Synonyme:** *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia* (Pers.) Cout. (Valdes et al., 1987).

I.4.2. Composition chimique

Ruta angustifolia contient des coumarines (angustifoline, scoparone et 6,7,8-triméthoxycoumarine), un alcaloïde (gravéoline), une huile essentielle et un dérivé de shikimate (moskachanes) (Del Castillo et al., 1986).

I.4.3. Propriétés et utilisations

Selon **Bonnier (1999)**, les propriétés médicinales de cette plante sont les mêmes que celles de *Ruta graveolens*.

II. Famille des *Astéracées*

La famille des Astéracées (Composées) est riche en plantes vasculaires, avec 1600 à 1700 genres et 24000- 30000 espèces (Funk et al., 2005). Dans le secteur phytogéographique oranais, on trouve cette famille avec 38 genres et 67 espèces (Kazi Tani et al., 2010).

Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il existe des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille. Ils ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes aux autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée un involucre (Barreda et al., 2010).

II.1. *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct.

II.1.1. Description botanique et répartition géographique

Le mot *Helichrysum* du grec désigne « helios »: soleil et « chrysos »: or. Il est approprié à ce genre en tenant compte des fleurs jaunes attrayantes de plusieurs espèces. Le genre *Helichrysum* comprend environ 600 espèces répandues partout dans le monde, dans le sud de l'Europe, le sud-ouest de l'Asie, le sud de l'Inde, le Sri Lanka et l'Australie (Van Wyk et al., 2012; Morone-Fortunato et al., 2010). La plupart des espèces sont présentes en Afrique, y compris Madagascar (Van Wyk et al., 2012). Ce genre est représenté dans la région méditerranéenne par près de 25 espèces indigènes (Morone-Fortunato et al., 2010) et en Algérie par *H. iacteum*, *H. italicum* et *H. stoechas* (subsp. *rupestre* et subsp. *scandens*) (Quezel et Santa, 1963).

Helichrysum stoechas subsp. *rupestre* (photo 5)

est un arbuste vivace, rameux-dressé, caractéristique de la région méditerranéenne, qui peut atteindre 25cm de haut (Garcia De Quesada et al., 1972). Les feuilles, souvent glabrescentes en dessus et tomenteuses en dessous (couvertes de poils laineux blancs), sont étroites alternes, non odorantes par froissement.



Photo 5: *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct

Les tiges sont ligneuses aux bases, densément blanches et tomenteuses. Les fleurs sont groupées, de couleur jaune, les capitules sont en corymbe lâche et les bractées de l'involucre sont ovoïdes (Quezel et Santa, 1963).

En Algérie, elle pousse dans les côtes rocheuses et sableuses, dans les Sahels littoraux oranais, les plaines littorales oranaises, l'Atlas tellien oranais, le littoral algérois, l'Atlas tellien algérois, la Grande Kabylie, la Petite Kabylie, la Numidie et le Tell constantinois (**Medjahdi et al., 2009**).

- **Noms communs**

En Français : Immortelle, Immortelle des sables, Immortelle des dunes (**Duffaud, 1998**).

En Anglais : Shrubby everlasting (**Barros et al., 2010**).

- **Noms vernaculaires en Algérie** : *Zeheur ed daïme* ⵍⵛⵉⵛⵓⵔⵉⵎⵉ, *Chegara* ⵉⵛⵉⵖⵉⵔⵓⵔ, *Arfiya* ⵏ ⵏⵉⵙⵏⵉⵔⵉⵎⵉ
Atsa lala Fatma ⵏ ⵏⵉⵙⵏⵉⵔⵉⵎⵉ (**Quezel et Santa, 1963 ; Trabut, 2006**).

- **Position systématique (Dupont et Guiguard, 2007)**

Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous Classe :	Euasteridées II
Ordre :	Astérales
Famille:	Asteraceae
Genre espèce:	<i>Helichrysum stoechas</i> auct.
Sub espèce:	<i>rupestre</i>

- **Synonyme:** *Helichrysum fontanesii* (Camb.) (**Quezel et Santa, 1963**).

II.1.2. Composition chimique

Une large gamme des produits naturels couvrant presque toutes les classes fondamentales connues exceptées des alcaloïdes ont été isolés dans les espèces du genre *Helichrysum* (**Rios et al., 1991 ; Tomas-Barberan et al., 1988 ; Afolayan et Meyer, 1997**). Ces plantes contiennent des terpènes, des huiles essentielles, des flavonoïdes (**Czinner et al., 2000**), des acides phénoliques, des coumarines et des micronutriments (Cu, Mn, Zn) (**Dombrowicz et al., 1994**).

Les parties aériennes d'*Helichrysum stoechas* contiennent des fractions triterpéniques, des stérols, des acides gras (acide linoléique, acide palmitique, acide linoléique et acide oléique) (**Garcia De Quesada et al., 1972**), une huile essentielle (α - pinène, limonène, α - bisabolol et β - carophyllène) (**Sobhy et El- Feky, 2007**), des composés phénoliques appartenant aux acides phénoliques (isomères d'acide caféoylquinique, isomères d'acide di-caféoylquinique), aux flavonoïdes (naringénine, apigénine, quercétine -3-O- glucoside, kampférol -3- O-glucosides et tétrahydroxychalcone-2'-O- glucoside) et aux coumarines (**Carini et al., 2001 ; Hwisa, 2011**).

II.1.3. Propriétés et utilisations

Helichrysum stoechas a des activités antioxydantes, antiallergiques (**Carini et al., 2001**), antimicrobiennes (**Rios et al., 1991**), antifongiques (**Tomas-Barberan et al., 1990**), anti-

inflammatoires, antitussive, fébrifuge et antihelminthiques (Reico et al., 1991 ; Carini et al., 2001). La sous espèce *rupestre* a des activités anticoagulante, mucolityque et cicatrisante (Jahandiez et Marie, 1934).

II.2. *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile*

II.2.1. Description botanique et répartition géographique

Le genre *Phagnalon* est représenté par environ 36 espèces réparties dans le monde entier, dont six sont typiques de la région Méditerranéenne (Qaiser et Abid, 2003). Ce sont des plantes rupestres, vivaces, caractérisées par des feuilles inférieures linéaires-lancéolées, les supérieures étroitement linéaires et \pm révolutes. Les tiges sont rameuses et tomenteuses. Elles sont caractérisées par des capitules sur des pédoncules longs et grêles, solitaires ou agglomérés 2-6, qui sont soit hétérogames, multiflores et discoïdes. Elles ont un involucre campanulé à bractées imbriquées sur 3 ou plusieurs rangs, les extérieures plus courtes et à la fin étalées en étoile. Les akènes sont petits, sans côtes, cylindriques et poilus et les aigrettes à poils unisériés. Parmi les espèces de *Phagnalon* on cite : *P. sordidum*, *P. Garamantum*, *P. saxatile* (Quezel et santa, 1963).

Phagnalon saxatile subsp. *saxatile* (photos 6) est un arbuste vivace, très ramifié à la base, avec des feuilles ovales, étroites et allongées, à bords souvent ondulés, très cotonneuses sur leur face inférieure, vert blanchâtre sur la face supérieure. Les capitules sont le plus souvent solitaires à l'extrémité des pédoncules avec des bractées membraneuses, à pointe brunâtre, et les extérieures entièrement scarieuses, étalées ou réfléchies. Les fleurs sont jaunes (Quezel et Santa, 1963). Floraison : Mai à Juin (Rivas Martínez et al., 2001).



Photo 6: *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile*

C'est une plante très commune, endémique du pourtour méditerranéen. Elle pousse dans les fissures rocheuses calcaires, les murs et vieilles pierres et dans les endroits rocheux ensoleillés et secs, de préférence acides, de 100 à 1200 m d'altitude (Rivas Martínez et al., 2001).

- **Noms communs en Français :** Immortelle des pierres, Phagnalon des rochers (Trabut, 2006).

- **Noms vernaculaires en Algérie :** *Foddia FNJfZrfedj* □□□ *Motti* □□□ *Taam el arnab* ⵜ ⵏ ⵏ ⵏ ⵏ (Trabut, 2006).

- **Position systématique (Dupont et Guiguard, 2007)**

Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicots
Sous Classe :	Euasteridées II
Ordre :	Astérales
Famille:	Asteraceae
Genre espèce:	<i>Phagnalon saxatile</i> (L) Cass.
Sub espèce:	<i>saxatile</i>

- **Synonymes:** *P. saxatile* (L.) Cass. (Quezel et Santa, 1963).

II.2.2. Composition chimique

Des études ont montré la présence d'une huile essentielle (Senatore et al., 2005), des composés phénoliques à savoir, le 3,3 - diméthylallyl-P-benzoquinone (Dolci et Tira, 1982), l'acide caféique, l'acide méthylchlorogénique (Filomena et al., 2010), la lutéoline, l'acide 3,5-dicaféoylquinique et des flavonoïdes tels que l'apigénine, l'apigénine-7-glucoside (Conforti et al., 2010), dans la partie aérienne de *Phagnalon saxatile*.

II.2.3. Propriétés et utilisations

Phagnalon saxatile a des propriétés analgésiques et est utilisée pour diminuer le taux de cholestérol dans le sang (Santayana et al., 2005). L'huile essentielle de cette espèce ne montre aucune activité antimicrobienne (Senatore et al., 2005). Cette espèce a été testée pour la première fois, *in vitro*, dans le traitement de l'inflammation et de la maladie d'Alzheimer et a montré une activité antioxydante significative et un effet inhibiteur sur la production du médiateur inflammatoire (l'oxyde d'azote) dans les macrophages (Conforti et al., 2010).

2^{ème} Partie: Matériel et méthodes

Cette deuxième partie permet de décrire avec précision la provenance des plantes étudiées, les méthodes et les techniques utilisées et appropriées à l'objectif visé par ce travail de recherche.

Sommaire

- I. Méthodologie
- II. Matériel et méthodes utilisés
 - II.1. Provenance des plantes étudiées
 - II.2. Méthodes d'extractions
 - II.2.1. Procédures d'isolement des huiles essentielles
 - a. Hydrodistillation
 - b. Entraînement à la vapeur d'eau
 - II.2.2. Préparation des extraits hydro-méthanoliques
 - II.2.3. Extraction par des solvants organiques à polarité croissante
 - II.3. Quantification de quelques classes phénoliques dans les extraits
 - II.3.1. Polyphénols totaux
 - II.3.2. Flavonoïdes totaux
 - II.3.3. Tanins condensés
 - II.4. Estimation des activités biologiques, *in vitro*
 - II.4.1. Détermination de l'activité antioxydante
 - a. Capacité antioxydante totale
 - b. Piégeage du radical DPPH[°]
 - c. Piégeage du radical ABTS^{°+}
 - d. Pouvoir réducteur du fer
 - e. Pouvoir chélateur du fer
 - f. Inhibition de blanchiment du β -carotène
 - II.4.2. Détermination de l'activité antimicrobienne
 - a. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en disque
 - b. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)
 - II.5. Identification des huiles essentielles et des composés phénoliques
 - II.5.1. Analyse des huiles essentielles par CG-SM
 - II.5.2. Analyse des composés phénoliques par CLHP Orbitrap-SMⁿ
 - II.6. Analyses statistiques

I. Méthodologie

Une méthodologie, schématisée dans la **figure 17**, a été suivie pour mener à bien ce travail. Ce schéma permet d'avoir une vision de la démarche réalisée selon trois phases : la préparation des extraits, les dosages et les activités antioxydantes et antimicrobiennes, et enfin l'identification des extraits les plus actifs.

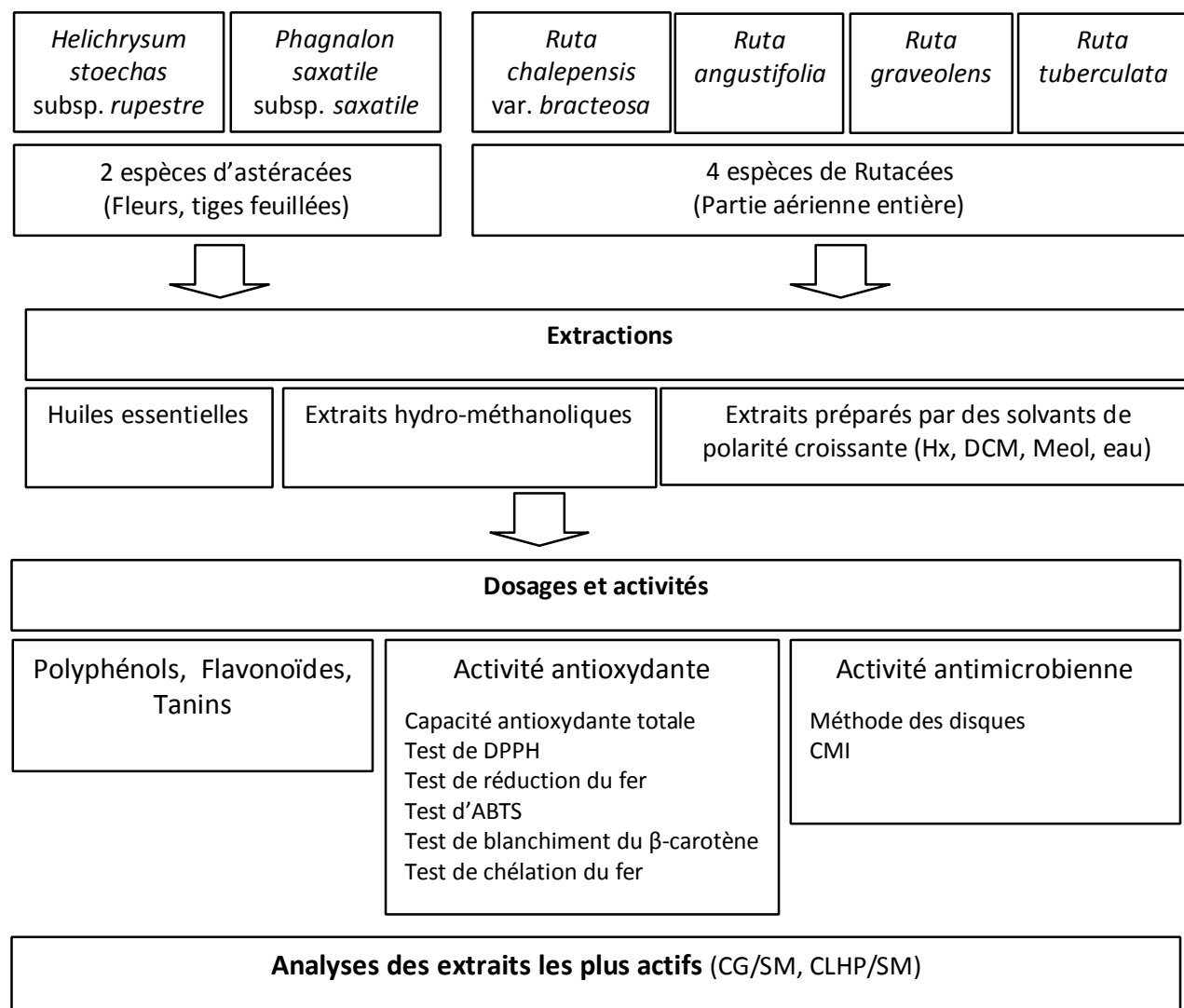


Figure 17: Méthodologie du travail

II. Matériel et méthodes utilisés

II.1. Provenance des plantes étudiées

Les parties aériennes des espèces de *Ruta* ont été collectées lors de la floraison, en Juin 2011, dans quatre régions différentes de l'Algérie. *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* a été recueillie à Ain Temouchent (Ain Tolba : 35° 14' 54" N, 1° 14' 56" O) et *R. angustifolia* à Tlemcen (Nedroma : 35° 00' 47" N, 1° 44' 51" O). *Ruta graveolens* a été recueillie à Annaba (36° 54' 15" N, 7° 45' 07" E) et *R. tuberculata* à Béchar (31° 37' 00" N, 2° 13' 00" O) (**fig. 18**).

Helichrysum stoechas subsp. *rupestre* et *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile* ont été recueillies pendant la période de la floraison, en Juin 2011 et ce dans deux régions de Tlemcen à l'Ouest de l'Algérie. Les parties aériennes d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* ont été recueillies à Honaine (35° 10' 35" N, 1° 39' 18" W) et celles de *P. saxatile* subsp. *saxatile* à Fellaoucene (35° 02' 06" N, 1° 36' 21" W) (**fig. 18**).

Toutes les plantes étudiées ont été identifiées et des spécimens ont été déposés à l'herbier du laboratoire des produits naturels, Département de biologie, Université de Tlemcen. Les plantes ont été séchées à température ambiante pendant deux semaines.

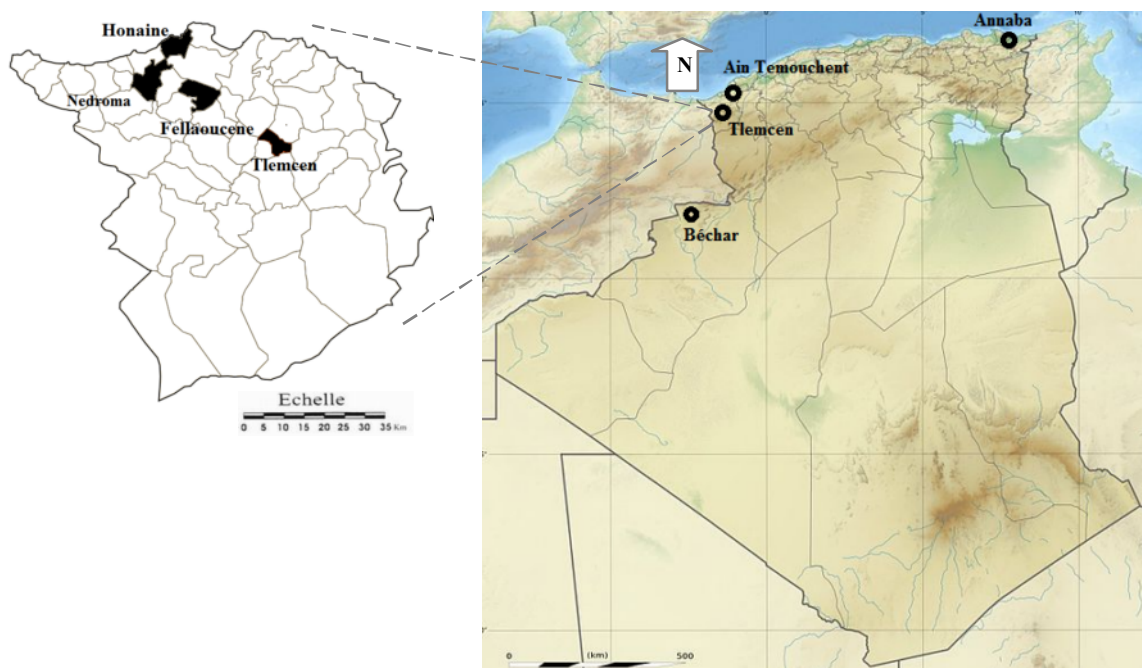


Figure 18: Carte de localisation des stations de récoltes

II.2. Méthodes d'extractions

II.2.1. Procédures d'isolement des huiles essentielles et calcul de leurs densités relatives

a. Hydrodistillation

Cent grammes de parties aériennes de chaque espèce de *Ruta* ont été soumis à une hydrodistillation pendant 3 heures en utilisant le Clevenger. Dans ce type d'extraction, le végétal est en contact direct avec l'eau bouillante

b. Entraînement à la vapeur d'eau

Deux killogrammes de parties aériennes d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* et de *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile* sont supportés, pendant 3 heures, dans un alambic par une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau. Il est donc en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante.

Pour les deux procédés d'extraction, les huiles essentielles ont été récupérées directement, sans ajout de solvant, et stockées dans des flacons sombres à 4°C. Le rendement en huiles essentielles est déterminé en calculant le rapport suivant : $Rdt \% = [P1 / P2] \times 100$

P1 : Poids en gramme de l'huile essentielle récupérée;

P2 : Poids en gramme de la matière végétale sèche de départ.

Les rendements ont été énoncés dans la moyenne \pm écart type de trois répétitions.

La densité relative des huiles essentielles est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. Elle est déterminée selon un protocole standard (AFNOR, 2000). On remplit le pycnomètre, d'une capacité de 5ml, avec de l'eau distillée récemment bouillie puis refroidie aux environ de 25°C. On le plonge dans un bain marie, jusqu'à équilibre de la température aux environ de 20°C et on le retire. Après essuyage, on pèse le pycnomètre, ensuite on remplace l'eau par l'huile essentielle. La densité relative est calculée par la formule suivante :

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

m₀ : Masse en gramme du pycnomètre vide

m₁ : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée

m₂ : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle

II.2.2. Préparation des extraits hydro-méthanoliques

Pour la réalisation des extraits, les fleurs des deux Astéracées sont séparées des tiges feuillées, contrairement aux espèces de *Ruta* qui possèdent des fleurs fragiles et de taille très petite.

Les extraits ont été obtenus par une macération sous agitation magnétique pendant 24 h de 2 g de la poudre de plante avec 25 ml de méthanol- eau (80-20). Les extraits hydro-méthanoliques ont été évaporés à 45°C sous pression réduite.

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt \%} = [P1 - P2 / P3] \times 100$$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale sèche de départ.

Les rendements ont été énoncés dans la moyenne \pm écart type de trois répétitions.

L'extrait sec est pesé et repris, soit dans quelques millilitres de méthanol pour les dosages et les évaluations de l'activité antioxydante, soit dans quelques millilitres de DMSO pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Ils ont été conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

II.2.3. Extraction par des solvants organiques à polarité croissante

L'extraction est effectuée par épuisement successif du matériel végétal par un soxhlet durant 24 heures, en utilisant quatre solvants à polarité croissante : hexane (Hx), dichlorométhane (D), méthanol (M) et eau (A), méthode décrite par Diallo et al. (2004) et Hadj Salem et al. (2011). Cette technique est retenue car elle favorise une extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale (Romanik et al., 2007).

La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale selon la partie de la plante et son absorption du solvant. Nous disposons généralement 200 ml de solvant pour 50 g de poudre. Après le passage de chaque solvant, les extraits sont ensuite évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait aqueux était, pour sa part, lyophilisé grâce à un lyophilisateur.

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec en calculant la perte de poids en pourcentage de la matière sèche de départ: $Rdt \% = [P1 - P2 / P3] \times 100$

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale sèche de départ.

Les rendements ont été énoncés dans la moyenne \pm écart type de trois répétitions.

L'extrait sec est pesé et repris, soit dans quelques millilitres de méthanol pour les dosages et les évaluations de l'activité antioxydante, soit dans quelques millilitres de DMSO pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Ils ont été conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

II.3. Quantification de quelques classes phénoliques dans les extraits

II.3.1. Polyphénols totaux

Le réactif utilisé, le «Folin-Ciocalteu», est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 750 nm. Ce dosage est effectué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (**Boizot et al., 2006**).

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et al. (2006)** : Une prise de 100 μ l de l'extrait est mélangée avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm.

Une gamme étalon à base de l'acide gallique est également préparée à des concentrations allant de 0 à 400 μ g/mL. Les teneurs en Polyphénols totaux des extraits sont alors exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

II.3.2. Flavonoïdes totaux

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par deux réactifs incolores, le nitrite de sodium (NaNO_2) et le chlorure d'aluminium (AlCl_3). Elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

La quantification des flavonoïdes est faite selon une méthode colorimétrique décrite par **Dewanto et al. (2002)**. Une prise de 250 μL d'extrait diluée est additionnée de 75 μL d'une solution de NaNO_2 à 5%. Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 μL d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) sont ajoutés au mélange. Après 5 mn de repos à température ambiante, 500 μL de soude (NaOH , 1M) sont apportés au mélange, et le volume final est porté à 2.5 mL avec de l'eau distillée. L'absorbance de cette préparation est mesurée contre un blanc à 510 nm. Une gamme étalon à base de catéchine est également préparée à des concentrations allant de 0 à 400 $\mu\text{g/mL}$. Les teneurs en flavonoïdes des extraits sont alors exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS).

II.3.3. Tanins condensés

En présence d'acide sulfurique, les tanins condensés se dépolymérisent et, par réaction avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, mesurables par spectrophotométrie à 500 nm. Une prise de 50 μl d'extrait est ajoutée à 3 ml de vanilline à 4% et 1.5 ml d'acide sulfurique concentré. Après homogénéisation, le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 15 mn. L'absorbance est mesurée contre un blanc à 500 nm. Les teneurs en tanins condensés, déterminées en se référant à une gamme étalon de catéchine (0 à 400 $\mu\text{g/mL}$), sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/ g MS) (**Sun et al., 1998**).

II.4. Estimation des activités biologiques, *in vitro*

II.4.1. Détermination de l'activité antioxydante

a. Capacité antioxydante totale

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte. Une prise de 100 μl d'extrait est combinée dans un tube avec 1ml de solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Les

tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après un repos de 6 mn à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. Comme pour les polyphénols totaux, l'activité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/ g MS) (Prieto et al., 1999).

b. Piégeage du radical DPPH°

Le DPPH° (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Gouveia et Castilho, 2012). La méthode de DPPH° présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH° (de couleur violette), en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical (fig. 19). La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.



Figure 19: Forme réduite du radical DPPH°

Le protocole expérimental suivi est celui d'Atoui et al. (2005) : À différentes concentrations, 50 µl de chaque extrait, sont ajoutés à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH° à 6.34×10^{-5} M (0.0025 g dans 100 ml méthanol). Pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH° à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la réduction du DPPH° s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution. La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le témoin positif utilisé est le butylhydroxytoluène (BHT). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$PI = (D.O_{\text{témoin}} - D.O_{\text{extrait}} / D.O_{\text{témoin}}) \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

D.O témoin : absorbance du témoin négatif. D.O extrait : absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI₅₀). Une valeur de CI₅₀ faible correspond à une grande efficacité de l'extrait.

c. Piégeage du radical ABTS^{•+}

Le radical ABTS^{•+} est produit par réaction entre l'ABTS et une solution à 4.9 mM de persulfate de potassium. Ce mélange est agité pendant 16 h à l'obscurité puis dilué par l'éthanol jusqu'à obtenir une absorbance à 734 nm de 0.700 ± 0.02 . Une prise (950 μ l) de cette solution d'ABTS^{•+} est ensuite mélangée avec 50 μ l d'extrait à différentes concentrations. Après 6 mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm contre un blanc (Re et al., 1999). Les résultats permettent de calculer et d'exprimer cette activité antiradicalaire en pourcentage d'inhibition et en CI₅₀ comme décrit précédemment pour le DPPH[•]. Les valeurs de CI₅₀ sont comparées avec celles des standards de référence: le BHT et le TROLOX (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylique).

d. Pouvoir réducteur du fer

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer (Huang et al., 2005). Le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ fournit des ions Fe³⁺ qui seront réduits en Fe²⁺ par les antioxydants présents dans l'extrait végétal. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986). Cette méthode consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 2.5 ml de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 2.5 ml d'une solution de K₃Fe(CN)₆ à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 mn à 50°C, puis 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% (m/v) sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 650 g pendant 10 mn à température ambiante et 2.5 ml du surnageant sont additionnés de 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de FeCl₃ à 0.1% (m/v). La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace (CE₅₀), concentration de l'extrait correspondante à une absorbance égale à 0.5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire (D.O = f ([])). L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle de témoins positifs, l'acide ascorbique (vitamine C) et le butylhydroxyanisole (BHA).

e. Pouvoir chélateur du fer

Pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine. Ce composé forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur violette intense. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur de cet extrait est important.

Une prise de 100 μ l d'extrait de plante est ajoutée à 50 μ l de FeCl₂, 4H₂O (2 mM). Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 mn, 100 μ l de ferrozine (5 mM) sont ajoutés, suivis de 2.75

ml d'eau distillée (Zhao et al., 2006). Le mélange est laissé au repos pendant 10 mn à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc (sans ferrozine). Les résultats sont comparés à ceux d'un témoin négatif (où l'extrait est remplacé par du méthanol) et d'un témoin positif, acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Comme pour le test avec le DPPH°, le pouvoir chélateur est calculé par l'équation décrite précédemment. L'utilisation de plusieurs concentrations d'extrait de plante permet de déterminer la concentration de l'extrait qui provoque 50% de chélation du fer (CI₅₀).

f. Inhibition de blanchiment du β-carotène

Dans le test d'inhibition de blanchiment du β-carotène, les radicaux peroxydes se forment lorsque l'acide linoléique est oxydé et attaquent les molécules du β-carotène hautement insaturées qui subissent par conséquent une décoloration rapide. Cette activité a été déterminée selon la méthode de Koleva et al. (2002). On dissout 2 mg de β-carotène dans 20 ml de chloroforme, puis 4 ml de cette solution sont mis dans un ballon à fond plat avec 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation sous vide du chloroforme, le mélange est repris dans de l'eau distillée aérée. Dans une microplaque à 96 puits, 150 µl de cette émulsion sont additionnés de 10 µl d'extrait végétal de concentration connue. Les microplaques sont alors mises en incubation à 50°C pendant 120 mn et la D.O est mesurée (à T = 0 et T = 120 mn) à 470 nm grâce à un lecteur de microplaques (model EAR 400, Labsystems Multiskan MS). L'activité de l'extrait est calculée par rapport à celle du témoin négatif (sans extrait) et le pourcentage d'inhibition (PI) est obtenu comme suit :

$$PI = [(D.O_{E120} - D.O_{T120}) / (D.O_{T0} - D.O_{T120})] \times 100$$

D.O_{E120} = absorbance de l'extrait à T = 120 mn

D.O_{T120} = absorbance du témoin négatif à T = 120 mn

D.O_{T0} = absorbance du témoin négatif à T = 0 mn

Cette activité est également exprimée en CI₅₀ comme décrit pour le test au DPPH°. Le témoin positif utilisé est le BHA.

II.4.2. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits a été évaluée en utilisant des souches de référence de laboratoire (American Type Culture Collection "ATCC" pour les bactéries et *Candida albicans*, Musé National d'Histoire Naturelle "MNHN" pour les champignons filamenteux), obtenues par le Laboratoire des produits naturels, département de Biologie (Université de Tlemcen, Algérie):

- Bactéries à Gram positif: *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Enterobacter cloacea* (ATCC 13047), *Enterococcus faecalis* (ATCC 49452), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- Bactéries à Gram négatif: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090).
- Champignon non filamenteux : *Candida albicans* (ATCC 26790).
- Champignons filamenteux : *Aspergillus fumigatus* (MNHN 566), *Aspergillus flavus* (MNHN 994294), *Cladosporium herbarum* (MNHN 3369), *Fusarium oxysporum* (MNHN 963917), *Alternaria alternaria* (MNHN 843390).

Les souches ont été revifiées et la turbidité a été ajusté à 0.5 McFarland, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (D.O = 0.08 à 0.1/ λ = 625nm), $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour *C. albicans* (D.O = 0.12 à 0.15 / λ = 530 nm) (NCCLS, 2001) et 10^6 spores / ml pour les champignons filamenteux (68-82% de transmittance / λ = 530 nm) (Pfaller et al., 1998). Les cultures ont été diluées avec bouillon Mueller-Hinton pour les bactéries, bouillon Sabouraud pour *C. albicans* et une solution saline stérile pour les souches fongiques, afin d'atteindre des densités optiques correspondantes pour chaque test.

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne, *in vitro* : une méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé et les méthodes de dilution (méthode de micro-dilution en bouillon pour les bactéries et *C. albicans*, la méthode de dilution en milieu gélosé pour les champignons). Les zones d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la gentamicine et de l'amphotéricine B ont été également déterminées dans des expériences parallèles afin de contrôler la sensibilité des micro-organismes d'essai. Tous les tests ont été effectués en double.

a. Méthode de diffusion en disque

Les huiles essentielles et les extraits ont été testés pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en disques, selon le Comité national des normes du laboratoire Cliniques (NCCLS, 2001) en utilisant 100 μ L de suspension des microorganismes testés, contenant 2×10^8 UFC / ml pour les bactéries, $1 - 5 \times 10^6$ UFC / ml pour *C. albicans* et 2×10^5 spores / ml pour les souches fongiques. Les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud gélosés, stériles et refroidi jusqu'à 45-50°C, ont été distribués dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre (15 ml). Les disques de papier filtre (6 mm de diamètre) ont été individuellement imprégnés avec 10 μ L

de l'huile ou de l'extrait et ensuite placés sur la surface du milieu gélosé déjà inoculés avec les microorganismes testés.

Les boîtes de Pétri ont été conservés à 4°C pendant 2 h et ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 30°C pendant 24h pour *C. albicans* et 48h pour les souches de champignons. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés, y compris le diamètre des disques. Cette mesure est transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (**tab. 2**) (Ponce et al., 2003 ; Biyiti et al., 2004).

Tableau 2: La transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D)

Inhibition	Transcription	Sensibilité
D < 8mm	-	Résistante
9mm ≥ D ≤ 14	+	Sensible
15mm ≥ D ≤ 19mm	++	Assez sensible
D ≥ 20mm	+++	Très sensible

Tous les tests ont été effectués en double. La gentamicine (15 µg / disque) et l'amphotéricine B (20 µg / disque) ont servi de témoins positifs.

b. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour les bactéries et *C. albicans*, la méthode de micro-dilution en bouillon a été utilisée pour déterminer la CMI selon le Comité national des normes du laboratoire cliniques (NCCLS, 2001). Tous les tests ont été effectués dans le milieu Mueller Hinton en bouillon. Les huiles et les extraits étudiés ont été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1%, puis dilués à la concentration la plus élevée. Des dilutions en série ont été préparées dans une microplaque de microtitration de 96 puits dans la gamme de concentration choisie. Les souches, dont la concentration finale a été ajusté à 5×10^5 UFC/ml pour les bactéries et à 2.5×10^6 UFC/ml pour *C. albicans*, sont ajoutées dans chaque puit. Les bactéries et *C. albicans* ont été respectivement incubées, à 37°C et à 30°C, pendant 24 heures. La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'extrait à laquelle le micro-organisme ne démontre pas une croissance visible. La croissance des microorganismes a été indiquée par la turbidité. La gentamicine a été utilisée comme composé de référence.

Pour les champignons filamenteux, les méthodes de dilution ont été sélectionnées par le sous-comité des tests de sensibilité aux antifongiques du NCCLS. Cependant, les techniques qui utilisent l'agar sont largement utilisées car elles sont simples et de réalisation aisée pour ces organismes. Dans ce travail, les CMI ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu gélosé (Soliman et Badeaa, 2002). Les souches testées ont été cultivées dans l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA), dans des boîtes de Pétri, pendant 5-7 jours. Les huiles ou les extraits

testés, dissous dans du DMSO à 1%, ont été utilisés à différentes concentrations. Chaque concentration a été mélangée avec le milieu PDA semi-solide et stérile et ensuite versé dans des boîtes de Pétri stériles (15 ml dans chaque plaque). Un disque de 6 mm de diamètre de la gélose recouverte de mycélium a été placé sur la surface de la gélose. Les plaques ont été incubées pendant 5-7 jours à 28°C. Deux répétitions ont été faites pour chaque test. L'amphotéricine B a été utilisée comme composé de référence.

II.5. Identification des huiles essentielles et des composés phénoliques

II.5.1. Analyse des huiles essentielles par CG-SM

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (*Agilent Technologies 7890A*) - spectrométrie de masse (*HP 5975C*) avec ionisation par impact électronique (70 eV). Une colonne capillaire HP-5MS (30 m × 250 µm, 0.25 µm d'épaisseur de film) a été utilisée. La température du four a été programmée pour passer de 60 à 220°C à une vitesse de 40° C/min, la température de la ligne de transfert est de 230°C. Le gaz porteur est l'hélium avec un débit de 0.8 ml/min et un rapport de division de 50:1. La numérisation de la plage de temps et de masse sont respectivement de 1s et 50-550 *m/z* (**Zaouali et al., 2013**). Les composants ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention relatifs et les spectres de masse avec les données de la bibliothèque CG-SM de composants d'huiles essentielles, Wiley, Mass-Finder et Adams. La détermination de la composition en pourcentage est fondée sur la normalisation de la surface du pic sans utiliser les facteurs de correction.

II.5.2. Analyse des composés phénoliques par CLHP Orbitrap-SMⁿ

L'analyse qualitative des composés phénoliques a été réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (SM), système munie d'une pompe de distribution de solvant binaire (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) relié à un détecteur à barrette de diodes (PDA) et un spectromètre de masse hybride LTQ Orbitrap équipé d'une pression atmosphérique d'ionisation d'interface fonctionnant en mode électrospray (ESI), mode d'ions négatifs et positifs (**Larbat et al., 2012**).

Vingt microlitres d'extrait ont été séparés sur une colonne LiChroCART C18 (250 mm × 4.6 mm, Merck, Allemagne), avec un débit de 700 µl/min. Les phases mobiles sont composées de 0.1% d'acide formique dans de l'eau ultra-pure (A) et 0.1% d'acide formique dans du méthanol ultra-pure (B). Les composés phénoliques sont élués en utilisant un gradient d'élution, à l'aide d'une première étape isocratique à 1% de B pendant 2 min, puis un gradient linéaire de 1% à

50% de B pendant 50 min, et enfin un gradient linéaire allant de 50% à 90% de B pendant 60 min.

La détection est réalisée par un détecteur à barrette de diodes (200-800 nanomètre). Les aires de pics des extraits sont mesurées à la longueur d'onde de 280 nm. L'analyse par spectrométrie de masse est effectuée en deux modes d'ionisation, positif (ESI+), et négatif (ESI-), dans les conditions suivantes:

pour le mode ESI+: tension électrospray à 5 kV; sources de gaz fixées à 40 (le gaz de nébulisation), 10 (gaz d'auxiliaire) et 10 (gaz rideau) unités arbitraires min⁻¹; température du capillaire fixée à 300°C; tension du capillaire à 48 V; tensions de la lentille «tube lens» (138 V), de la lentille «split lens» (- 38 V) et de la lentille «front lens» (- 4.25 V).

Pour le mode ESI-: les conditions sont les mêmes sauf celles des paramètres optiques des ions qui ont été automatiquement adaptées comme suit: tension capillaire à - 48 V; tensions de la lentille «tube lens» (-138 V), de la lentille «split lens» (38V) et de la lentille «front lens» (4.25 V).

Les paramètres optiques ioniques ont été optimisés en mode *ESI+* par un réglage automatique par l'utilisation d'une solution standard de rutine à 0.1 g/l infusée dans la phase mobile (A/B: 50/50) à un débit de 5 µl/min.

L'analyse complète des spectres de spectrométrie de masse (SM) a été réalisée à haute résolution (R = 30000) sur un analyseur Orbitrap de 120 à 2000 *m/z* (rapport masse/charge) pour obtenir des masses exactes et des scans en MS² ont été automatiquement réalisés sur un analyseur LTQ (Linear Trap Quadripole) pour une étude structurale.

Les données sont traitées à l'aide du logiciel XCALIBUR[®] (version 2.1, <http://www.thermoscientific.com>). Les masses exactes expérimentales ont été comparées à des banques de données (Pubchem Compound: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, ReSpect: <http://spectra.psc.riken.jp/>, Mass Bank: <http://www.massbank.jp>) et de la littérature disponible afin d'identifier la nature des métabolites.

II.6. Analyses statistiques

Les valeurs indiquées dans les tableaux sont des moyennes ± écarts-types des trois mesures parallèles. Les valeurs de CI₅₀ ont été calculées à partir des équations linéaires ou logarithmiques des courbes. Les coefficients de corrélation entre les composés phénoliques et les méthodes de l'activité antioxydante ont été démontrés en utilisant EXCEL (2010).

3^{ème} Partie: Résultats et discussions

Chapitre I.

**Activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles et de quelques extraits de deux espèces d'Astéracées
« *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. et *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* »****Résumé**

Objectifs: Les huiles essentielles et quelques extraits des fleurs et des tiges feuillées de deux plantes originaires d'Algérie, *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* et *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, ont été choisies pour étudier leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. **Méthodes:** Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les six méthodes suivantes: capacité antioxydante totale, piégeage du radical DPPH[°], piégeage du radical ABTS^{°+}, pouvoir de la réduction du fer, capacité de la chélation du fer et inhibition de blanchiment du β -carotène. La détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée sur de souches bactériennes et fongiques, par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé et celle des dilutions en milieu liquide. **Résultats:** Les huiles essentielles de ces deux espèces, dont les rendements sont négligeables, ne peuvent pas faire l'objet de cette étude. A l'exception du macérât hydro-méthanolique des fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, les trois autres macérâts ont montré une activité antioxydante intéressante. Les plus fortes teneurs en composés phénoliques, en tanins et la plus grande capacité antioxydante totale (97.5 ± 0.33 mg EAG /g MS), ont été obtenues pour l'extrait des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. L'extrait hydro-méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* a révélé la teneur la plus élevée en flavonoïdes et la plus forte activité antioxydante par les autres méthodes, par rapport aux normes, à l'exception des pouvoirs réducteur et chélateur du fer. La meilleure activité est obtenue en piégeant le radical DPPH[°] avec une valeur de CI₅₀ de 5.65 ± 0.10 μ g/mL. Les extractions successives au soxhlet, par des solvants de polarité croissante, ont permis de sélectionner les solvants qui conduisent à des extraits ayant des capacités antioxydantes importantes, communément riches en molécules bioactives. A l'exception de l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, les extraits obtenus par des solvants polaires (méthanol et eau), se sont révélés les plus actifs avec les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes les plus élevées. Ce type d'extraction pourrait apporter des résultats intéressants en combinaison à d'autres techniques d'identification chimique. Les extraits hydro-méthanoliques n'ont montré aucune activité antibactérienne, alors que ceux méthanoliques et aqueux, obtenus successivement, ont une activité modérée sur quelques souches bactériennes. Cependant, quelques extraits de l'hexane et du dichlorométhane se sont révélés plus actifs. Tous les extraits sont inactifs contre les souches fongiques. **Conclusion:** Les deux plantes étudiées dans ce travail pourraient fournir des preuves scientifiques pour ceux qui les utilisent dans le traitement des maladies liées à la production d'espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydatif.

Mots-clés : *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*, *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, composés phénoliques, activité antioxydante, polarité, activité antimicrobienne.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les capacités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles de deux plantes appartenant à la famille des Astéracées. Il s'agit d'*Helichrysum. stoechas* subsp. *rupestre* auct. et de *Phagnalon. saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* originaires d'Algérie.

Pour les parties des deux plantes (fleurs et tiges feuillées), dont les extraits hydro-méthanoliques montrent une activité importante, il a été envisagé d'employer un processus d'extractions successives par des solvants de polarité croissante afin d'optimiser l'extraction des composés phénoliques. Ces extraits vont être testés pour leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Sommaire

- I. Introduction
- II. Résultats
 - II.1. Les huiles essentielles
 - II.1.1. Rendements
 - II.2. Les extraits hydro-méthanoliques
 - II.2.1. Rendements en extraits
 - II.2.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins
 - II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante
 - a. Capacité antioxydante totale
 - b. Piégeage du radical DPPH[°]
 - c. Pouvoir réducteur du fer
 - d. Piégeage du radical ABTS^{°+}
 - e. Pouvoir chélateur du Fer
 - f. Inhibition de blanchiment du β -carotène
 - II.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne
 - a. Méthode des disques
 - II.3. Les extraits préparés par des solvants de polarité différente
 - II.3.1. Rendements en extraits
 - II.3.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins
 - II.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante
 - a. Capacité antioxydante totale
 - b. Piégeage du radical DPPH[°]
 - c. Pouvoir réducteur du fer
 - d. Piégeage du radical ABTS^{°+}
 - e. Pouvoir chélateur du Fer
 - f. Inhibition de blanchiment du β -carotène
 - II.3.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne
 - a. Méthode des disques
 - b. Méthode des dilutions
- III. Discussion
- IV. Conclusion

I. Introduction

Le mode d'extraction choisi pour extraire les huiles essentielles est l'entraînement à la vapeur d'eau, après avoir trouvé des difficultés à les isoler par hydrodistillation. Par cette méthode, le matériel végétal à distiller est en contact avec la vapeur seulement, ce qui réduit le phénomène d'hydrolyse (**Burt, 2004**).

La concentration et la nature du solvant d'extraction, le rapport solvant / solide, le temps d'extraction, la température et le nombre d'étapes d'extraction sont des facteurs clés dans le

processus d'extraction, car ils touchent à la fois la cinétique de la libération des composés phénoliques de la plante et à l'activité antioxydante de l'extrait. Plusieurs études ont été consacrées pour évaluer l'effet de ces variables, afin d'optimiser les rendements, les teneurs et l'activité antioxydante des composés phénoliques (**Chirinos et al., 2007 ; Mussatto et al., 2011**).

Le choix du mélange méthanol/eau à 80/20, considéré comme un mélange à polarité élevée, est basé sur les résultats de plusieurs travaux antérieurs qui ont montré que les solvants polaires sont plus efficaces que les solvants de faible polarité (**Akowuah et al., 2005; Turkmen et al., 2006; Trabelsi et al., 2010**) et que le rendement d'extraction augmente de manière significative lors de l'utilisation d'éthanol aqueux et du méthanol aqueux par rapport à des extractions aux solvants organiques seuls (**Vazquez et al., 2008 ; Mussatto et al., 2011**). Plus précisément, l'addition d'eau à 20% aux solvants polaires améliore l'extraction des composés phénoliques en particulier à l'éthanol, le méthanol ou l'acétone (**Trabelsi et al., 2010**). Ce comportement peut être expliqué par le fait que la présence de l'eau (ayant un moment dipolaire plus fort que celui des alcools) déstabilise les parois cellulaires. Par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer en contact avec une quantité plus grande du soluté, favorisant ainsi l'extraction. D'autre part, la diminution du taux d'extraction à des concentrations plus faibles de 50% peut être attribuée à la diminution de la capacité du solvant, devenant de plus en plus pauvre en alcool (**Penchev et al., 2010 ; Mussatto et al., 2011**).

L'extraction par des solvants organiques, réalisée successivement dans un appareil de Soxhlet, est choisie dans le but d'augmenter les rendements et d'obtenir une meilleure sélectivité dans l'extraction. Ce type d'extraction a déjà été utilisé sur des problématiques similaires pour extraire les polyphénols et pour sélectionner le solvant qui a conduit à des extraits ayant la capacité antioxydante la plus élevée (**Vazquez et al., 2008**). Nous avons choisi l'hexane, le dichlorométhane, le méthanol et l'eau en regard des classes de substances potentiellement extractibles par ces solvants (**Wichtl et Anton, 2003**) :

- Carbures, lipides, stérols, essences, cires, lécithines, caroténoïdes, lactones les moins polaires par l'hexane.
- Chlorophylles, caroténoïdes, pigments divers, résines et oléorésines, aglycones (flavonoïdes, anthraquinones, coumarines...), alcaloïdes bases, lactones, terpènes peu oxygénés...par le dichlorométhane.
- Terpénoïdes, stéroïdes, phénols, lactones, hétérosides (flavonoïdes, anthraquinones, quinones, coumarines...), alcaloïdes, polyols, tanins, saponosides, acides organiques, sels minéraux, acides aminés par le méthanol et l'eau.

II. Résultats

II.1. Les huiles essentielles

II.1.1. Rendements

Les rendements en huiles essentielles sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 3: Les rendements en huiles essentielles (moyenne \pm écart type) d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

Espèces	HS	PS
Rendement en % (p/p)	0.011 \pm 0.003	0.007 \pm 0.001

HS : *H. stoechas* subsp. *rupestre*, PS : *P. saxatile* subsp. *saxatile*

A cause de leurs rendements très faibles, les huiles essentielles d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* ne peuvent pas être testées, dans ce travail, pour leurs activités biologiques.

II.2. Les extraits hydro-méthanoliques

II.2.1. Rendements en extraits

Les antioxydants naturels, à savoir les composés phénoliques, sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Les espèces d'*Helichrysum* ont des fleurs groupées, attrayantes, de couleur jaune et persistantes toute l'année, d'où vient le nom de l'immortelle. A cet effet, les fleurs et les tiges feuillées des deux plantes ont été séparées dans ce type de préparation.

Le procédé d'extraction, basé sur une extraction liquide-solide, a été utilisé pour obtenir des extraits hydro-méthanoliques pour la réalisation des dosages des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et pour l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes. Les résultats de ces dosages et de l'évaluation de l'activité antioxydante ont fait l'objet d'une publication internationale, représentée dans la partie «Valorisation des travaux de recherche». Les rendements obtenus sont présentés dans le **tableau 4**.

Tableau 4: Les rendements et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne \pm écart type) dans les extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

	Rendements (%)	Teneur en Polyphénols (mg EAG /g MS)	Teneur en Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Teneur en Tanins (mg EC/g MS)
HSF	18.7 \pm 0.3	31.34 \pm 1.92	10.48 \pm 0.28	3.47 \pm 0.21
HSTF	13.5 \pm 0.4	18.62 \pm 0.41	9.1 \pm 0.87	3.21 \pm 0.19
PSF	10 \pm 0.13	4.8 \pm 0.2	0	0.9 \pm 0.2
PSTF	9 \pm 0.33	18.82 \pm 0.21	13.08 \pm 0.28	2.08 \pm 0.28

HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSF : Fleur de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

II.2.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins

Afin d'établir une relation entre le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante, les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins dans les extraits hydro-méthanoliques ont été déterminées. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques leur sont attribués (Psotová et al., 2003).

Les courbes d'étalonnage tracées de l'acide gallique et de la catéchine sont représentées dans l'Annexe 1 (fig. 71 - 73).

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits, estimées par la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu en référence à la courbe d'étalonnage d'acide gallique ($Y = 0.00253 \times 0.01344$), ont varié de 04.80 ± 0.20 à 31.34 ± 1.92 mg EAG/g MS (tab. 4). La teneur la plus élevée en ces composés a été trouvée dans l'extrait des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, tandis que la plus faible est celle de l'extrait des fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.

Les flavonoïdes sont l'un des groupes les plus nombreux et répandus de composés phénoliques dans les plantes (Tepe et al., 2005). Les teneurs en flavonoïdes dans les extraits (tab. 4) ont été exprimées par référence à la courbe d'étalonnage de la catéchine ($Y = 0.00355 \times 0.09903$). Le taux le plus élevé en flavonoïdes a été trouvé dans l'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* (13.08 ± 0.28 mg EC/g MS) tandis que pour les fleurs, le dosage n'a pas révélé la présence de ces composés. Les contenus en flavonoïdes dans les extraits des tiges feuillées et des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* sont proches et correspondent à des valeurs respectives de 09.10 ± 0.87 et 10.48 ± 0.28 mg EC/g MS.

Il a été rapporté que les tanins condensés possèdent diverses activités biologiques, dont l'activité antioxydante. Les teneurs en tanins condensés (tab. 4) ont été exprimées par référence à la courbe d'étalonnage de la catéchine ($Y = 0.00076 \times - 0.0076$). Elles sont moins importantes que celles en flavonoïdes et sont proches dans les extraits des tiges feuillées et des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* (3.21 ± 0.19 et 3.47 ± 0.21 mg EC/g MS, respectivement). L'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* contient plus de tanins par rapport aux fleurs (2.08 ± 0.28 et 0.9 ± 0.20 mg EC/g MS, respectivement).

II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Les extraits les plus actifs vont être sélectionnés sur la base des résultats des trois premières méthodes ^(a, b, c). L'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits se fait ensuite par trois autres méthodes ^(d, e, f). Les courbes des D.O en fonction des concentrations pour la réduction du

fer et des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations pour les autres méthodes, sont figurées dans l'Annexe 2 (fig. 75-81).

Les résultats de toutes ces activités sont rassemblés dans le tableau suivant. Pour chaque activité, les données chiffrées sont par la suite représentées graphiquement sous forme d'histogramme, sur lequel on repère facilement les extraits les plus actifs.

Tableau 5: Les activités antioxydantes des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et des standards par les différentes méthodes

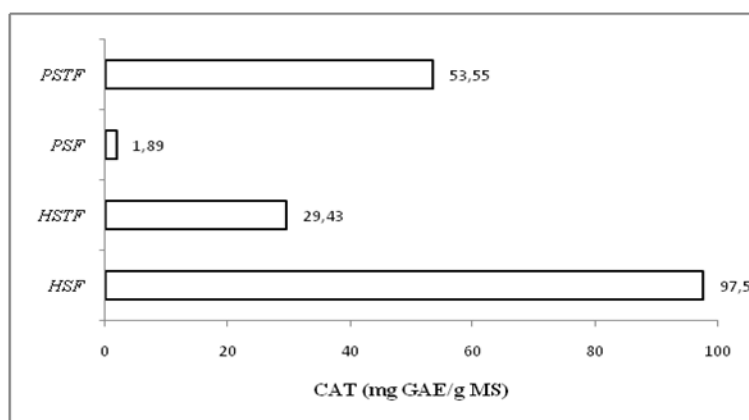
Extraits	Capacité antioxydante totale (mg EAG/g MS)	CI ₅₀ /DPPH (µg/mL)	CE ₅₀ /réduction du Fer (µg/mL)	CI ₅₀ /ABTS (µg/mL)	CI ₅₀ /chélation du Fer (mg/mL)	CI ₅₀ /β-carotène (µg/mL)
<i>HSF</i>	97.50 ± 0.33	6.57 ± 0.25	466.52 ± 10.50	94.54 ± 1.30	10.48 ± 0.10	121.81 ± 0.55
<i>HSTF</i>	29.43 ± 0.38	8.72 ± 0.20	697.14 ± 5.50	337.71 ± 2.50	10.26 ± 0.15	191.46 ± 1.05
<i>PSF</i>	1.89 ± 0.12	129.77 ± 0.55	3335.4 ± 16.95	/	/	/
<i>PSTF</i>	53.55 ± 0.36	5.65 ± 0.10	355.24 ± 15.00	74.84 ± 1.05	4.62 ± 0.10	51.53 ± 0.40
<i>Standards</i>		10.50 ± 0.40 ^a	99.64 ± 1.80 ^a 53.67 ± 2.40 ^b	73.1 ± 1.70 ^a 58.14 ± 2.50 ^c	0.0465 ± 0.0003 ^d	48 ± 0.90 ^e

HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, *HSTF* : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, *PSTF* : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, /: not testé, ^aBHT, ^bacide ascorbique, ^cTrolox, ^dEDTA, ^eBHA

a. Capacité antioxydante totale

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique, réalisée pour la détermination de la capacité antioxydante totale est figurée dans l'Annexe 1 (fig. 74). Les résultats de cette activité indiquent que l'extrait hydro-méthanolique des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* présente une forte capacité antioxydante (97.5 ± 0.33mg EAG/g MS) par rapport aux autres extraits. L'extrait des fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile* a une très faible activité (fig. 20).

Le tableau 6 montre une corrélation entre la capacité antioxydante totale des extraits et les teneurs en flavonoïdes (r = 0.64) et en tanins (r = 0.72), et une relation significative entre cette capacité et les teneurs en polyphénols totaux (r = 0.95).



HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*,
 PSF : Fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

Figure 20: Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits testés

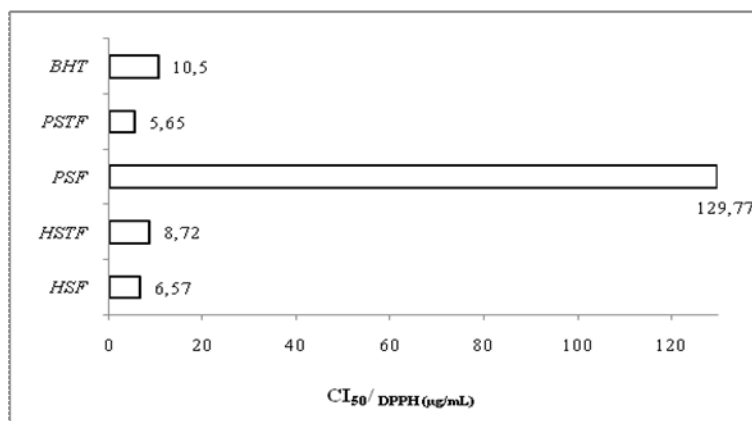
Tableau 6: Les coefficients de corrélation (r) de la relation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

	CAT	CI ₅₀ /DPPH°	CE ₅₀ /pouvoir réducteur	CI ₅₀ /ABTS°+	CI ₅₀ /β-carotène	CI ₅₀ /pouvoir chélateur
Polyphénols	0.95	-0.83	-0.84	-0.45	-0.01	0.51
Flavonoïdes	0.64	-0.96	-0.98	-0.8	-0.98	-0.93
Tanins	0.72	-0.85	-0.82	0.4	0.76	0.99

b. Capacité de piégeage du radical DPPH°

Dans ce travail, nous avons opté pour tester les extraits hydro-méthanoliques par la méthode de piégeage du radical libre DPPH° afin de localiser les extraits les plus actifs. Ce test a été largement utilisé pour fournir des informations de base sur la capacité antioxydante des extraits de plantes. Il a l'avantage d'être simple, rapide et disponible. De même, l'avantage d'employer ce test est dû à la grande stabilité du radical DPPH° et sa forme commerciale est prête à l'emploi (Gouveia et Castilho, 2012).

Les valeurs des CI₅₀, exprimées en µg/mL, sont représentées dans la **figure 21**. L'activité des extraits hydro-méthanoliques et du BHT, exprimée en ces valeurs, est dans l'ordre suivant: tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, BHT, fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.



BHT : antioxydant de synthèse, HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*,
PSF : Fleur de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

Figure 21: Valeurs de CI₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et du standard par la méthode du piégeage du radical libre DPPH°

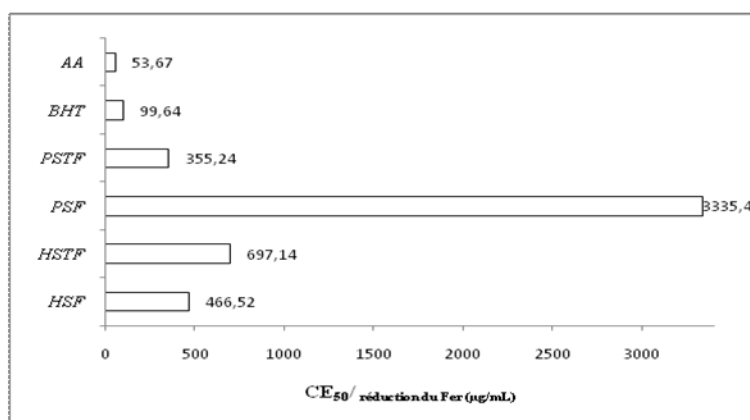
Les résultats révèlent que les extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* (tiges feuillées et fleurs) et des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* ont une capacité à piéger le radical DPPH° importante comparée à celle du contrôle positif (BHT). Le **tableau 6** montre de bonnes corrélations entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en tanins condensés et les valeurs de CI₅₀ des extraits, avec des coefficients de corrélation significatives (r) et qui sont respectivement -0.83, -0.96 et -0.85.

c. Capacité de réduction du fer

La capacité réductrice d'un extrait, un autre indicateur important de l'activité antioxydante, a également été jugée appréciable. C'est une méthode simple, rapide et reproductible. Dans cet essai, la couleur jaune de la solution de test change aux diverses nuances de vert et de bleu selon le pouvoir réducteur de chaque composé. Les résultats obtenus nous ont permis de déduire que, pour tous les extraits hydro-méthanoliques, la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées (**fig. 76 (Annexe 2)**). La **figure 22** représente les potentiels de réduction des extraits testés, exprimés en CE₅₀, en comparaison avec les standards (BHT, Acide ascorbique).

L'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* a montré un pouvoir réducteur plus important (CE₅₀ = 355.24 ± 15.00 µg/mL) que les autres extraits, mais pas aussi important que les standards. L'activité de l'extrait des fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile* est nettement moins importante, ce qui vient confirmer le résultat de la capacité antioxydante totale et de l'activité antiradicalaire par piégeage du radical DPPH°. Donc, il est inutile de déterminer l'activité antioxydante de cet extrait par d'autres méthodes.

Les résultats ont montré une corrélation entre les teneurs en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés et le pouvoir réducteur des extraits avec des valeurs de r égales, respectivement, à -0.84, -0.98 et -0.82 (**tab. 6**).



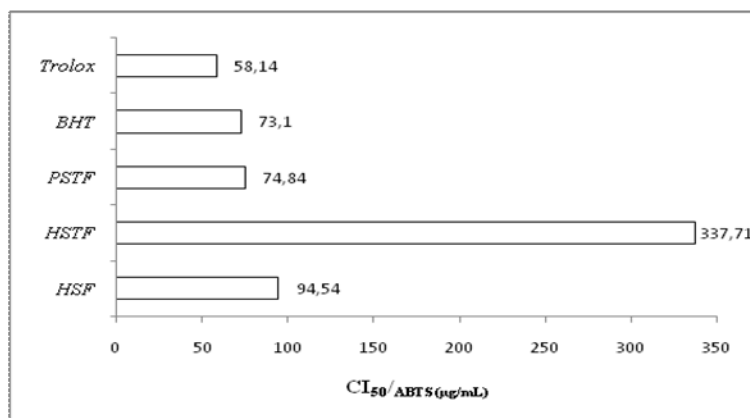
AA : acide ascorbique, BHT : antioxydant de synthèse, HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSF : Fleur de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.

Figure 22: Valeurs de CE₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et des standards par la méthode de la réduction du fer

d. Capacité de piégeage du radical ABTS^{•+}

L'ABTS^{•+} est un autre radical synthétique qui a l'avantage d'être plus polyvalent que le DPPH[•], parce qu'il peut évaluer l'activité de piégeage pour les échantillons polaires et non polaires (Re et al., 1999), d'être soluble dans les solvants aqueux et organiques, à une large gamme de valeurs de pH et son temps de réaction est inférieur à celui du DPPH[•] (Gouveia et Castillo, 2012). Par conséquent, il a été jugé nécessaire de poursuivre l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical ABTS^{•+}. Le Trolox et le BHT sont utilisés comme standards. Les résultats montrent que le potentiel à piéger ce radical, exprimé en CI₅₀ (**fig. 23**), est dans l'ordre suivant: Trolox > BHT et tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* > fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* > tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. L'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* présente un pouvoir antioxydant intéressant (CI₅₀ = 74.84 ± 1.05 µg/mL) par rapport au BHT (CI₅₀ = 73.1 ± 1.70 µg/mL). L'établissement d'une corrélation montre une relation entre cette activité et la teneur en flavonoïdes ($r = -0.8$) et une faible corrélation avec les polyphénols totaux ($r = -0.45$) (**tab. 6**).

Les valeurs de test au DPPH[•] sont inférieures à celles obtenues à partir de l'analyse à l'ABTS^{•+}. Mais, dans les deux méthodes, le même ordre d'activité est observé.

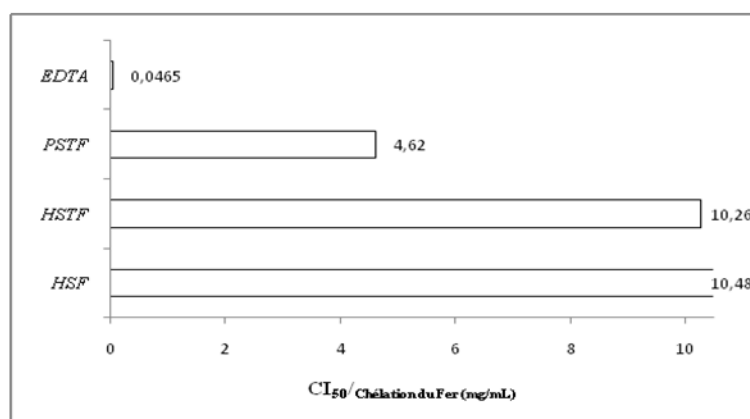


Trolox et BHT : Antioxydants de synthèse, HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : Fleur de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.

Figure 23: Valeurs de CI₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et des standards par la méthode de piégeage du radical ABTS^{•+}

e. Pouvoir chélateur du Fer

La capacité de chélation des métaux de transition peut être considérée comme un important mode d'action antioxydante. Les valeurs de CI₅₀ montrent que l'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* a une capacité à chélater les ions ferriques élevée (CI₅₀ = 4.62 ± 0.10 mg/mL) par rapport aux extraits des tiges feuillées et des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* (CI₅₀ de 10.26 ± 0.15 et 10.48 ± 0.10 mg/mL, respectivement) (**fig. 24**). Aucun des extraits hydro-méthanoliques n'est aussi efficace que le contrôle positif, l'EDTA (CI₅₀ = 0.046 ± 0.0003 mg/mL). La capacité de chélation d'ions ferreux est fortement corrélée avec les teneurs en flavonoïdes avec une valeur de r égale à -0.93 (**tab. 6**).



EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*.

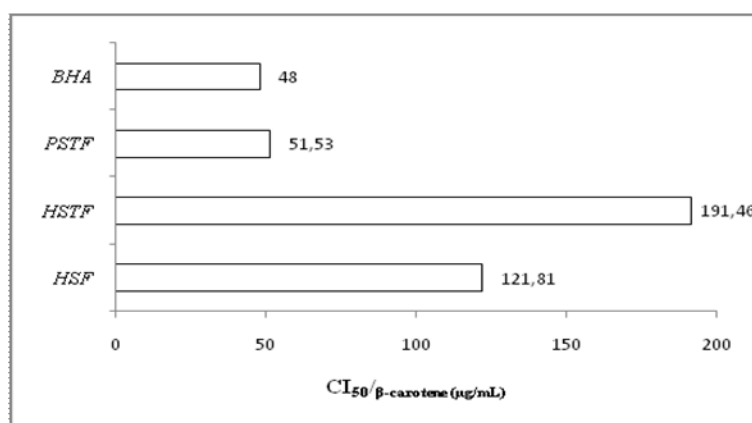
Figure 24: Valeurs de CI₅₀ des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et de l'EDTA par la méthode du pouvoir chélateur du Fer

f. Inhibition de blanchiment du β-carotène

Le pouvoir chélateur et celui du piégeage des radicaux libres sont des outils précieux pour évaluer l'activité antioxydante potentielle d'extraits de plantes. Toutefois, ces systèmes

n'utilisent pas des substrats oxydables d'une pertinence biologiques ou alimentaire et donc ne fournissent pas d'informations directes sur les effets protecteurs des extraits de plantes (**Dorman et al., 2003**).

La capacité des échantillons et du BHA à inhiber la décoloration du β -carotène, est représentée dans la **figure 25**. Ils ont une activité antioxydante, exprimées en CI_{50} , dans l'ordre suivant: BHA et tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* > fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* > tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. La capacité de l'extrait hydro-méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* à inhiber l'oxydation de l'acide linoléique ($CI_{50} = 51.53 \pm 0.40 \mu\text{g/mL}$) est comparable à celle du BHA ($CI_{50} = 48 \pm 0.90 \mu\text{g/mL}$). Les résultats de la relation entre l'inhibition de blanchiment du β -carotène et les teneurs en composés phénoliques dans les différents extraits montrent une bonne corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et cette activité, avec une valeur de r égale à -0.98. Il n'existe aucune corrélation entre cette méthode et les teneurs en polyphénols totaux ($r = -0.01$) (**tab. 6**).



BHA : Antioxydant de synthèse, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*.

Figure 25: Valeurs de CI_{50} des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et du standard par la méthode d'inhibition de blanchiment du β -carotène

II.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* contre des micro-organismes de référence, a été évaluée. La Gentamicine est utilisée pour tester la sensibilité des souches bactériennes. Le DMSO est utilisé comme un contrôle négatif.

a. La méthode des disques

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique montrent que les extraits hydro-méthanoliques n'exercent aucune activité sur les souches bactériennes et fongiques testées (6mm

de diamètre, diamètre du disque inclus), et ce à une quantité de 500 µg/disque. Donc, ces extraits ne peuvent pas faire l'objet d'une étude de la concentration minimale inhibitrice.

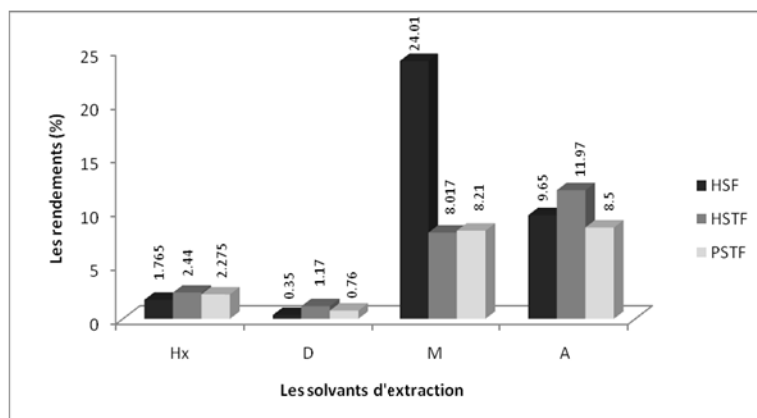
II.3. Les extraits préparés par des solvants à polarité différente

II.3.1. Rendements en extraits

La nécessité de cerner les molécules actives responsables de l'activité antioxydante de ces espèces, nous mène à faire des extractions par quatre solvants de polarité différente et de tester chaque extrait par les mêmes méthodes utilisées. Les fleurs de *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile* n'ont pas été sélectionnées pour ce type d'extraction à cause de la faible activité antioxydante de leur extrait hydro-méthanolique.

La **figure 26** représente les résultats des rendements d'extraction. Pour les deux plantes, les rendements en extraits, obtenus avec de l'hexane, sont faibles et ceux des extraits de dichlorométhane sont très faibles. Pour les fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, le rendement le plus élevé correspond au méthanol, suivi par celui de l'eau. Le cas contraire est observé pour les tiges feuillées de cette même plante. Concernant les tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, les rendements en extraits extractibles par ces deux solvants sont très proches.

Ces extraits servent par la suite à faire des dosages de polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins et à évaluer les activités antioxydante et antimicrobienne.



HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, Hx : Hexane, D : Dichlorométhane, M : Méthanol, A : Aqueux.

Figure 26: Histogramme des rendements en extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante

II.3.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins

Afin de sélectionner les extraits les plus riches en composés phénoliques et d'établir une relation entre le contenu en ces composés chimiques et l'activité antioxydante, les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins dans les extraits d'hexane, de dichlorométhane, du méthanol et de l'eau, ont été déterminées (**tab. 7**).

Les extraits méthanoliques et aqueux ont les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes, à l'exception de l'extrait méthanoliques des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. Cependant, les teneurs en ces composés dans les extraits de l'hexane et du dichlorométhane sont négligeables. Les flavonoïdes n'ont pas été détectés dans l'extrait du dichlorométhane des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et celui de l'hexane de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.

De faibles teneurs en tanins ont été détectés dans tous les extraits d'hexane et de dichlorométhane et dans les extraits aqueux des fleurs et des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*.

Tableau 7: Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne \pm écart type) dans les extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, préparés pas des solvants de polarité croissante

		Teneur en Polyphénols (mg EAG/g MS)	Teneur en Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Teneur en Tanins (mg EC/g MS)
HSF	Hx	1.03 \pm 0.03	0.28 \pm 0.05	0.47 \pm 0.03
	D	0.44 \pm 0.02	0.093 \pm 0.005	0.1 \pm 0.007
	M	56.71 \pm 0.81	18.4 \pm 0.60	0
	A	17.56 \pm 0.60	5.89 \pm 0.20	01.41 \pm 0.07
HSTF	Hx	0.61 \pm 0.03	0.64 \pm 0.04	0.77 \pm 0.02
	D	0.96 \pm 0.032	0	0.78 \pm 0.02
	M	3.37 \pm 0.03	0.067 \pm 0.003	0
	A	21.67 \pm 0.21	8.16 \pm 0.03	2.38 \pm 0.02
PSTF	Hx	0.5 \pm 0.03	0	0.57 \pm 0.02
	D	0.4 \pm 0.01	0.317 \pm 0.01	0.38 \pm 0.02
	M	23.1 \pm 0.10	15.91 \pm 0.10	0
	A	15.15 \pm 0.28	8.23 \pm 0.11	0

HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*. Hx : Hexane, D : Dichloromethane, M : Méthanol, A : Aqueux.

II.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Les extraits les plus actifs vont être sélectionnés sur la base des résultats des trois premières méthodes ^(a, b, c). L'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits se fait ensuite par trois autres méthodes ^(d, e, f). Les courbes des D.O en fonction des concentrations pour la réduction du fer et des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations pour les autres méthodes, sont figurées dans l'**Annexe 3 (fig. 82- 91)**.

Les résultats de toutes ces activités sont rassemblés dans le tableau suivant. Pour chaque activité, les données chiffrées sont par la suite représentées graphiquement sous forme d'histogramme, sur lequel on repère facilement les extraits les plus actifs.

Tableau 8: Les activités antioxydantes des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, préparés par différents solvants, et des standards par les différentes méthodes

Extraits		Capacité antioxydante totale (mg EAG/g MS)	CI ₅₀ /DPPH(µg/mL)	CE ₅₀ /réduction du Fer (µg/mL)	CI ₅₀ /ABTS (µg/mL)	CI ₅₀ /chélation du Fer (mg/mL)	CI ₅₀ /β-carotène (µg/mL)
HSF	Hx	1.24 ± 0.19	-	416.78 ± 3.57	/	/	/
	D	0.26 ± 0.04	-	302.76 ± 2.84	/	/	/
	M	55.13 ± 2.38	6.58 ± 0.4	291.7 ± 4.16	105.53 ± 1.09	-	29.01 ± 0.55
	A	13.18 ± 0.82	10.75 ± 0.65	467.5 ± 8.08	244.91 ± 2.9	4.04 ± 0.002	160.52 ± 1.95
HSTF	Hx	4.90 ± 0.26	-	-	/	/	/
	D	0.39 ± 0.036	-	-	/	/	/
	M	4.48 ± 0.43	-	-	577.18 ± 7.1	-	524.97 ± 4.63
	A	18.14 ± 0.15	10.29 ± 0.2	409.06 ± 4.01	177.68 ± 1.02	4.11 ± 0.004	20.63 ± 0.36
PSTF	Hx	1.71 ± 0.03	-	-	/	/	/
	D	9.42 ± 0.03	-	-	/	/	/
	M	18.19 ± 0.26	5.47 ± 0.15	343.4 ± 5.52	63.77 ± 0.9	-	22.71 ± 0.41
	A	11.78 ± 0.09	7.03 ± 0.11	332 ± 2.53	122.92 ± 1.8	4.45 ± 0.003	125.92 ± 1.54
<i>Standards</i>			10.50 ± 0.40 ^a	99.64 ± 1.80 ^a 53.67 ± 2.40 ^b	73.1 ± 1.70 ^a 58.14 ± 2.50 ^c	0.0465 ± 0.0003 ^d	48 ± 0.90 ^e

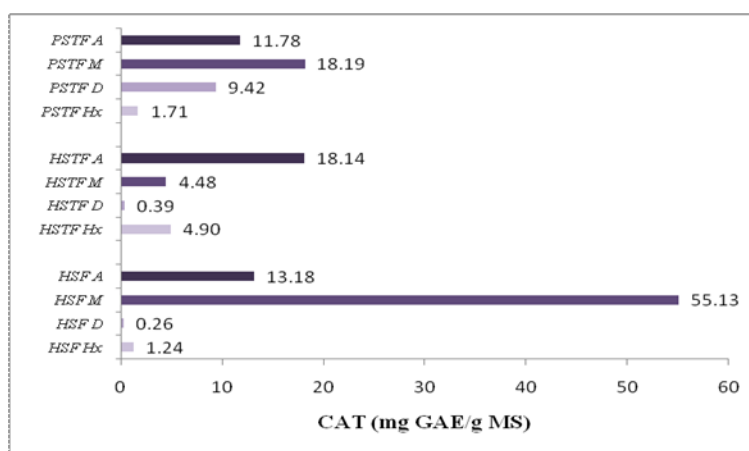
HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, / : not testé, - : valeur de CI₅₀ non atteinte, Hx : Hexane,

D : Dichloromethane, M : Méthanol, A : Aqueux, ^aBHT, ^bacide ascorbique, ^cTrolox, ^dEDTA, ^eBHA

a. Capacité antioxydante totale

Les résultats de ce test montrent que les extraits de l'hexane et du dichlorométhane ont une faible capacité antioxydante. Les extraits méthanoliques et aqueux ont une activité importante par rapport aux autres extraits à l'exception de l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* qui s'est montré moins actif que celui du dichlorométhane (**fig. 27**).

Le **tableau 9** montre une corrélation significative entre la capacité antioxydante totale des extraits et les teneurs en polyphénols totaux ($r = 0.99$) et en flavonoïdes ($r = 0.8$).



HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, Hx : Hexane, D : Dichloromethane, M : Méthanol, A : Aqueux.

Figure 27 : Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante

Tableau 9: Les coefficients de corrélation (r) de la relation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits méthanoliques et aqueux d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante

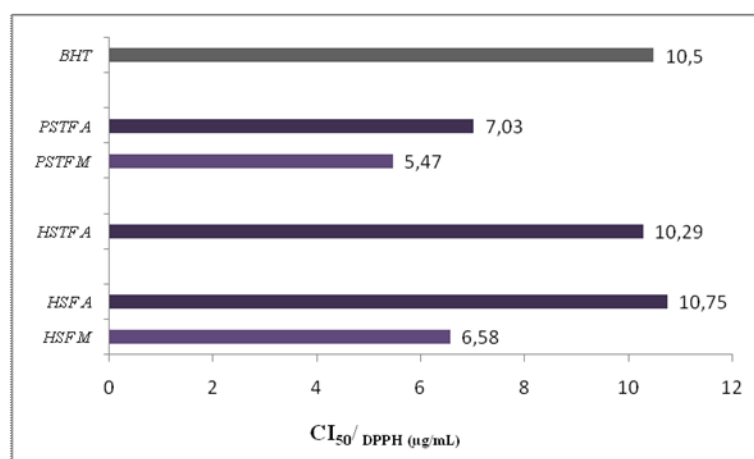
	CAT	CI ₅₀ /DPPH°	CE ₅₀ /pouvoir réducteur	CI ₅₀ /ABTS°+	CI ₅₀ /β-carotène	CE ₅₀ /pouvoir chelateur
Polyphénols	0.99	-0.37	-0.61	-0.60	-0.64	-0.68
Flavonoïdes	0.80	-0.79	-0.79	-0.84	-0.80	0.64
Tanins	-0.16	0.89	0.77	-0.05	-0.28	-0.84

b. Capacité de piégeage du radical DPPH°

Les résultats de cette activité montrent que les extraits de l'hexane et du dichlorométhane ont une faible activité, comparés à ceux méthanoliques et aqueux, avec des pourcentages d'inhibition du DPPH° de 8.27 à 31.12%, à une concentration de 25 µg/mL (**fig. 82 (Annexe 3)**).

Les valeurs de CI₅₀ des extraits méthanoliques et aqueux sont représentées dans la **figure 28**, sauf pour l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* dont la valeur n'a pas été atteinte même à 25 µg/mL (% d'inhibition = 26.84%) (**fig. 83 (Annexe 3)**). Sur la base de ces valeurs, l'activité de ces extraits est meilleure ou équivalente à celle du BHT. Ils suivent l'ordre suivant: tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* M > fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* M > tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* A > tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* A, BHT et fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* A.

Le **tableau 9** montre une faible corrélation entre la méthode de DPPH° et les teneurs en polyphénols totaux (-0.37) et une bonne corrélation avec les teneurs en flavonoïdes (-0.79).



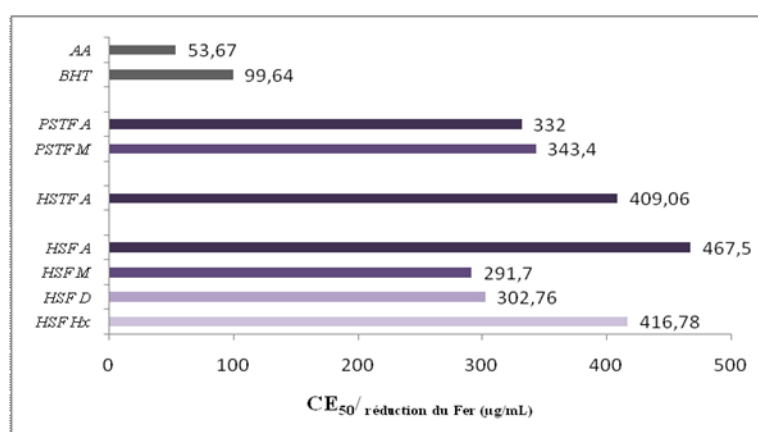
BHT : Antioxydant de synthèse, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. M : Méthanol, A : Aqueux.

Figure 28: Valeurs de CI₅₀ des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante, et du standard par la méthode du piégeage du radical libre DPPH°

c. Capacité de réduction du fer

La **figure 29** représente les résultats du pouvoir réducteur des extraits testés en comparaison avec les standards (Acide ascorbique, BHT), à travers les valeurs de CE_{50} . Cette activité a révélé un pouvoir réducteur indépendant de la nature du solvant d'extraction et ce à la différence de la méthode précédente car les valeurs de CE_{50} sont atteintes même pour les extraits d'hexane et du dichlorométhane des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. L'extrait du méthanol des fleurs de cette plante est le plus actif ($CE_{50} = 291.7 \pm 4.16 \mu\text{g/mL}$). Cependant, cette activité reste faible comparée à celles du BHT ($CE_{50} = 99.64 \pm 1.80 \mu\text{g/mL}$) et de l'acide ascorbique ($CE_{50} = 53.67 \pm 2.40 \mu\text{g/mL}$).

Les résultats montrent une corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et le pouvoir réducteur des extraits avec des valeurs de r égales -0.61 à -0.79 (**tab. 9**).



AA : acide ascorbique, BHA : Antioxydant de synthèse, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, Hx : Hexane, D : Dichloromethane, M : Méthanol, A : Aqueux

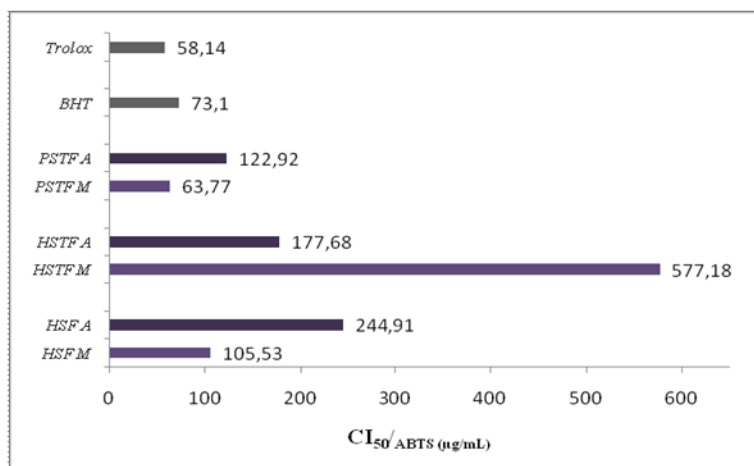
Figure 29: Valeurs de CE_{50} des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante, et des standards par la méthode de la réduction du fer

d. Capacité de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante par les méthodes qui suivent, les extraits de l'hexane et du dichlorométhane ont été rejetés en raison des rendements d'extraction obtenus, de leurs faibles teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins et de leur faible activité antioxydante par les trois méthodes précédentes. Cependant, l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, qui a révélé des teneurs en composés phénoliques et une activité antioxydante faibles, n'a pas été exclu et ce pour confirmer ce résultat non envisagé. Les extraits méthanoliques et aqueux sont également capables de piéger le radical $ABTS^{\bullet+}$ d'une manière concentration- dépendante (**fig. 87 et 88 (Annexe 3)**). Tous les extraits atteignent 50% d'inhibition du radical $ABTS^{\bullet+}$ (**fig. 30**). L'activité de l'extrait au méthanol des tiges feuillées de

P. saxatile subsp. *saxatile*, est comparable à celles du BHT et du Trolox. L'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* a l'activité la plus faible (CI₅₀ 577.18 µg/mL).

Sur la base des valeurs de CI₅₀, le classement des extraits capables de piéger ce radical est en accord avec celui de la capacité à piéger le radical DPPH°.



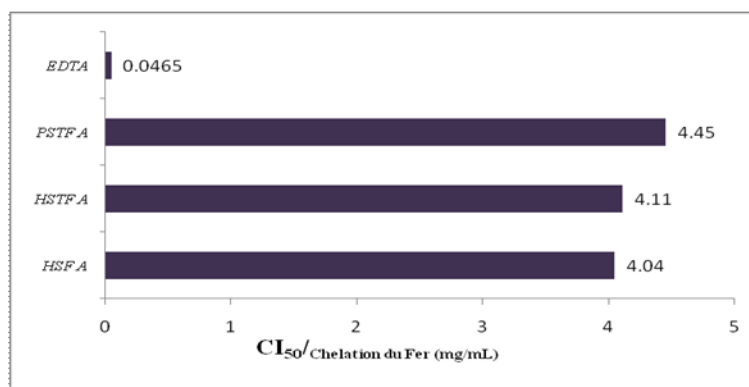
BHT et Trolox : Antioxydants de synthèse, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, M : Méthanol, A : Aqueux

Figure 30: Valeurs de CI₅₀ des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante, et des standards par la méthode de piégeage du radical ABTS^{o+}

L'établissement d'une corrélation montre une relation entre cette activité et les teneurs en flavonoïdes ($r = -0.84$) et en polyphénols ($r = -0.6$) et une corrélation négligeable avec les tanins condensés ($r = -0.05$) (tab. 9).

e. Pouvoir chélateur du Fer

La figure 31 représente le pouvoir chélateur des extraits et de l'agent chélateur des ions métalliques (EDTA). Ce sont les extraits aqueux qui ont montré une activité importante par rapport à ceux du méthanol. Sur la base des valeurs de CI₅₀ (mg/mL), cette activité reste largement inférieure à celle de l'EDTA.



EDTA : Antioxydant de synthèse, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, A : Aqueux.

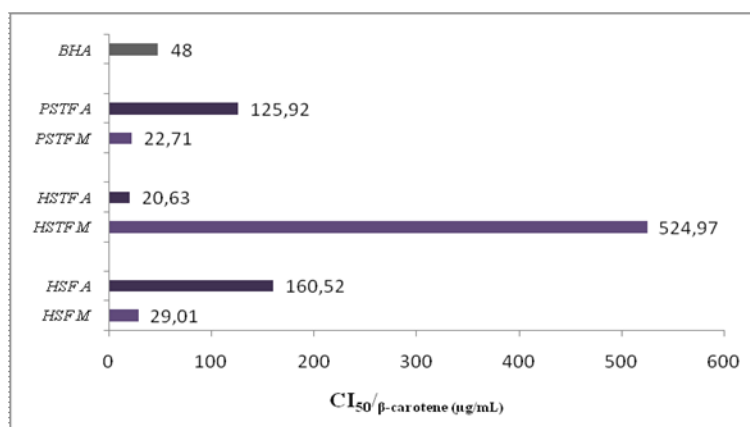
Figure 31: Valeurs de CI₅₀ des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante, et du standard par la méthode du pouvoir chélateur du Fer

La capacité de chélation d'ions ferreux est bien corrélée avec les teneurs en tanins et en polyphénols totaux avec des valeurs respectives de r égales à -0.84 et -0.68 (**tab. 9**).

f. Inhibition de blanchiment du β -carotène

L'effet des extraits sur l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés a été évalué en utilisant le test d'inhibition de blanchiment du β -carotène. Comme le montre la **figure 32**, trois extraits ont le plus haut taux d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par rapport aux autres extraits, même par rapport au BHA. Il s'agit des extraits méthanoliques des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et de l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. L'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* est le plus faible.

Les résultats de la relation entre l'inhibition de blanchiment du β -carotène et les teneurs en composés phénoliques dans les différents extraits montrent une corrélation entre les flavonoïdes et les polyphénols totaux avec des valeurs respectives de r égales à -0.8 et -0.64 (**tab. 9**). Il existe une faible corrélation entre cette méthode et les teneurs en tanins condensés ($r = -0.28$).



HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, M : Méthanol, A : Aqueux

Figure 32 : Valeurs de CI₅₀ des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante, et du standard par la méthode de blanchiment du β -carotène

II.3.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante, a été évaluée contre des micro-organismes de référence. Les extraits qui semblent être actifs, résultat révélé par l'apparition de zones d'inhibitions importantes, doivent faire l'objet d'une étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La Gentamicine est utilisée pour tester la sensibilité des souches bactériennes. Le DMSO est utilisé comme un contrôle négatif.

a. Méthode des disques

Les résultats de l'activité antibactérienne, révélés par l'apparition ou non des zones d'inhibitions autour des disques imprégnés de l'extrait testé, sont regroupés dans le **tableau 10**.

Les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis de tous les extraits testés à 500µg/disque. Les souches de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacea*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, se sont montrées résistantes à tous les extraits. Les diamètres pour les autres souches varient entre 6 et 13 mm, les plus sensibles sont :

**Bacillus cereus* et *Acinetobacter baumannii* vis-à-vis des extraits de l'hexane des fleurs et des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et *Proteus mirabilis* vis-à-vis de l'extrait de l'hexane des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, avec des diamètres de 13mm.

* *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* vis-à-vis de l'extrait du dichlorométhane des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* et *Enterococcus faecalis* vis-à-vis de l'extrait du méthanol des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, avec des diamètres de 12 mm.

* *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* vis-à-vis de l'extrait de l'hexane des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, avec des diamètres de 11 mm.

Les résultats de l'activité antifongique, par cette méthode, montrent qu'aucun des extraits testés à 500 µg/disque n'a montré une activité antifongique sur les cinq champignons filamenteux et sur la souche de *Candida albicans*, testés.

Tableau 10: Les diamètres des zones d'inhibition obtenus, pour les extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, obtenus par des solvants de polarité croissante

	Fleurs d' <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i>				Tiges feuillées d' <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i>				Tiges feuillées de <i>Phagnalon saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i>				Gentamicine 15µg/disque	DMSO
	Hx	D	M	A	Hx	D	M	A	Hx	D	M	A		
	500µg/disque													
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 15313)	10 +	10 +	10 +	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	12 +	6 -
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876)	13 +	10 +	10 +	6 -	13 +	8 -	8 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	16 ++	6 -
<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	27 +++	6 -
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	13 +	10 +	8 -	6 -	13 +	8 -	8 -	6 -	10 +	10 +	9 +	6 -	12 +	6 -
<i>Enterobacter cloacea</i> (ATCC 13047)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	26 +++	6 -
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	17 ++	6 -
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 35659)	13 +	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	14 +	6 -
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	6 -	6 -	6 -	6 -	11 +	6 -	8 -	6 -	8 -	12 +	10 +	6 -	20 +++	6 -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	19 ++	6 -
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	8 -	10 +	6 -	6 -	11 +	6 -	9 +	6 -	9 +	12 +	10 +	10 +	17 ++	6 -
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 49452)	6 -	8 -	9 +	6 -	11 +	8 -	12 +	6 -	6 -	8 -	8 -	6 -	9 +	6 -
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311)	6 -	6 -	6 -	6 -	10 +	8 -	8 -	6 -	6 -	9 +	10 +	8 -	16 ++	6 -
													Amphotéricine B 20µg/disque	
<i>Aspergillus fumigatus</i> (MNHN 566)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	28 +++	6 -
<i>Aspergillus flavus</i> (MNHN 994294)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	17 ++	6 -
<i>Cladosporium herbarum</i> (MNHN 3369)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	37 +++	6 -
<i>Fusarium oxysporum</i> (MNHN 963917)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	08 -	6 -
<i>Alternaria alternaria</i> (MNHN 843390)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	27 +++	6 -
<i>Candida albicans</i> (ATCC 26790)	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	6 -	22 +++	6 -

Hx : Hexane, D : Dichlorométhane, M : Méthanol, A : Aqueux, + : Sensible, ++ : Assez sensible, +++ : Très sensible, - : Résistante

b. Méthode des dilutions

Pour les souches bactérienne qui ont montré une certaines sensibilité (11-13 mm), nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les résultats sont représentés dans le **tableau 11**, pour les extraits et l'antibiotique (Gentamicine).

Tableau 11: Les concentrations minimales inhibitrices de quelques extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, testées contre les bactéries les plus sensibles

	HSF Hx	HSTF Hx	HSTF M	PSTF D	Gentamicine
	mg/mL				µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	6.25	/	6.25	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	1.56	6.25	/	10
<i>Proteus mirabilis</i>	3.12	/	/	/	2
<i>Escherichia coli</i>	/	25	/	25	1
<i>Bacillus cereus</i>	3.12	25	/	/	0.5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25	1.56	/	/	> 10

HSF : fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSTF : tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, Hx : Hexane, D : Dichloromethane, M : Méthanol, / : non définie

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées dans une large gamme de concentrations allant de 1.56 à 25 mg/mL. L'extrait le plus actif, avec les concentrations les plus faibles (1.56 mg/mL), est celui de l'hexane des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* contre *Enterococcus faecalis* et *Acinetobacter baumannii* suivi par l'extrait de l'hexane de fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* contre *Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus* (3.12 mg/mL).

III. Discussion

Les rendements en huiles essentielles obtenus sont négligeables et loin d'être comparables avec ceux obtenus à partir des espèces de *Phagnalon* (Senatore et al., 2005) et d'*Helichrysum* (Bianchini et al., 2001; Paolini et al., 2006), étudiées auparavant. Concernant les espèces d'*Helichrysum*, ces différences peuvent être expliquées par le fait que leurs huiles essentielles peuvent être produites seulement par les fleurs, qui sont particulièrement riches en structures glandulaires. De même, les conditions de distillation, séchage du matériel végétal, date de récolte et origine géographique peuvent influencer les teneurs en essences dans ces espèces (Morone-Fortunato et al., 2010).

H. stoechas subsp. *rupestre* donne les rendements les plus importants en extraits hydro-méthanoliques, avec un rendement plus élevé pour les fleurs, contrairement à *P. saxatile* subsp. *saxatile*, dont les rendements sont proches pour les deux parties de la plante. Ces rendements et ceux de la littérature ne sont pas toujours les mêmes. Les différences sont probablement dues à

l'origine de la plante, le rapport poids de la plante / volume du solvant, la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Mussatto et al., 2011).

A notre connaissance, aucun travail sur la détermination des teneurs en composés phénoliques n'a été trouvé sur les espèces de *Phagnalon*, à l'exception de celui réalisé sur *P. graecum*, dans lequel l'extraction a été réalisée par différents solvants (Erdogan Orhan et al., 2013). Les travaux sur les espèces d'*Helichrysum* montrent que les contenus en composés phénoliques changent d'une espèce à une autre (Albayrak et al., 2008 ; Albayrak et al., 2010 ; Barros et al., 2010), ce qui est peut être dues à la différence dans leur composition chimique, à la saison et la zone de collecte et aux méthodes d'extraction utilisées (Yen et Hung, 2000 ; Barros et al., 2007).

Les faibles teneurs en tanins dans les plantes étudiées, comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes, sont probablement dues au fait que le méthanol n'est pas le solvant approprié à l'extraction de ces composés. Cette probabilité est soutenue par plusieurs travaux qui ont montré que les proanthocyanidines sont mieux extraites par l'acétone et que le mélange acétone/eau (70/30 ou 80/20) avec ou sans acide, est plus efficace que l'acétone absolue (Chavan et al., 2001 ; Macheix et al., 2005 ; Trabelsi et al., 2010).

Pour élucider un profil complet de la capacité antioxydante des extraits hydro-méthanoliques, différents tests (capacité antioxydante totale, DPPH°, pouvoir réducteur de fer, ABTS^{o+}, β-carotène et la chélation fer) ont été réalisés dans notre étude. Parmi les quatre extraits examinés, l'extrait des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* a la capacité antioxydante totale la plus importante, alors que l'activité de l'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* est significativement plus élevée par les autres méthodes surtout celles d'inhibition de blanchiment du β-carotène et de la chélation du fer. À l'exception de l'extrait des fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, tous les extraits ont une activité supérieure à celle du BHT par la méthode du DPPH° et une activité similaire à celle du BHT et BHA par les deux méthodes, piégeage de ABTS^{o+} et inhibition de blanchiment du β-carotène. Évaluée par la réduction du fer et le pouvoir chélateur, tous les extraits ont une activité beaucoup plus faible que les composés standards.

Il y a quelques études antérieures sur la capacité antioxydante des espèces de *Phagnalon*. L'activité de l'extrait hydro-méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* est beaucoup plus importante que celle de l'extrait méthanolique de *P. saxatile* (L.) Cass. Cet extrait, obtenu après deux epuisements successifs par l'éther de pétrole et le chloroforme, a montré une activité significative à piéger le DPPH° avec une CI₅₀ de 25 µg/mL (Conforti et al., 2010).

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques de 16 espèces d'*Helichrysum* de la Turquie, montrent qu'ils ont une forte capacité antioxydante totale exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique (AAE) / g d'extrait sec. *H. noeanum* est la plus active (Albayrak et al., 2010). Plusieurs autres espèces ont été testées au moins par une de ces méthodes : piégeage des radicaux DPPH[°] et ABTS^{°+}, réduction du fer, inhibition de blanchiment du β -carotène et inhibition de l'anion superoxyde. Certaines d'entre elles ont des activités comparables aux standards (BHT, Trolox ou Vit E). Il s'agit d'*H. monizii* riche en acides dicaféoylquiniques (Gouveia et Castilho, 2012), *H. longifolium* (Aiyegoro et Okoh, 2010), *H. stoechas* subsp. *barellieri* (Albayrak et al., 2010), *H. chionophilum*, *H. noeanum*, *H. plicatum* subsp. *plicatum*, *H. arenarium* subsp. *aucheri* (Tepe et al., 2005) et *H. stoechas* (Carini et al., 2001; Barros et al., 2007). Cependant, *H. chasmolyticum* (CI₅₀ = 920 μ g/mL) (Süzgeç-Selçuk et Birteksöz, 2011) et deux espèces d'*H. chionophilum* d'origine différente (CI₅₀ > 40 μ g/mL) (Albayrak et al., 2010 ; Tepe et al., 2005) ont montré une faible activité par rapport aux autres espèces d'*Helichrysum*, et ce par la méthode DPPH[°]. En comparaison avec ces résultats, toutes ces espèces d'*Helichrysum* ont une activité moindre que celle d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* étudiée, à l'exception d'*H. stoechas* subsp. *barellieri* (CI₅₀ = 7.95 μ g/mL) (Albayrak et al., 2010) et d'*H. stoechas* (CI₅₀ = 140 \pm 10 μ g/mL) (Barros et al., 2007), qui se sont montrées actives, respectivement, par les méthodes de piégeage de DPPH[°] et du pouvoir réducteur.

Comme il y a un grand nombre de composés antioxydants qui pourraient contribuer à la capacité antioxydante, nous ne pouvons pas savoir quels sont les composants responsables de la capacité antioxydante observée sans faire des études analytiques plus approfondies. Certains auteurs ont montré que la haute teneur en phénols totaux augmente l'activité antioxydante (Kumaran et Karunakaran, 2007). Le rôle de ces composés comme piègeurs de radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports, comme celui de Hernández et al. (2009). Pour explorer l'influence des constituants phytochimiques sur la capacité antioxydante, nous avons déterminé la corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante. La capacité antioxydante des extraits semble être largement influencée par la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins. Des corrélations linéaires hautement significative ont été observées entre les teneurs en polyphénols et la capacité antioxydante totale, entre le contenu en flavonoïdes et les méthodes de piégeage de DPPH[°] et de l'ABTS^{°+}, pouvoir réducteur du fer, inhibition de blanchiment du β -carotène et chélation du fer. Donc, le potentiel antioxydant peut être attribué de manière générale, aux composés phénoliques des deux espèces étudiées et plus particulièrement aux flavonoïdes, et ce en se basant sur les résultats obtenus et ceux de deux

rapports antérieurs réalisés sur *P. saxatile* (Conforti et al., 2010) et quelques espèces d'*Helichrysum* (Czinner et al., 2000).

Une faible corrélation entre le pouvoir chélateur du fer et les teneurs en polyphénols totaux a été observée, ce qui peut indiquer que ces composés pourraient ne pas être les principaux chélateurs de fer si elles n'ont pas les groupes appropriés qui chélatent les cations.

Il n'existe aucune corrélation entre les teneurs en polyphénols et la méthode du β -carotène. Ce résultat vient confirmer celui d'Amarowicz et al. (1993). Cela peut être expliqué par le fait que le dosage des polyphénols indique le taux des composés à la fois lipophiles et hydrophiles alors que ce test ne fournit qu'une indication du contenu en composés lipophiles parce qu'il est similaire à un système emulsion huile-eau (Miraliakbari et Shahidi, 2008).

Dans les extractions successives, les rendements en extraits augmentent avec la polarité du solvant, ce qui a été prouvé par plusieurs travaux antérieurs (Moure et al., 2000 ; Vazquez et al., 2008) et par le travail, réalisé sur des extraits de *P. graecum* Boiss. (Erdogan Orhan et al., 2013).

L'étude des rendements d'extraction doit être évaluée avec les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits, afin d'optimiser le processus d'extraction des composés phénoliques. Les teneurs en composés phénoliques sont significativement plus élevées dans les extraits à polarité élevée (Méthanol et eau), à l'exception de l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. Ce dernier s'est montré pauvre en ces composés qui ont été détecté par la suite dans l'eau à des teneurs considérables. Les extraits de l'hexane et du dichlorométhane ont donné des rendements négligeables vu les types des composés extractibles par ces deux solvants (lipides, chlorophylles, caroténoïdes, aglycones, terpènes. etc.).

Ces résultats démontrent clairement l'influence du solvant sur l'extractibilité des composés phénoliques, ce qui est en accord avec des études antérieures qui ont pu démontrer que les rendements en ces composés obtenus par des solvants polaires étaient plus importants que ceux de moins polarité (Akowuah et al., 2005 ; Turkmene et al., 2006 ; Trabelsi et al., 2010) et que leur solubilité est en fait déterminée par le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation de composés phénoliques, ainsi que par l'interaction des composés phénoliques avec d'autres constituants et la formation de complexes insolubles (Djeridane et al., 2006).

L'activité antioxydante des extraits par les trois méthodes, la capacité totale, le piégeage du DPPH[°] et la réduction du Fer, varie fortement en fonction des solvants d'extraction utilisés. Les solvants à polarité élevée (méthanol et eau) donnent les meilleurs résultats à l'exception de l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. Ces résultats sont en accord avec ceux des teneurs en composés phénoliques et avec ceux des travaux précédents qui

ont conclu que les extraits obtenus à l'aide de solvants polaires ont une activité plus efficace que ceux de moindre polarité (Kil et al., 2009 ; Trabelsi et al., 2010). Les résultats d'un travail réalisé par Erdogan Orhan et al. (2013), sur *Phagnalon graecum* Boiss. de la Turquie, montre que les extraits de l'acétate d'éthyle et du méthanol se sont montrés les plus actifs par les deux méthodes, piégeage du DPPH[°] et réduction du fer et que les extraits de l'hexane et du chloroforme ont une faible activité.

Dans le but de choisir le solvant adéquat pour la capacité antioxydante, parmi le méthanol et l'eau, trois autres méthodes (piégeage du radical ABTS^{°+}, pouvoir chélateur et le test d'inhibition de blanchiment du β -carotène) ont été également expérimentées. Concernant le pouvoir chélateur, les valeurs de CI₅₀ n'ont été atteintes que pour les extraits aqueux. Ce résultat est en accord avec celui du travail réalisé sur *Phagnalon graecum* Boiss. (Erdogan Orhan et al., 2013), dont l'extrait aqueux s'est montré plus actif en chélatant le fer que ceux de l'acétate d'éthyle et du méthanol. Toutefois, les extraits méthanoliques sont les plus actifs, par les deux autres méthodes, sauf pour les tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*.

Le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques et aqueux semble être largement influencé par les teneurs en composés phénoliques. La capacité antioxydante totale est significativement corrélée avec les teneurs en polyphénols totaux. A l'exception de la chélation du fer qui est bien reliée avec les teneurs en tanins, les méthodes utilisées sont bien corrélées avec le contenu en flavonoïdes. Donc, ce potentiel peut être attribué aux fortes teneurs en composés phénoliques et plus particulièrement aux flavonoïdes, ce qui est en accord avec les résultats de la corrélation entre les teneurs en ces composés et l'activité antioxydante des extraits hydro-méthanoliques de ces mêmes plantes.

Les fortes teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante la plus importante de l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, comparées à celles du méthanol ne peuvent être discutées qu'à la suite des résultats d'une analyse par CLHP-SM de ces deux extraits.

Les travaux réalisés sur l'activité antimicrobienne des extraits des espèces appartenant aux genres *Phagnalon* et *Helichrysum* ne sont pas nombreux, raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à l'étude de ces plantes. Les extraits hydro-méthanoliques sont inactifs vis-à-vis de toutes les souches. Concernant *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*, nos résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Sobhy et El-Feky (2007) sur des extraits éthanoliques d'*Helichrysum stoechas* qui se sont montrés inactifs sur ces espèces. Cependant, l'extrait éthanolique de *P. rupestre*, étudié par Ali-Shtayeh et al (1998), exerce une activité contre *S. aureus* (16.4 mm) et s'est montré inactif contre *C. albicans* et *P. aeruginosa*.

Cette faible activité est le deuxième prétexte, qui nous a mené à changer le mode de préparation des extraits en réalisant des extractions successives par des solvants de polarité croissante. Les résultats montrent que les extraits de l'hexane d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* contre *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis* et celui du dichlorométhane de *P. saxatile* subsp. *saxatile* contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, sont les plus actifs. Cependant, les extraits aqueux, sont totalement inactifs sur toutes les souches testées, à l'exception de *Staphylococcus aureus*, faiblement inhibée par l'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.

Il n'existe pas une relation directe entre l'activité antimicrobienne et la polarité des solvants (dichlorométhane, eau, méthanol, acétone, hexane) utilisés pour nos extractions ainsi que pour les extraits de *P. rupestre* (Ali-Shtayeh et al., 1998) et de plusieurs espèces d'*Helichrysum* (*H. pedunculatum*, *H. dasyanthum*, *H. felinum*, *H. excisum*, *H. petiolare*, *H. tenax*) (Meyer et Dilika, 1996 ; Lourens et al., 2004).

Les valeurs de CMI ont montré un large éventail de valeurs (jusqu'à 25 mg/mL) en comparaison avec les zones d'inhibition (13 mm). Ceci suggère que la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas la réelle efficacité antibactérienne d'un composé. Ce point est en accord avec les suggestions de Cimanga et al. (2002). Selon Tegos et al. (2002), ces valeurs de CMI ne signifient pas que tous les extraits testés sont inactifs.

IV. Conclusion

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* peuvent fournir des informations utiles pour les chercheurs dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, la phytothérapie et la phytochimie. Des analyses des extraits les plus actifs par CLHP-SM sont nécessaires afin de détecter les molécules actives. Ces analyses vont faire l'objet du troisième chapitre.

Chapitre II.

Activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles et de quelques extraits de quatre espèces de Rutacées « *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *R. graveolens* L., *R. angustifolia* Pers. et *R. tuberculata* Forsk.»

Résumé

Objectifs: Le but de cette recherche est d'étudier les effets antioxydants et antimicrobiens des extraits hydro- méthanoliques et des huiles essentielles de quatre plantes originaires d'Algérie. Il s'agit de *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens* et *Ruta tuberculata*. Des épuisements par des solvants de polarité croissante sont à envisager, pour les plantes prometteuses. **Méthodes:** Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les trois méthodes suivantes: capacité antioxydante totale, piégeage du radical DPPH[°] et pouvoir de la réduction du fer. La détermination de l'activité antimicrobienne, sur des souches bactériennes et fongiques, a été réalisée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé et celles des dilutions. **Résultats :** Les résultats montrent une faible activité antioxydante des huiles et des extraits hydro-méthanoliques et une activité antifongique puissante des huiles essentielles contre les champignons filamenteux. *Aspergillus fumigatus* et *Cladosporium herbarum* sont les souches les plus sensibles à ces huiles avec des valeurs de CMI inférieures à 4 µl/mL pour certaines huiles et atteignant 9 µl/mL pour d'autres. **Conclusion :** Compte tenu de leur activité antifongique, les huiles essentielles de ces espèces peuvent être une alternative prometteuse pour la conservation des produits alimentaires, médicaux et cosmétiques. **Mots-clés:** *Ruta*, huile essentielle, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les capacités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *R. graveolens* L., *R. angustifolia* Pers. et *R. tuberculata* Forsk., originaires d'Algérie.

Pour les plantes, dont les extraits hydro-méthanoliques montrent des activités importantes, il a été envisagé d'employer un processus d'extraction successive par des solvants de polarité croissante, afin d'optimiser l'extraction des composés phénoliques. Ces extraits vont être aussi testés pour leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Sommaire

- I. Introduction
- II. Résultats
 - II.1. Les huiles essentielles
 - II.1.1. Rendements
 - II.2. Les extraits hydro-méthanoliques
 - II.2.1. Rendements en extraits
 - II.2.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins
 - II.3. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits hydro-méthanoliques
 - II.3.1. Capacité antioxydante totale
 - II.3.2. Piégeage du radical DPPH[°]
 - II.3.3. Réduction du fer
 - II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits hydro-méthanoliques :
 - II.4.1. Activité antibactérienne
 - a. Méthode des disques
 - b. Méthode des dilutions
 - II.4.2. Activité antifongique
 - a. Méthode des disques
 - b. Méthode des dilutions
- III. Discussion
- IV. Conclusion

I. Introduction

L'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger est le mode d'extraction choisi pour extraire les huiles essentielles des quatre espèces de Rutacées. C'est une méthode simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux.

Pour la préparation des extraits, le choix du mélange méthanol/eau et de la proportion 80/20 pour la préparation des extraits hydro-méthanoliques, est justifié dans le chapitre précédent.

II. Résultats**II.1. Les huiles essentielles****II.1.1. Rendements en huiles essentielles et leurs densités relatives**

Les rendements d'extractions et les densités des huiles essentielles, obtenues à partir de la partie aérienne de chaque plante, sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 12: Les rendements en huiles essentielles (moyenne ± écart type) des espèces de *Ruta* étudiées et leurs densités.

Espèces	<i>RCB</i>	<i>RG</i>	<i>RA</i>	<i>RT</i>
Rendement en % (p/p)	0.9 ± 0.04	0.18 ± 0.01	1.49 ± 0.36	0.11 ± 0.01
Densités relatives à 20°C	0.9295	0.8156	0.8834	0.8432

RCB : *Ruta chalepensis* var. *bracteosa*, *RG* : *R. graveolens*, *RA* : *R. angustifolia*, *RT* : *R. tuberculata*

II.2. Les extraits hydro-méthanoliques

II.2.1. Rendements en extraits

Devant la difficulté de séparer les fleurs fragiles et de petite taille des tiges feuillées, la préparation des extraits hydro-méthanoliques a été faite à partir de la partie aérienne des plantes étudiées et ce pour la réalisation des dosages des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et pour l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes. Les rendements obtenus sont représentés dans le **tableau 13**. Ceux en extraits hydro-méthanoliques de *R. chalepensis* var.*bracteosa*, *R. graveolens* et *R. tuberculata* sont proches, alors que celui de *R. angustifolia* est légèrement inférieur.

Tableau 13: Les rendements et les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés (moyenne \pm écart type) dans les extraits hydro-méthanoliques des espèces de *Ruta* étudiées

	Rendements (%)	Teneur en Polyphénols (mg EAG/g MS)	Teneur en Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Teneur en Tanins (mg EC/g MS)
<i>RCB</i>	16 \pm 0.5	9.80 \pm 0.05	1.90 \pm 0.05	0
<i>RG</i>	15 \pm 0.3	07.80 \pm 0.20	1.20 \pm 0.30	0
<i>RA</i>	9 \pm 0.12	11.11 \pm 0.04	3.47 \pm 0.01	0
<i>R.T</i>	13 \pm 0.24	5.51 \pm 0.20	0	0

RCB : *R. chalepensis* var. *bracteosa*, *RG* : *R. graveolens*, *RA* : *R. angustifolia*, *R.T* : *R. tuberculata*

II.2.2. Dosages des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins

Afin d'établir une relation entre la teneur en composés chimiques et l'activité antioxydante, les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins contenus dans les extraits hydro-méthanoliques ont été déterminées (**tab. 13**). Elles sont obtenues à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage représentées dans l'**Annexe 1 (fig. 71 - 73)**.

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits des quatre espèces de *Ruta* sont faibles. *R. angustifolia* a les teneurs les plus élevées. Le dosage des tanins n'a pas révélé la présence de ces composés dans les quatre extraits.

II.3. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits hydro-méthanoliques

L'activité antioxydante des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles a été évaluée par trois méthodes, capacité antioxydante totale, piégeage du radical DPPH et pouvoir réducteur du fer. Les courbes des D.O en fonction des concentrations pour la réduction du fer et des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations pour le piégeage du radical DPPH, sont figurées dans l'**Annexe 4 (fig. 92 - 95)**.

Les résultats de ces activités sont rassemblés dans le tableau suivant. Pour la capacité antioxydante totale et la réduction du Fer, les données chiffrées sont par la suite représentées graphiquement sous forme d'histogrammes, sur lesquels on repère facilement les extraits les plus actifs.

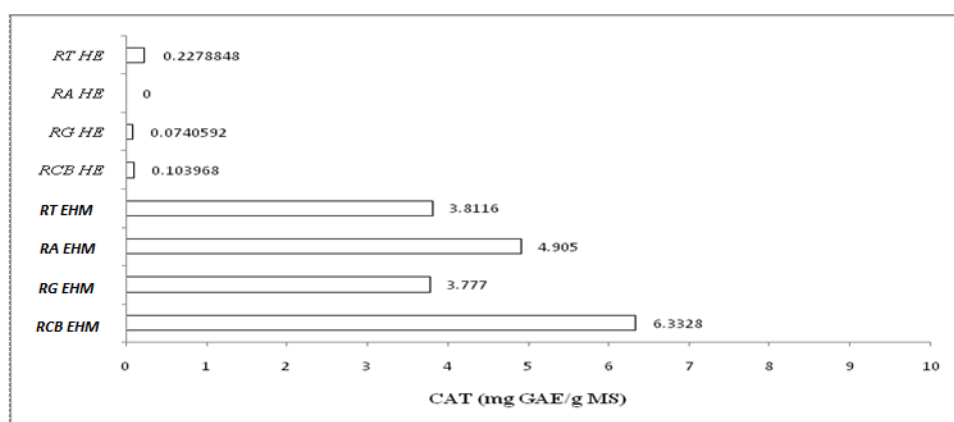
Tableau 14: Les activités antioxydantes des extraits hydro-méthanoliques des espèces de *Ruta* et des standards par les différentes méthodes

Extraits	Capacité antioxydante totale (mg EAG/g MS)	CI ₅₀ /DPPH (µg/mL)	CE ₅₀ /réduction du Fer (µg/mL)
<i>RT HE</i>	0.227 ± 0.01	/	1820 ± 7.93
<i>RA HE</i>	0	/	1300 ± 7.63
<i>RG HE</i>	0.07 ± 0.007	/	2110 ± 14.01
<i>RCB HE</i>	0.103 ± 0.015	/	2490 ± 8.62
<i>RT EHM</i>	3.81 ± 0.2	54.5 ± 0.38	1890 ± 8.08
<i>RA EHM</i>	4.9 ± 0.26	39.25 ± 0.25	1230 ± 6.02
<i>RG EHM</i>	3.77 ± 0.35	/	1740 ± 4.16
<i>RCB EHM</i>	6.33 ± 0.25	/	870 ± 3.21
<i>Standards</i>		10.50 ± 0.40 ^a	99.64 ± 1.80 ^a 53.67 ± 2.40 ^b

HE : huile essentielle, *EHM* : extrait hydro-méthanolique, *RCB* : *R. chalepensis* var. *bracteosa*, *RG* : *R. graveolens*, *RA* : *R. angustifolia*, *RT* : *R. tuberculata*, / : valeur de CI₅₀ non atteinte, ^a BHT, ^b acide ascorbique.

II.3.1. Capacité antioxydante totale

Les résultats indiquent que la capacité antioxydante totale des extraits et des huiles essentielles des quatre espèces de Rutacées est nettement moins importante comparée à celles des deux espèces d'Astéracées, étudiées dans le premier chapitre. Les huiles essentielles ont une très faible capacité par rapport aux extraits hydro-méthanoliques. L'activité la plus importante est celle de l'extrait de *R. chalepensis* var. *bracteosa* (6.33 mg EAG/g MS). Cependant, l'huile de *R. angustifolia* n'a montré aucune activité (**fig. 33**).



HE : huile essentielle, *EHM* : extrait hydro-méthanolique, *RCB* : *R. chalepensis* var. *bracteosa*, *RG* : *R. graveolens*, *RA* : *R. angustifolia*, *RT* : *R. tuberculata*.

Figure 33: Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles des espèces de *Ruta* étudiées

II.3.2. Capacité de piégeage du radical DPPH°

Le **tableau 15** montre que la capacité des huiles essentielles à piéger le radical DPPH° est nettement plus inférieure à celle des extraits. Les seuls extraits qui atteignent la valeur de CI₅₀ sont ceux de *R. tuberculata* et de *R. angustifolia*, avec des valeurs respectives de 54.5 ± 0.38 et 39.25 ± 0.25 µg/mL (**tab 14**).

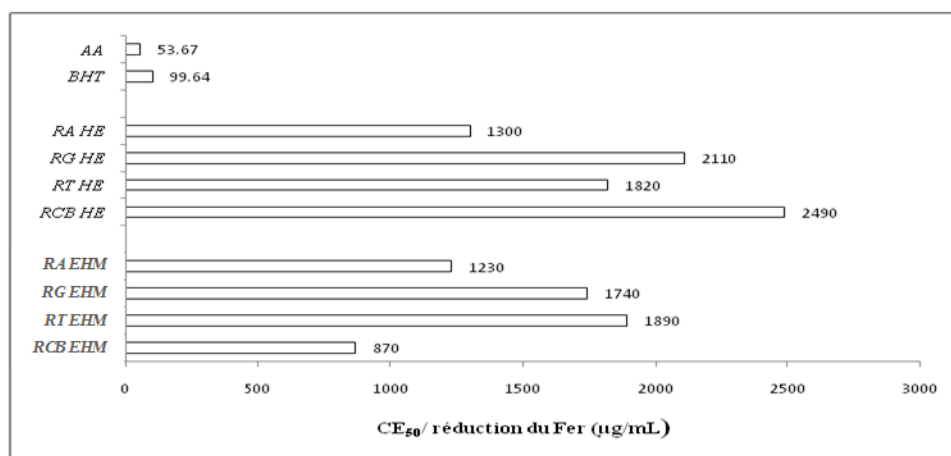
Tableau 15: Les pourcentages d'inhibition (%) (moyenne ± écart type) du radical libre DPPH° des extraits et des huiles essentielles des espèces de *Ruta* étudiées

	RCB	RT	RG	RA
Extraits hydro-méthanoliques à 75 µg /ml	15 ± 0.1	68.33 ± 0.3	28.33 ± 0.52	86.66 ± 0.34
Huiles essentielles à 250 µg /ml	13.72 ± 0.28	1.66 ± 0.05	6.15 ± 0.08	6.15 ± 0.05

RCB : *R. chalepensis* var. *bracteosa*, RG : *R. graveolens*, RA : *R. angustifolia*, RT : *R. tuberculata*

II.3.3. Capacité de réduction du fer

Les résultats de ce test sont représentés dans l'histogramme des valeurs de CE₅₀ (**fig. 34**). L'extrait hydro-méthanolique le plus actif est celui de *R. chalepensis* var. *bracteosa*, suivi par l'extrait et l'huile essentielle de *R. angustifolia*. Tous les extraits et les huiles essentielles testés ont une activité nettement plus inférieure à celles des contrôles positifs (Acide ascorbique et BHT).



HE : huile essentielle, EHM : extrait hydro-méthanolique, RCB : *R. chalepensis* var. *bracteosa*, RG : *R. graveolens*, RA : *R. angustifolia*, RT : *R. tuberculata*, AA : acide ascorbique, BHT : Antioxydant de synthèse.

Figure 34: Valeurs de CE₅₀ des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles des espèces de *Ruta* étudiées et des standards, testés par la méthode de la réduction du fer

Sur la base des résultats de ces trois tests, les extraits et les huiles les plus actifs doivent être testés par trois autres méthodes (piégeage de l'ABTS^{•+}, pouvoir chélateur et inhibition de blanchiment du β-carotène). Cependant, la réalisation de ces tests ne peut pas se faire en raison de leur faible activité antioxydante par les trois premières méthodes. Ces résultats excluent même la réalisation des extractions successives par des solvants de polarité croissante.

II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits hydro-méthanoliques

L'activité antimicrobienne des extraits hydro-méthanoliques et des huiles essentielles de quatre espèces de *Ruta* contre des micro-organismes de référence, a été évaluée, *in vitro*, par la méthode des disques. Les extraits qui semblent être actifs, résultat révélé par l'apparition de zones d'inhibitions importantes, ont fait l'objet d'une étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

II.4.1. Activité antibactérienne

a. Méthode des disques

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits hydro-méthanoliques des quatre espèces étudiées montrent qu'ils n'exercent aucune activité sur les souches bactériennes à une quantité de 500µg/disque (6mm de diamètre viv-à-vis de toutes les souches). Cependant, les huiles essentielles, appliquées à 10 µL/disque contre les 12 bactéries, ont un faible potentiel antibactérien. Les diamètres des zones d'inhibition de ces huiles essentielles sont représentés dans le **tableau 16**.

L'activité la plus élevée a été observée pour l'huile essentielle de *R. chalepensis* var. *bracteosa* contre *S. aureus* et *S. typhi* avec les zones d'inhibition les plus grandes (15 et 17 mm, respectivement) et contre *B. cereus* et *A. baumannii* (12 mm). L'huile de *R. tuberculata* a montré une activité antimicrobienne modeste contre *E. faecalis* (14 mm). Tandis que pour l'huile de *R. graveolens*, de faibles zones d'inhibition ont été observées sur *B. cereus*, *S. aureus* et *S. typhi* (12 mm). Aucune activité antibactérienne n'a été détectée pour l'huile de *R. angustifolia*, sur toutes les souches testées. Les bactéries testées sont beaucoup plus sensibles à la gentamicine (12-27 mm) qu'aux huiles essentielles testées, sauf que *S. aureus* et *S. typhi* sont plus sensibles à l'huile de *R. chalepensis* var. *bracteosa* alors que *E. faecalis*, la souche la plus résistante à l'antibiotique (9 mm), est plus sensible à l'huile de *R. tuberculata* (14 mm).

Tableau 16: L'activité antibactérienne, *in vitro*, des huiles essentielles des espèces de *Ruta* étudiées

Souches bactériennes	Diamètres d'inhibition * (mm)					Gentamicine
	HE	RA	RCb	RG	RT	
	10µL/disque		15µg/disque			
<i>Enterobacter cloacea</i>	6	6	6	6	26	
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	10	9	14	9	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	12	6	6	12	
<i>Bacillus cereus</i>	10	12	12	12	16	
<i>Escherichia coli</i>	6	7	7	6	20	
<i>Citrobacter freundii</i>	7	6	6	6	27	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6	6	6	19	
<i>Klebsielle pneumoniae</i>	6	6	6	6	17	
<i>Lysteria monocytogenes</i>	6	6	6	6	12	
<i>Proteus mirabilis</i>	6	10	7	6	14	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	17	12	10	17	
<i>Salmonella typhi</i>	6	15	12	8	16	

* Diamètre du disque (6mm) inclus, HE: huiles essentielles, RA: *R. angustifolia*, RCb: *R. chalepensis* var. *bracteosa*, RG: *R. graveolens*, RT: *R. tuberculata*

b. Méthode des dilutions

Pour les huiles essentielles de *R. chalepensis* var. *bracteosa* et de *R. tuberculata*, les résultats sont confirmés par la détermination des valeurs de la CMI des souches les plus sensibles (**tab. 17**). Les propriétés inhibitrices des huiles ont été observées dans une plage de concentrations de 44 à 175 µl/mL. L'huile de *R. tuberculata* est plus active sur *Enterococcus faecalis* avec une valeur de CMI de 44 µl/mL. La sensibilité des trois souches a été vérifiée par le test à la Gentamicine.

Tableau 17: Les valeurs des CMI des huiles essentielles des espèces de *Ruta*, testées contre les bactéries les plus sensibles

Souches bactériennes	HE (µl/mL)		Antibiotique
	RCb	RT	Gentamicine (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	44	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	175	/	0.5
<i>Salmonella typhi</i>	87	/	2.5

HE : huiles essentielles, RCb: *R. chalepensis* var. *bracteosa*, RT: *R. tuberculata*, /: non définie

II.4.2. Activité antifongique

a. Méthode des disques

Les résultats de l'activité antifongiques des extraits hydro-méthanoliques des quatre espèces étudiées montrent que ces extraits n'exercent aucune activité sur les souches fongiques pour une quantité de 500µg / disque (6mm de diamètre viv-à-vis de toutes les souches). Alors que les huiles essentielles, appliquées à 10 µL/disque, ont montré des effets antifongiques considérables contre toutes les souches de champignons testées (**tab. 18**).

Tableau 18: L'activité antifongique, *in vitro*, des huiles essentielles des espèces de *Ruta* étudiées

Souches fongiques	Diamètres d'inhibition* (mm)					Amphotéricine B
	HE	10µL/disque				
		RA	RCb	RG	RT	
<i>Candida albicans</i>		35	15	33	17	22
<i>Cladosporium herbarum</i>		18	35	25	34	37
<i>Fusarium oxysporum</i>		20	08	20	16	08
<i>Alternaria alternaria</i>		25	10	25	20	27
<i>Aspergillus flavus</i>		15	16	22	17	17
<i>Aspergillus fumigatus</i>		20	23	15	17	28

* Diamètre du disque (6mm) inclus, HE: huiles essentielles, RA: *R. angustifolia*, RCb: *R. chalepensis* var. *bracteosa*, RG: *R. graveolens*, RT: *R. tuberculata*

L'activité antifongique la plus élevée a été observée pour les huiles de *R. angustifolia* et *R. graveolens* contre *C. albicans* (35 et 33 mm). Les autres souches réagissent différemment vis-à-vis de ces deux huiles, avec des diamètres compris entre 15 et 25 mm.

C. herbarum est le micro-organisme le plus sensible aux huiles essentielles de *R. chalepensis* var. *bracteosa* et de *R. tuberculata* (35 et 34 mm, respectivement). Les autres souches se comportent différemment avec des diamètres compris entre 08 et 23 mm. *F. oxysporum* est la souche la plus résistante à la fois à l'huile de *R. chalepensis* var. *bracteosa* et à l'amphotéricine B.

Les activités des huiles essentielles de *R. chalepensis* var. *bracteosa* et de *R. tuberculata* contre *C. herbarum*, *F. oxysporum*, *A. flavus* et de celles de *R. angustifolia* et de *R. graveolens* contre *F. oxysporum*, *A. alternaria*, *A. flavus* et *C. albicans*, sont proches ou plus importantes que celle de l'amphotéricine B.

b. Méthode des dilutions

Les valeurs de CMI des huiles essentielles contre *Candida albicans*, déterminées par la méthode de micro-dilution sur milieu liquide, sont représentées dans le **tableau 19**. La méthode des dilutions sur milieu gélosé, nous a permis de déterminer les pourcentages d'inhibitions (**Annexe 5 (tab. 26)**) ainsi que les valeurs des CMIs de ces huiles essentielles contre les cinq champignons filamenteux testés (**tab. 19**).

Contre *C. albicans*, l'huile essentielle de *R. graveolens* a l'effet inhibiteur le plus important (22 µl/mL) par rapport aux trois autres huiles essentielles de *Ruta*, testées. Pour les champignons filamenteux, les valeurs des CMIs sont inférieures à 4 µl/mL pour certaines huiles et peuvent atteindre 9 µl/mL pour d'autres. Les souches les plus sensibles sont *A. fumigatus* aux huiles de *R. angustifolia* et de *R. graveolens*, et *C. herbarum* aux huiles de *R. angustifolia* et de *R. chalepensis* var. *bracteosa*.

Tableau 19: Les valeurs de CMI des huiles essentielles des espèces de *Ruta* testées contre *Candida albicans* et les champignons filamenteux

Souches fongiques	HE (µl/mL)				Antifongique (µg/mL)
	RA	RCb	RG	RT	Amphotéricine B
<i>Candida albicans</i>	175	44	22	87	2.5
<i>Cladosporium herbarum</i>	5	5	8	9	2.5
<i>Fusarium oxysporum</i>	8	9	9	8	20
<i>Alternaria alternaria</i>	9	5	9	8	1.25
<i>Aspergillus flavus</i>	9	9	9	<7	5.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<4	8	<4	<7	2.5

HE: huiles essentielles, RA: *R. angustifolia*, RCb: *R. chalepensis* var. *bracteosa*, RG: *R. graveolens*, RT: *R. tuberculata*

III. Discussion

En comparant les rendements en huiles essentielles, obtenus pour les espèces de *Ruta*, avec ceux rapportés dans les travaux antérieurs, nous avons déduit qu'ils sont proches (Dob et al., 2008; Merghache et al., 2009) ou non comparables (Soleimani et al., 2009; Mejri et al., 2010). Cela peut être justifié par les suggestions de Salgueiro et al. (1997), à savoir que le climat, le génotype, la situation géographique, les précipitations et la période de la récolte peuvent affecter la teneur en huile essentielle des plantes de même espèce.

De même, les rendements en extraits hydro-méthanoliques de ces espèces ne peuvent pas être comparés avec ceux de la littérature car ils dépendent de l'espèce, de l'origine de la plante, de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Mussatto et al., 2011).

Concernant l'activité antioxydante, les extraits hydro-méthanoliques des espèces de *Ruta*, qui se sont montrés pauvres en composés phénoliques, ont révélé des activités faibles à modérées. Ces résultats viennent confirmer ceux des travaux antérieurs réalisés sur quelques espèces de *Ruta* de différentes origines. Il s'agit des extraits de *Ruta graveolens* de la grande Bretagne (Mantle et al., 2000), de la Grèce (Proestos et al., 2006) et de Singapour (Wong et al., 2006), de *Ruta montana* d'Algérie (Djeridane et al., 2006) et de *R. chalepensis* de la Tunisie (Khelifi et al., 2013). De ces résultats, nous pouvons déduire que les teneurs en composés phénoliques sont nettement moins importantes dans les espèces des Rutacées par rapport à celles d'Astéracées, ce qui a été déjà rapporté par Djeridane et al. (2006) et Khelifi et al. (2013).

L'activité antioxydante des huiles essentielles est attribuable aux composés à structure phénolique (Braga et al., 2006) et à certains alcools (Edris, 2007). Ainsi, la composition des huiles des espèces appartenant au genre *Ruta*, qui sont généralement caractérisées par l'abondance des cétones (jusqu'à 84%, même plus) (Verzera et al., 2000), peut être à l'origine de la très faible capacité antioxydante de nos huiles essentielles, par les trois méthodes utilisées.

Concernant l'activité antimicrobienne, les extraits hydro-méthanoliques n'ont montré aucune activité même pour des quantités élevées par disque. Ce résultat est soutenu par le travail de **Proestos et al. (2006)** qui a révélé que l'extrait hydro-méthanolique des feuilles de *Ruta graveolens*, originaire de la Grèce, n'a exercé aucune activité antimicrobienne sur *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas putida*.

Les résultats de notre étude ont révélé aussi une activité antibactérienne des huiles faible à modérée. Celle-ci varie selon les différentes espèces de *Ruta* étudiées, ce qui est probablement dû à la composition chimique de leurs huiles essentielles. Ce résultat est soutenu par de nombreuses études qui ont démontré que les huiles essentielles d'espèces de *Ruta* sont parmi celles ayant les propriétés antibactériennes les moins puissantes (**Proestos et al., 2006; Ben Bnina et al., 2010**). Celle d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forsskal) A. Juss (Syn. *Ruta tuberculata*), à dix microlitres, a inhibé partiellement la croissance d'*Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, et *Bacillus subtilis* dans la même mesure que 0.10 µg de gentamicine. Elle est inactive contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (**Al-Burtamani et al., 2005**).

Les valeurs de CMI ont montré un large éventail de valeurs (44 à 175 µl/mL) en comparaison avec les zones d'inhibition (14-17 mm). Ceci suggère que la taille de la zone d'inhibition ne reflète pas la réelle efficacité antibactérienne d'un composé ce qui est en accord avec les suggestions de **Cimanga et al. (2002)**.

Les huiles essentielles testées possèdent une activité antifongique significative contre les champignons filamenteux et même contre *Candida albicans*. Un travail réalisé par **Ben Bnina et al. (2010)**, montre que l'huile essentielle de *R. chalepensis*, testée contre neuf espèces de champignons et quinze espèces de *Candida*, exerce une activité antifongique importante contre *Trichodrema viride* et un pouvoir antifongique significatif contre *C. albicans* ATCC 90028. Celle d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forsskal) A. Juss (Syn. *Ruta tuberculata*) a également affecté la croissance du mycélium de *Curvularia lunata* et de *Fusarium oxysporium* d'une manière dose-dépendante, mais elle n'a eu aucun effet sur la germination de leurs spores (**Al-Burtamani et al., 2005**).

La faible activité antibactérienne et l'activité antifongique significative de ces huiles essentielles, peuvent être attribuées à l'abondance des composés cétoniques dans les huiles des espèces appartenant au genre *Ruta* (**Verzera et al., 2000**). Ces composés sont faiblement antiseptiques, mais ont une action antifongique (**Mailhebiau, 1994**).

IV. Conclusion

Les propriétés antifongiques des huiles essentielles permettent de les proposer comme des outils potentiels pour surmonter la résistance aux antifongiques de synthèse et l'incidence croissante de maladies d'origine alimentaire. Elles peuvent être proposées pour l'amélioration de la durée de conservation des produits alimentaires. Pour mieux interpréter les résultats de ce chapitre, des analyses par CG-SM vont faire l'objet du troisième chapitre.

Chapitre III.

Caractérisations chimiques

Résumé

Objectifs: Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'obtention des profils qualitatifs en composés phénoliques, des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, probablement responsables de leurs activité antioxydante. Nous nous sommes intéressés aussi à l'analyse des huiles essentielles des quatre espèces de *Ruta* qui ont montré une activité antifongique intéressante et à relier cette activité à leur compositions. **Méthodes:** Les extraits méthanoliques et aqueux ont été analysés par CLHP Orbitrap-SM⁺. Les composés volatils des huiles ont été examinés par CG-SM. **Résultats:** L'analyse par CLHP-SM a révélé la présence des dérivés d'acide hydroxycinnamique dont les isomères d'acide caféoylquinique et di-caféoylquinique dans tous les extraits et les isomères d'acide malonyl caféoylquinique et di-caféoylquinique dans les extraits aqueux. D'autres classes de composés ont été détectées à savoir les flavonols, les flavones et les biflavones. Cette composition nous mène à comprendre la bonne activité antioxydante des extraits. Quant à l'analyse des huiles essentielles, les huiles de *R. angustifolia*, *R. graveolens* et *R. chalepensis* var. *bracteosa* ont montré une grande variation dans leur composition chimique avec celle de *R. tuberculata*. Les cétones sont l'élément le plus abondant de ces huiles à l'exception de *R. tuberculata* qui a une composition totalement différente. Ces compositions expliquent leur activité antifongique potentielle. **Conclusion :** Il est intéressant de relier l'activité des extraits actifs à leurs compositions, dans le but de recommander leurs composants pour la formulation d'agents de conservation à base de plantes.

Mots-clés: *H. stoechas* subsp. *rupestre*, *P. saxatile* subsp. *saxatile*, extrait, CLHP-SM, *Ruta*, huile essentielle, CG-SM.

A partir des résultats des chapitres I et II, plusieurs questions dont les suivantes sont restées sans réponses: De ces extraits, quelles sont les classes de substances responsables de ces effets antifongiques et antioxydants ? Existe-il une corrélation entre la structure de ces composés et ces effets ? Par quel mécanisme ces composés agissent-ils ? Peuvent-ils causer un mauvais goût à la matrice alimentaire ? A quelles concentrations ils deviennent toxiques pour l'organisme ? C'est dans ce cadre que le présent chapitre trouve sa justification, pour répondre aux deux premières interrogations, afin d'envisager les applications de ces extraits dans la formulation d'agents de conservation.

Sommaire

- I. Introduction
- II. Résultats
 - II.1. Analyse par CLHP Orbitrap-SMⁿ des extraits méthanoliques et aqueux d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*
 - II.1.1. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*
 - a. Dérivés d'Acide hydroxycinnamique
 - Esters d'acide hydroxycinnamique
 - Acide monohydroxycinnamique glycoside
 - b. Flavonoïdes
 - Flavonols glycosylés
 - Biflavones
 - II.1.2. Identification des composés phénoliques dans l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*
 - a. Dérivés d'Acide hydroxycinnamique
 - Esters d'acide hydroxycinnamique
 - II.1.3. Identification des composés phénoliques dans l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas*
 - a. Dérivés d'acide hydroxycinnamique
 - Esters d'acide hydroxycinnamique
 - Dérivé d'acide caféique
 - b. Flavonoïdes
 - Flavonols glycosylés
 - II.1.4. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de *P. saxatile* subsp. *saxatile*
 - a. Dérivés d'Acide hydroxycinnamique
 - Esters d'acide hydroxycinnamique
 - b. Flavonoïdes
 - Flavonols glycosylés et Flavonols aglycones
 - Flavones
 - II.2. Analyse par CG-SM des huiles essentielles des espèces de *Ruta*
- III. Discussion
 - III.1. Analyse par CLHP Orbitrap-SMⁿ des extraits méthanoliques et aqueux d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*
 - III.1.1. Relation Activité antioxydante / Composition des extraits
 - III.2. Analyse par CG-SM des huiles essentielles des espèces de *Ruta*
 - III.2.1. Relation Activité antimicrobienne / Composition des huiles essentielles
- IV. Conclusion

I. Introduction

Les résultats de l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes nous ont mené à nous intéresser à l'analyse des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* à activité antioxydante et des huiles essentielles des quatre espèces de *Ruta* à activité antifongique et à relier ces activités à leurs compositions.

II. Résultats**II.1. Analyse par CLHP Orbitrap-SMⁿ des extraits méthanoliques et aqueux d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile***

Pour la réalisation de ce type d'analyse, un premier criblage des extraits a été effectué en fonction de leurs capacités antioxydantes (chapitre I). Par une première analyse des extraits

prometteurs par CLHP-DAD, nous avons obtenu des différences qualitatives dans les profils des composés phénoliques entre les extraits méthanoliques et aqueux des fleurs et tiges feuillées des deux plantes. A la base de ces résultats, nous avons pu réaliser un deuxième criblage des extraits à analyser par CLHP-SM en fonction de la résolution des pics obtenus.

A cet effet, les extraits aqueux des tiges feuillées et des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et l'extrait méthanolique de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, ont été analysés par CLHP-DAD-ESI-SMⁿ en mode d'ions négatifs et positifs. La tentative d'identification de quelques composés a été également soutenu par «plafonnement de sodium», le $[M+H+Na]^+$. Un chromatogramme UV caractéristique, enregistré à 300 nm, est représenté pour chaque extrait.

L'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, qui s'est montré inactif, a été aussi analysé pour qu'on puisse interpréter ce résultat inattendu.

II.1.1. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*

Les composés phénoliques, détectés dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, sont divisés en 2 classes en fonction de leurs relations structurales : dérivés d'acide hydroxycinnamique (un acide monohydroxycinnamique glycoside et des esters d'acide hydroxycinnamique) et flavonoïdes (flavonols glycosylés et biflavone) (**fig. 35**). Le **tableau 20**, résume les UV, la masse et les caractéristiques de la fragmentation SM/SM des pics chromatographiques ainsi que la formule chimique de chaque composé identifié.

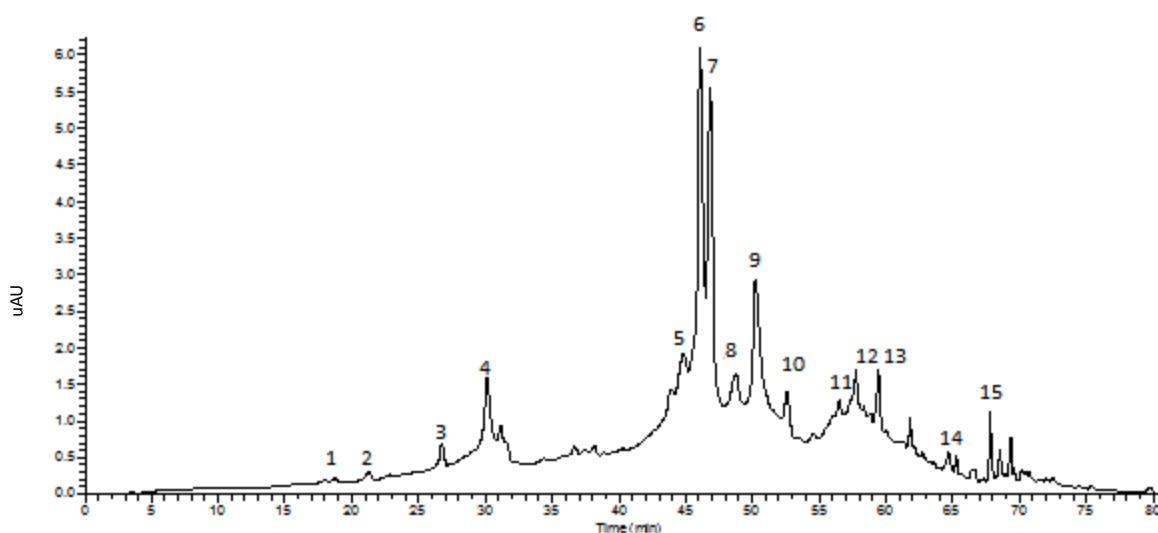


Figure 35: Chromatogramme CLHP de l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif

Tableau 20: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SMⁿ dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*

Pic	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	SM/SM [M-H] ⁻	[M+H] ⁺	SM/SM [M+H] ⁺	Masse exacte	Formule	Molécule	Références
1	18.69	233, 300, 324	353.0858	191.0553 179.0343 173.0451	355.1025	163.039	354.09415	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
2	21.25	233, 300, 324	353.0858	191.0553 179.0343 173.0451	355.1025	163.039	354.09415	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
3	26.75	286	325.0916	163.0396	349.0887 (+Na)	165.0543 147.0438	326.09015	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	Acide Coumarique hexose	Hanhineva et al., 2008
4	30.13	240, 310, 326	353.0857	191.0552 179.0343 173.045 135.0449	355.1022	163.039	354.09395	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
5	44.84	250, 326	515.1173	353.086 191.0554 179.0344	517.1327	499.1217 163.0387	516.125	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	
6	46.04	241, 300, 321	515.1167	353.0857 335.0755 179.0342 191.0554	517.1337 539.1156 (+ Na)	163.0389	516.1252	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
7	46.84	241, 300, 321	515.1167	353.0857 335.0755 191.0552 179.0342	517.1337 539.1156 (+Na)	163.0389	516.1252	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	
8	48.74	253,337	463.0859	300.0263	465.1016 487.0835 (+Na)	303.0493	464.09375	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Quercétine-3- <i>O</i> - glucoside	Sawada et al., 2009
9	50.24	241, 300, 327	515.1169	353.0856 335.0756 191.0552 179.0342 135.0448	517.1334 539.1156 (+ Na)	163.0389	516.12515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
10	52.61	265, 348	447.0909	284.0316	449.1077 471.0887 (+Na)	309.0365 287.055	448.0993	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Kaempférol-3-Glucoside	Sawada et al., 2009

11	56.5	254, 300, 332	625.1173	463.0861 431.0961 301.0342	627.1344	303.0498	626.12585	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Quercétine dihexose	
12	57.74	268, 300ep, 330	947.4037	609.1215 487.1586 285.0391 179.0344	949.4237	633.1213 (+Na) 511.1566 (+Na) 287.0546 163.0387	948.4137	C ₄₃ H ₄₈ O ₂₄	Kaempférol 3-feruloyldiglycoside-7-glucoside	Llorach et al., 2003
13	59.47	235,300	785.3516	665.2949 285.0754	787.3707		786.36115	C ₃₃ H ₃₈ O ₂₂	Kaempférol dihexose glucuronide	Hanhineva et al., 2008
14	64.66	225, 265, 342	537.0812	375.0812	539.0973		538.09	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	Amentoflavone	Sánchez-Rabameda et al., 2003
15	67.83	303	529.2995	367.2448			530.14		Acide 3-Caféoyl-4-feruloylquinique	Alonso-Salces et al., 2009

a. Dérivés d'acide hydroxycinnamique

- Esters d'acide hydroxycinnamique

Ces esters sont formés entre des acides trans-cinnamiques, tels que : acide caféique, acide férulique et acide p-coumarique, et l'acide (-)-quinique dérivé de la voie de l'acide shikimique (Clifford et al., 2005). Les spectres UV des composés contenant un fragment hydroxycinnamique se caractérisent par des bandes des absorptions maximales à 320-329 nm, à 242 nm et un épaulement à 295-300 nm (Mabry et al., 1970).

Les composés 1, 2 et 4 sont élués à 18.69, 21.25 et 30.13 min et présentent tous les trois un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 353.0858 (fig. 36) et 355.1025 (fig. 37). Leur masse exacte calculée est de 354.09415 ce qui correspond à la formule de $C_{16}H_{18}O_9$ caractéristique aux isomères d'acide Caféoylquinique (Ferracane et al., 2008 ; Alonso-Salces et al., 2009). Cette masse peut correspondre à quatre acides caféoylquiniques : acide 1-*O*-caféoylquinique, acide 3-*O*-caféoylquinique, acide 4-*O*-caféoylquinique et acide 5-*O*-caféoylquinique (Clifford et al., 2005). Les fragments à m/z 179.0343 [acide caféique- H]⁻, m/z 173.0451 [acide quinique - H_2O-H]⁻, m/z 191.0553 [acide quinique- H]⁻ et à m/z 163.0389 [caféoyl+ H]⁺, correspondent à la perte d'une unité de caféoyl et la libération de l'acide quinique.

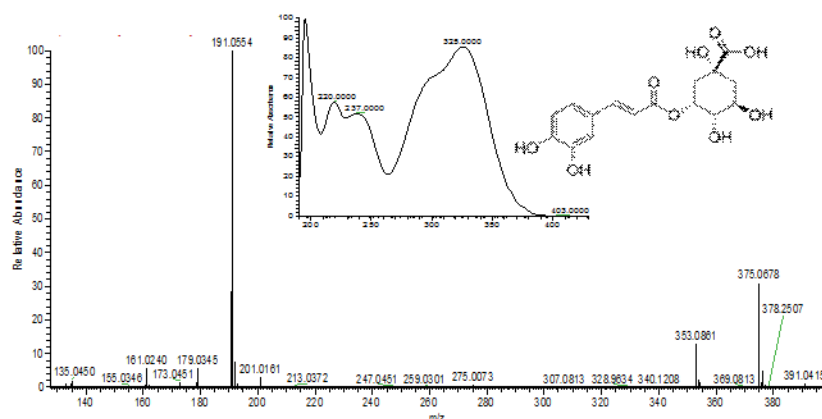


Figure 36: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide Caféoylquinique et de sa fragmentation

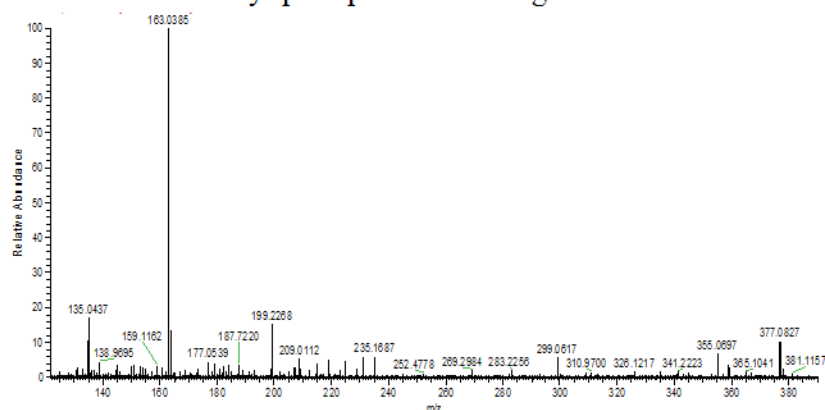


Figure 37: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide Caféoylquinique et de sa fragmentation

Les composés 5, 6, 7 et 9 sont élués à 44.84, 46.04, 46.84 et 50.24 min et présentent tous les quatre un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 515.1173 (**fig. 38**) et 539.1156 ($539.1156 [M+H+Na]^+$) (**fig. 39**). Leur masse exacte est de 516.1252 ce qui correspond à la formule de $C_{25}H_{24}O_{12}$ caractéristique aux isomères d'acide di-*O*-Caféoylquinique (**Ferracane et al., 2008 ; Alonso-Salces et al., 2009**). Cette masse peut correspondre à cinq acides di-*O*-Caféoylquiniques : acide 1,3-di-*O*-Caféoylquinique, acide 3,4-di-*O*-Caféoylquinique, acide 1,5-di-*O*-Caféoylquinique, acide 3,5-di-*O*-Caféoylquinique et acide 4,5-di-*O*-Caféoylquinique (**Gouveia et al., 2012**). Le fragment à m/z 353.086 $[M-H-Caféoyl]^-$ indique la libération de l'acide mono-caféoylquinique, après la perte d'une unité de caféoyl. Les fragments à m/z 191.0554 $[acide\ quinique-H]^-$, 179.0344 $[acide\ caféique-H]^-$ et à m/z 163.0389 $[caféoyl+H]^+$, indique la libération de la l'acide quinique après la perte de deux unités de caféoyl.

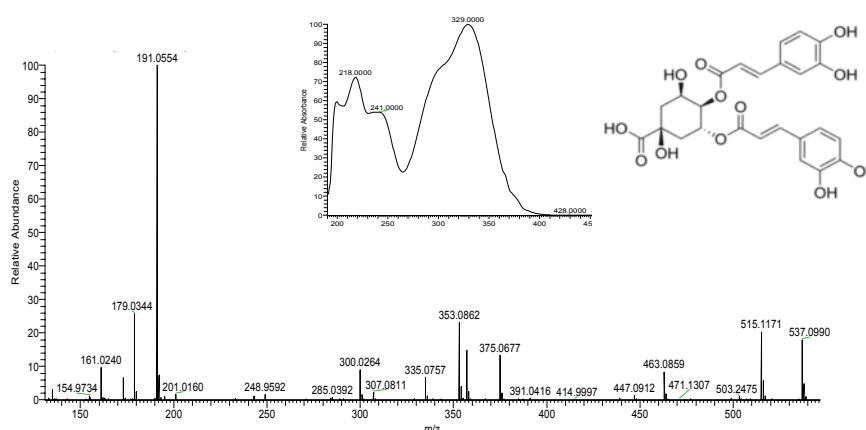


Figure 38: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide di-*O*-Caféoylquinique et de sa fragmentation

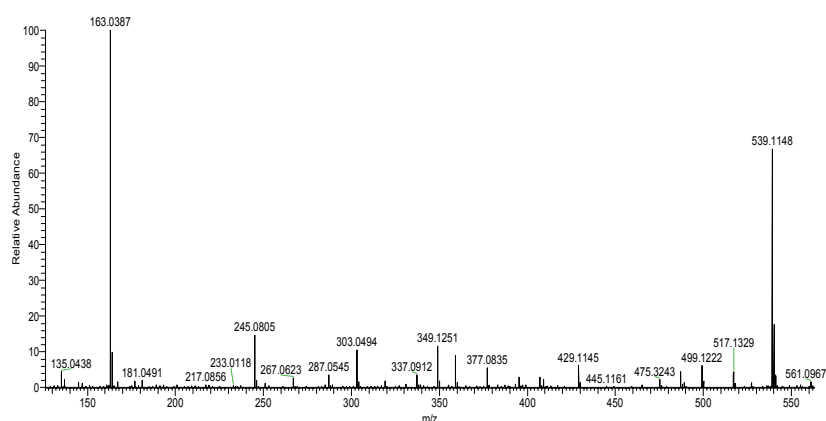


Figure 39: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide di-*O*-Caféoylquinique et de sa fragmentation

Le pic 15 correspond à l'acide 3-Caféoyl-4-feruloylquinique, élué à 67.83 min. Il présente un m/z en $[M-H]^-$ de 529.2995. Sa masse exacte calculée est de 530.14 (**Alonso-Salces et al., 2009**). Le fragment à m/z 367.2448 $[M-H-Caféoyl]^-$ indique la libération de l'acide feruloylquinique, après la perte d'une unité de caféoyl (m/z 162).

- Acide monohydroxycinnamique glycoside :

Le pic 3, détecté à 26.75 min présente un m/z de 325.0916 en $[M-H]^-$ (**fig. 40**) et 349.0887 en $[M+H+Na]^+$ (**fig. 41**) à 286 nm, ce qui correspond à l'acide coumarique hexose ($C_{15}H_{18}O_8$) (**Hanhineva et al., 2008**). Il présente une masse exacte égale à 326.09015. En effet, le spectre SM affiche un ion fragment à m/z 163.0396 [acide coumarique-H] $^-$ et à m/z 165.0543 [acide coumarique+H] $^+$, correspondant à la perte de la partie acide coumarique et la libération d'hexose.

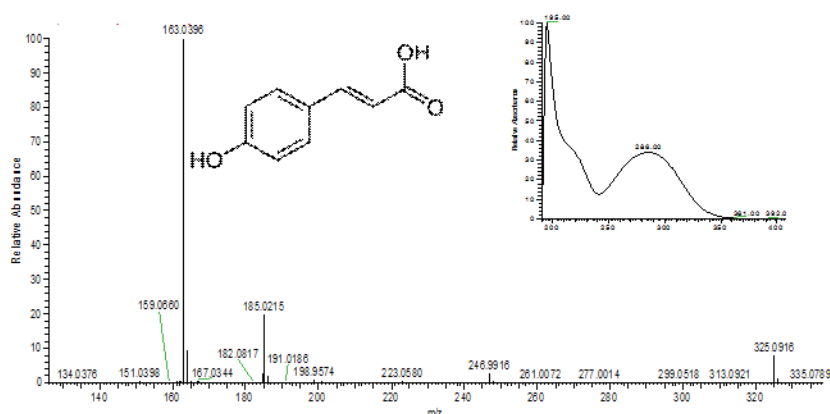


Figure 40: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'acide Coumarique hexose et de sa fragmentation

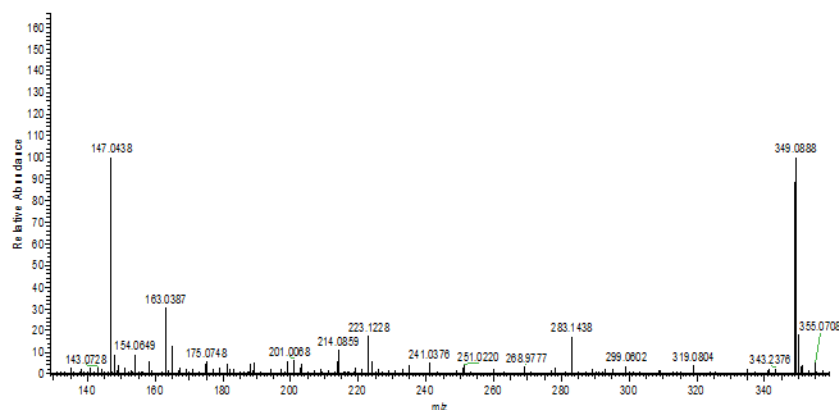


Figure 41: Spectre de masse SM en mode positif de l'acide Coumarique hexose et de sa fragmentation

b. Flavonoïdes

- Flavonols glycosylés

Le composé 8 est élué à 48.74 min et présente une masse exacte de 464.09375 qui correspond au quercétine -3-O- glucoside ($C_{21}H_{20}O_{12}$) (**Sawada et al., 2009**). Sur les spectres de masse réalisés en mode négatif et en mode positif, un ion moléculaire à m/z 463.0859 $[M-H]^-$ (**fig. 42**) et à m/z 465.1016 $[M+H]^+$ (487.0835 $[M+H+Na]^+$) (**fig. 43**), a été détecté. En effet, le spectre SM affiche un ion fragment à m/z 300.0263 [quercétine-H] $^-$ et à m/z 303.0493 [quercétine+H] $^+$ correspondant à la perte de la partie quercétine.

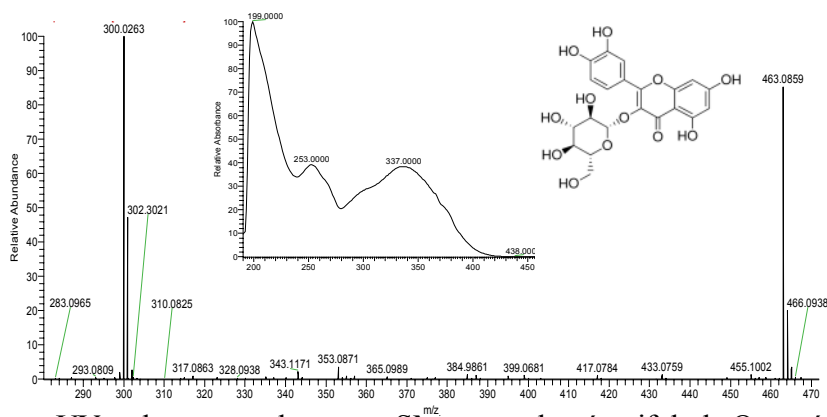


Figure 42: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Quercétine glucoside et de sa fragmentation

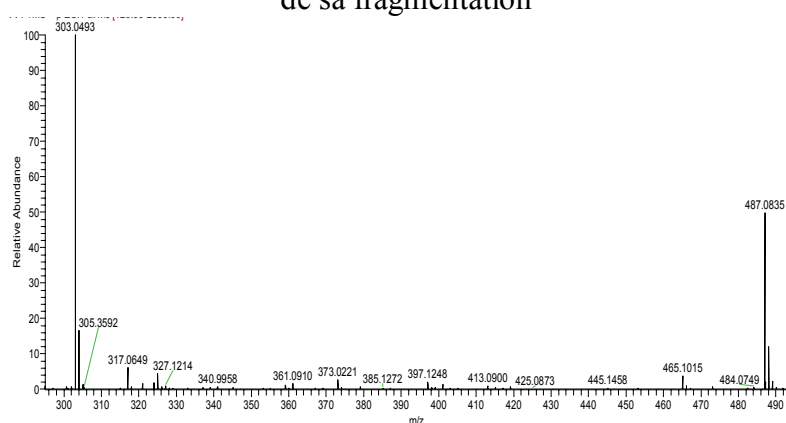


Figure 43: Spectre de masse SM en mode positif de la Quercétine glucoside et de sa fragmentation

Le pic 10 détecté à 52.61 min, correspond à la Kaempférol-3-Glucoside qui présente un m/z de 447.0909 en $[M-H]^-$ (**fig. 44**) et 449.1077 en $[M+H]^+$ ($471.0887 [M+H+Na]^+$) (**fig. 45**). Il présente une masse exacte égale à 448.0993, ce qui correspond à la formule de $C_{21}H_{20}O_{11}$ (**Sawada et al., 2009**). En effet, le spectre SM affiche un ion fragment à m/z 284.0316 $[Kaempférol-H]^-$ et à m/z 287.055 $[Kaempférol+H]^+$, correspondant à la perte d'unité hexose et la libération de la partie Kaempférol.

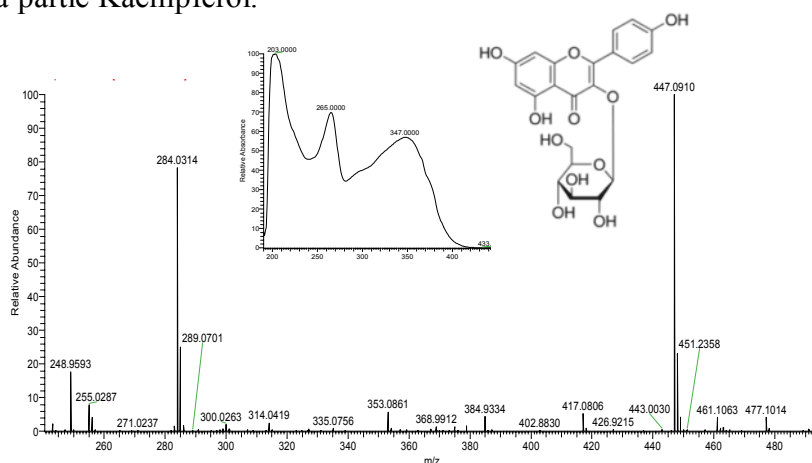


Figure 44: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Kaempférol-3-glucoside et de sa fragmentation

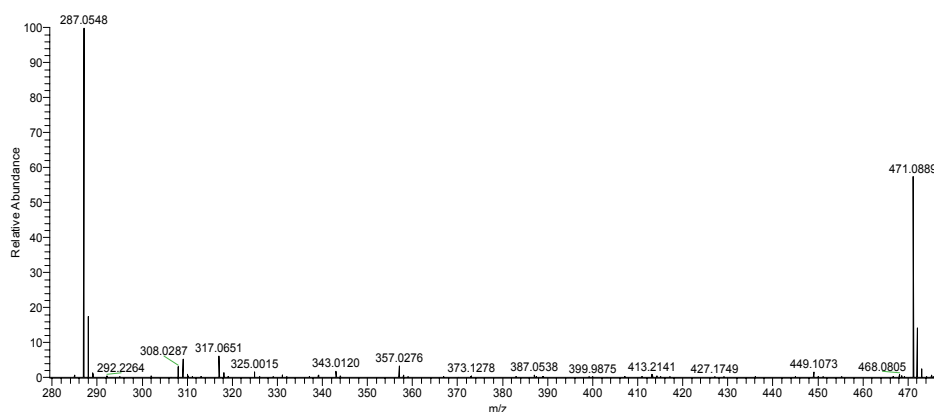


Figure 45: Spectre de masse SM en mode positif de la Kaempférol-3-glucoside et de sa fragmentation

La quercétine dihexose (pic 11) est détectée à 56.5 min avec un m/z de 625.1173 en $[M+H]^-$ (**fig. 46**) et 627.1344 en $[M+H]^+$ (**fig. 47**). Sa masse exacte est égale à 626.12585, ce qui correspond à la formule de $C_{27}H_{30}O_{17}$ (**Sawada et al., 2009**). Le spectre SM affiche un ion fragment à m/z 463.0861 [quercétine hexose-H] $^-$ correspondant à la libération de la quercétine hexose après la perte d'une unité hexose (m/z 162). Ce pic a un fragment caractéristique à m/z 301.0342 [quercétine-H] $^-$, qui confirme l'identité de la quercétine.

Le pic 12, détecté à 57.74 min présente un m/z de 947.4037 en $[M-H]^-$ et 949.4237 en $[M+H]^+$, caractéristiques de la Kaempférol 3-feruloyldiglucoside-7-glucoside. Sa masse calculée est de 948.4137 ce qui correspond à la formule de $C_{43}H_{48}O_{24}$ (**Llorach et al., 2003**). Le spectre SM affiche un ion fragment à m/z 609.1215 $[M-H]^-$ et à m/z 633 $[M+H+Na]^+$ correspondant à la perte du Kaempférol diglucoside après libération de feruloyl (m/z 176) et d'une unité d'hexose (m/z 162). Ce pic a un fragment à m/z 487.1586 $[M-H]^-$ qui indique la libération de trois hexoses. Le fragment à m/z 285.0391 [Kaempférol -H] $^-$, à m/z 287.0546 [Kaempférol +H] $^+$ et à m/z 511 [Kaempférol +H+Na] $^+$, confirme l'identité de la Kaempférol.

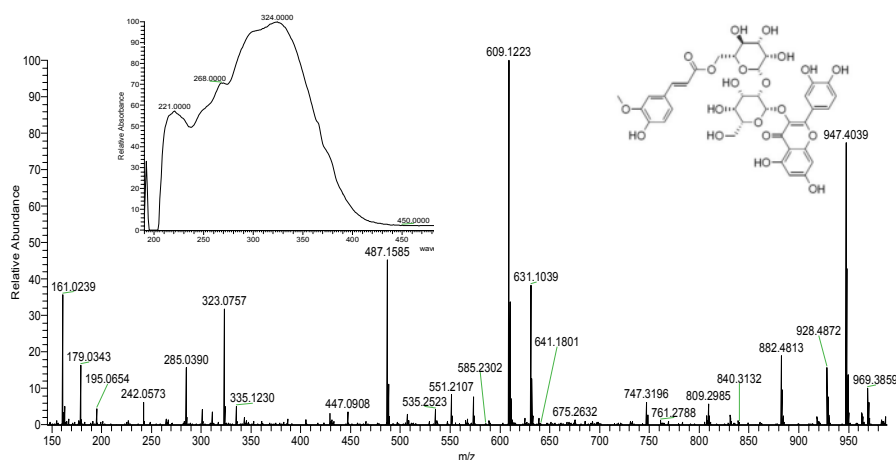


Figure 46: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Kaempférol 3-feruloyldiglucoside-7-glucoside et de sa fragmentation

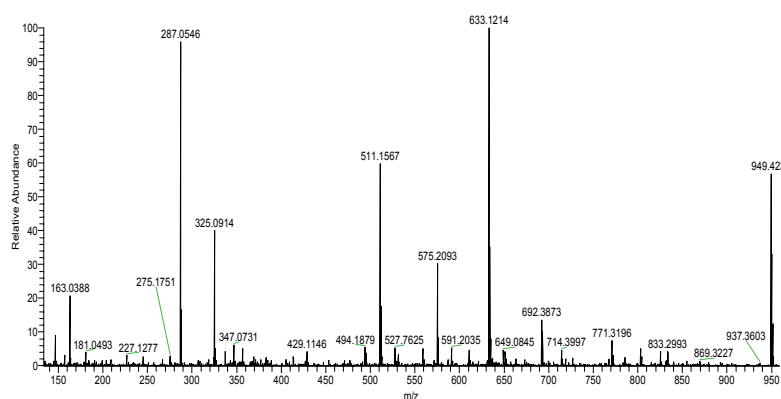


Figure 47: Spectre de masse SM en mode positif de Kaempférol 3-feruloyldiglycoside-7-glucoside et de sa fragmentation

La Kaempférol dihexose glucuronide, correspondante au pic 13, est détectée à 59.47 min et présente un m/z de 785.3516 en $[M-H]^-$ (**fig. 48**) et 787.3707 en $[M+H]^+$ (**fig. 49**). Sa masse calculée est de 786.36115 ce qui correspond à la formule de $C_{33}H_{38}O_{22}$ (**Hanhineva et al., 2008**). Ce pic a un fragment à m/z 285.0754 $[Kaempférol -H]^-$ et à m/z 287.3707 $[Kaempférol +H]^+$, qui confirme l'identité de la Kaempférol et la libération de glucuronide (m/z 176.0321) et de deux unités hexose (m/z 162).

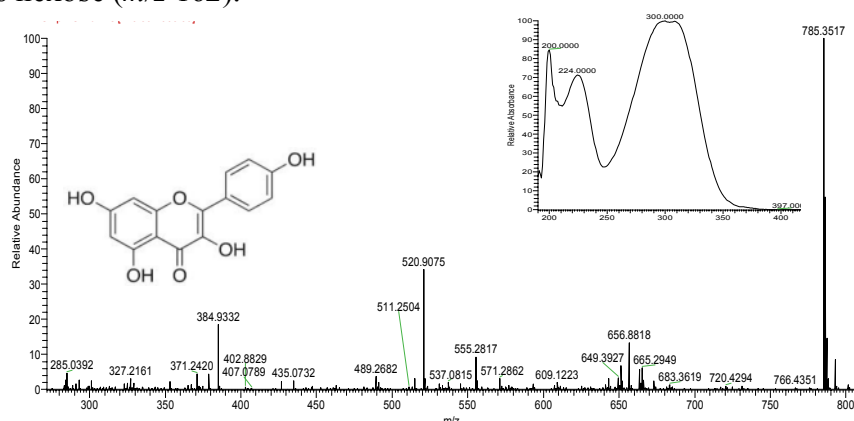


Figure 48: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Kaempférol dihexose glucuronide et de sa fragmentation.

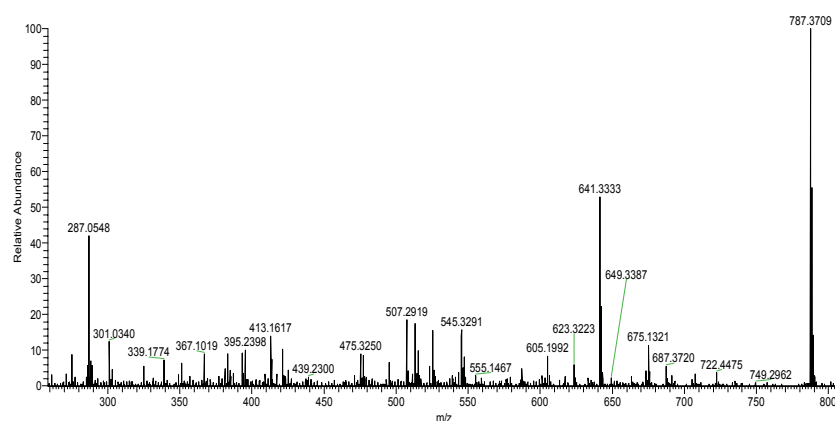


Figure 49: Spectre de masse SM en mode positif de Kaempférol dihexose glucuronide et de sa fragmentation

- Biflavones

Le pic 14 est élué à 64.66 min et présente un m/z de 537.0812 en $[M-H]^-$ (**fig. 50**) et 539.0973 en $[M+H]^+$ (**fig. 51**). Sa masse exacte est de 538.09 ce qui correspond à la formule de $C_{30}H_{26}O_{10}$ caractéristique d'Amentoflavone (**Sánchez-Rabaneda et al., 2003**). Sur le spectre de masse réalisé en mode négatif, un ion moléculaire à m/z 375.0812 $[M-H]^-$ a été détecté, correspondant à la perte des cycles A et B.

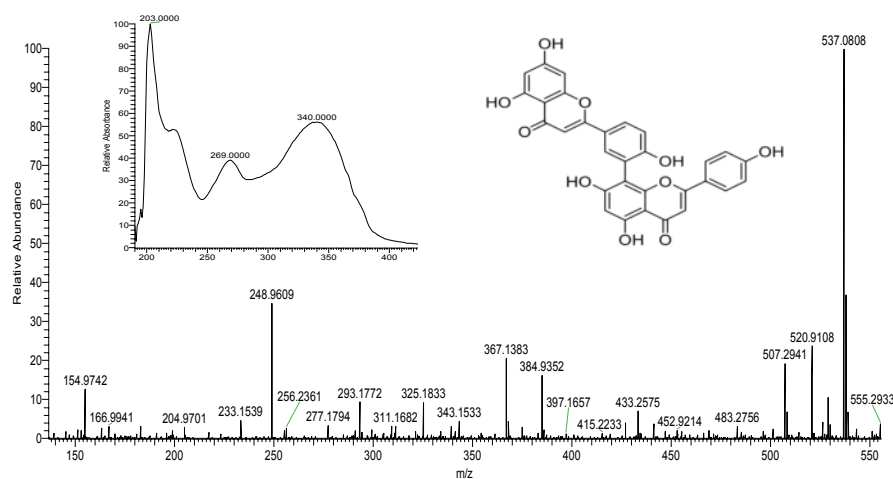


Figure 50: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'Amentoflavone et de sa fragmentation

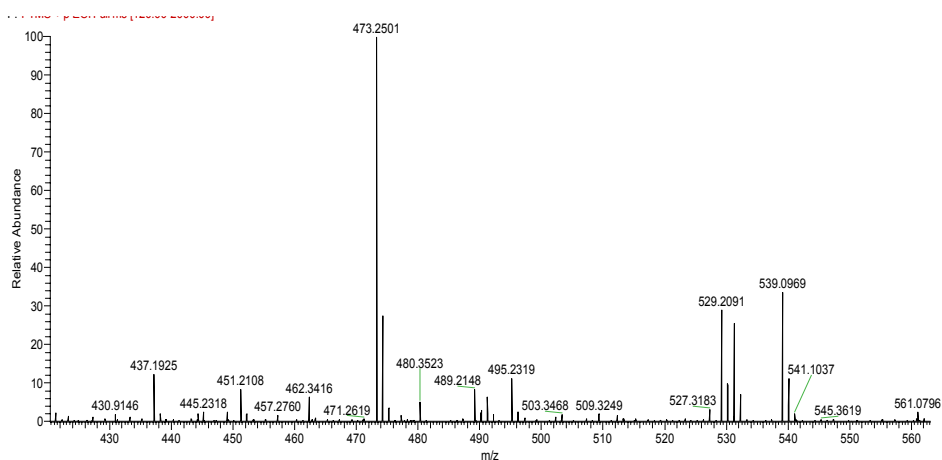


Figure 51: Spectre de masse SM en mode positif de l'Amentoflavone et de sa fragmentation

II.1.2. Identification des composés phénoliques dans l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*

Les composés phénoliques, détectés dans l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, sont des esters d'acide hydroxycinnamique (**fig. 52**). Le **tableau 21** résume les UV, la masse et les caractéristiques de la fragmentation SM/SM des pics chromatographiques ainsi que la formule chimique de chaque composé identifié.

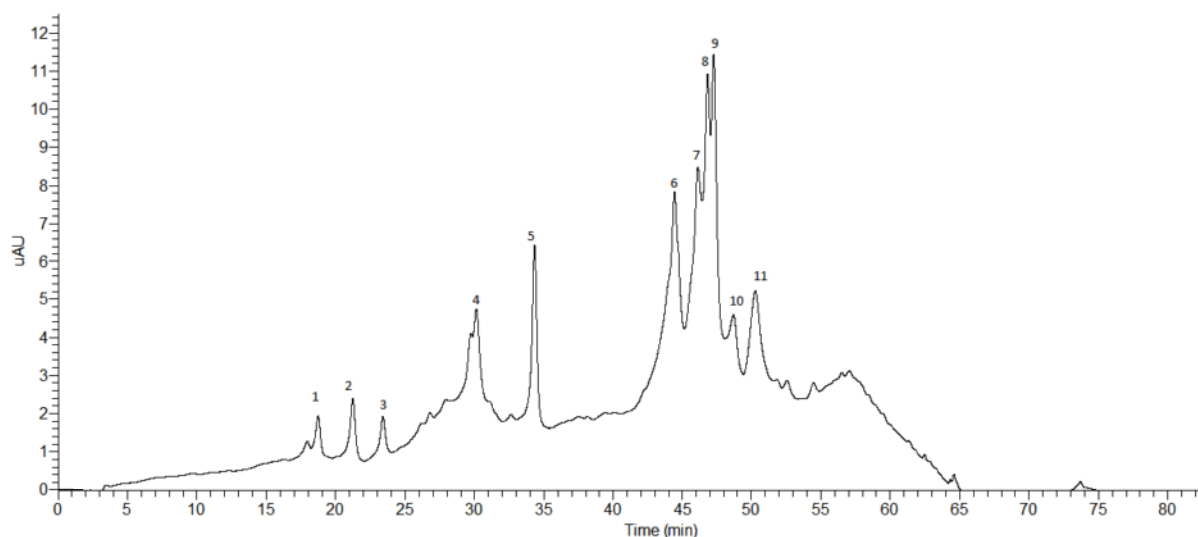


Figure 52: Chromatogramme CLHP de l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif

Tableau 21: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SMⁿ dans l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*

Pic	Tr	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	SM/SM [M-H] ⁻	[M+H] ⁺	SM/SM [M+H] ⁺	Masse exacte	Formule	Molécule	Références
1	18.73	244, 300, 327	353.0858	191.0553 179.0343 173.0451	355.1025	163.039	354.09415	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
2	21.23	235, 300, 323	353.0858	191.0553 179.0343 173.0451 135.0445	355.1025	163.039	354.09415	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
3	23.39	243, 300, 328	439.0861	395.0966 417.0783 233.0656 191.0555 173.0451 179.0345	441.1017 463.0839 (+Na)	163.0388	440.0939	C ₁₉ H ₂₀ O ₁₂	Isomère d'acide Malonyl Caféoylquinique	Zhang et al., 2007
4	30.12	240, 310, 326	353.0857	191.0552 179.0343 173.045	355.1022	163.039	354.09395	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
5	34.31	241, 300, 321	515.1167	353.0857 335.0755 191.0552 179.0342	517.1337 539.1156 (+ Na)	163.0389	516.1252	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	
6	44.28	300ep, 330	601.0924	579.1098 557.1277 395.0966 377.0859 233.0654	603.1341 625.1186 (+Na)	423.0916 163.0388	602.11325	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₈	Isomère d'acide Malonyl di-Caféoylquinique	Zhang et al., 2007
7	46.15	241, 300, 327	515.1169	353.0856 335.0756 191.0552 179.0342 135.0448	517.1334 539.1156 (+ Na)	163.0389	516.12515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
8	46.85	241, 300, 327	515.1169	353.0856 335.0756 191.0552 179.0342 135.0448	517.1334 539.1156 (+ Na)	163.0389	516.12515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	

9	47.29	300ep, 330	601.0924	579.1098 557.1277 395.0966 377.0859 233.0654	603.1341 625.1186 (+Na)	423.0916 163.0388	602.11325	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₈	Isomère d'acide Malonyl di-Caféoylquinique	Zhang et al., 2007
10	48.71	251, 300, 331	601.0924	579.1098 557.1277 395.0966 377.0859 233.0654	603.1341 625.1186 (+Na)	423.0916 163.0388	602.11325	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₈	Isomère d'acide Malonyl di-Caféoylquinique	
11	50.29	241, 300, 327	515.1169	353.0856 335.0756 191.0552 179.0342 135.0448	517.1334 539.1156 (+ Na)	163.0389	516.12515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009

a. Dérivés d'acide hydroxycinnamique

- Esters d'acide hydroxycinnamique

Les composés 1, 2 et 4 sont élués à 18.73, 21.23 et 30.12 min et présentent tous les trois un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 353.0858 et 355.1025. Leur masse exacte calculée est de 354.09415 ce qui correspond à la formule de $C_{16}H_{18}O_9$ caractéristique aux isomères d'acide Caféoylquinique (Ferracane et al., 2008; Alonso-Salces et al., 2009). Les fragments à m/z 179.0343, 173.0451, 191.0553 en mode négatif et à m/z 163.0389 en mode positif, sur le spectre SM indiquent le composé présent.

Le composé 3 est élué à 23.39 min et présente un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 439.0861 (fig. 53) et 441.1017 ($463.0839 [M+H+Na]^+$) (fig. 54). Sa masse exacte est de 440.0939 ce qui correspond à la formule de $C_{19}H_{20}O_{12}$ caractéristique de l'acide Malonyl Caféoylquinique (Zhang et al., 2007). La perte de 86 Da et de 44 Da indique la présence d'une malonyl dans la molécule. Donc, le fragment à m/z 395 est caractéristique de la perte du malonyl $[M-H-44]^-$. Les fragments à m/z 179.0345, 173.0451, 191.0555 en mode négatif et à m/z 163.0388 en mode positif correspondent à la perte d'une unité de caféoyl et la libération de l'acide quinique.

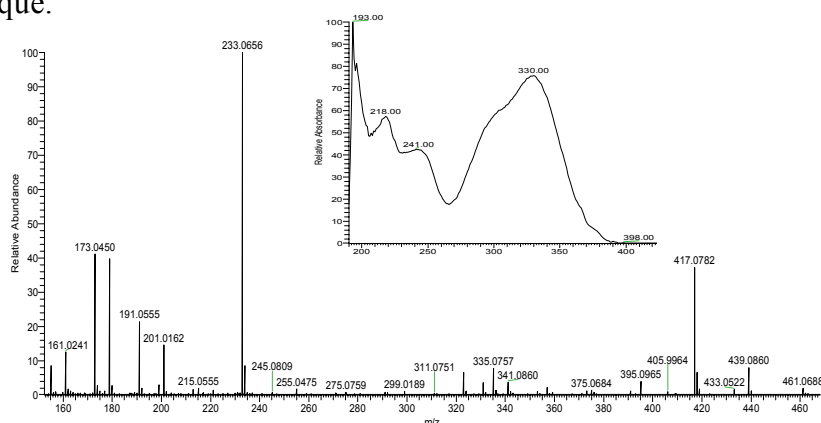


Figure 53: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide Malonyl-caféoylquinique et de sa fragmentation

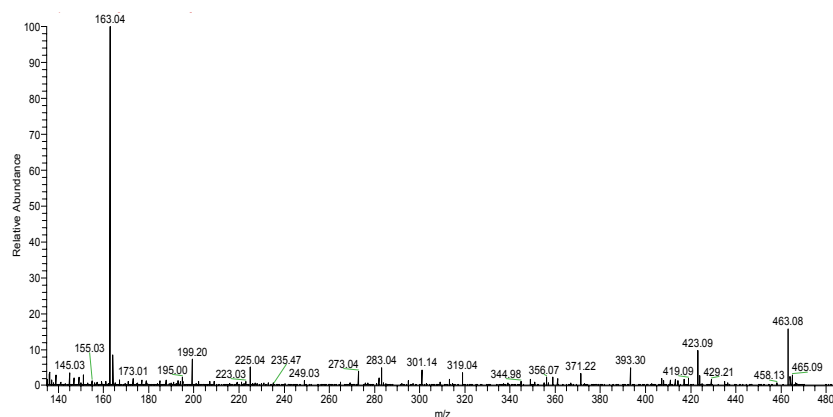


Figure 54: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide Malonyl-caféoylquinique et de sa fragmentation

Les composés 5, 7, 8 et 11 sont élués à 34.31, 46.15, 46.85 et 50.29 min et présentent tous les quatre un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 515 et 517 ($539.1156 [M+H+Na]^+$). Leur masse exacte est de 516.12515 ce qui correspond à la formule de $C_{25}H_{24}O_{12}$ caractéristique aux isomères d'acide di-*O*-Caféoylquinique (**Ferracane et al., 2008 ; Alonso-Salces et al., 2009**). Les fragments à m/z 353.086, 191.0552, 179.0344 en mode négatif et à m/z 163.0389 en mode positif, sur le spectre SM indiquent le composé présent.

Les composés 6 (tr = 44.28 min), 9 (tr = 47.29 min) et 10 (tr = 48.71 min) présentent un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 601.0924 (**fig. 55**) et 603.1341 ($625.1186 [M+H+Na]^+$) (**fig. 56**). Leur masse exacte est de 602.11325 ce qui correspond à la formule de $C_{24}H_{26}O_{18}$ caractéristique l'acide Malonyl di-caféoylquinique (**Zhang et al., 2007**). Ce composé a donné des fragments caractéristiques de malonyl à m/z 557 $[M-H-44]^-$ et à m/z 395 $[M-H-206]^-$ dont la masse m/z 206 correspond à la perte d'une unité caféoyl (m/z 162) et d'une partie du malonyl (m/z 44).

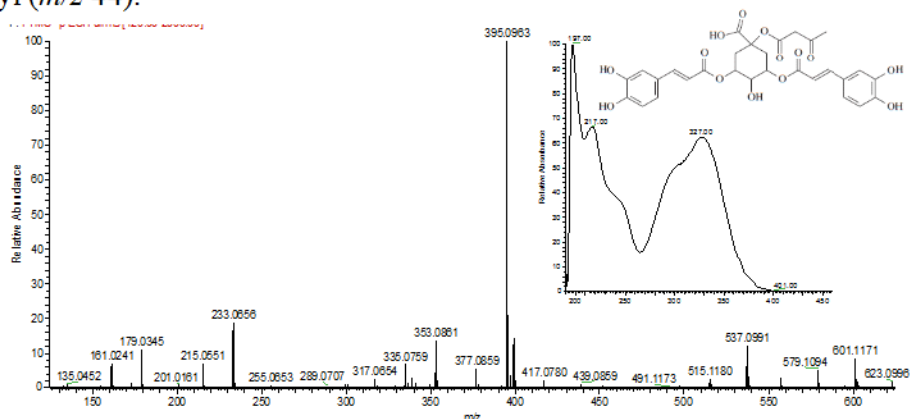


Figure 55: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'isomère d'acide Malonyl-di caféoylquinique et de sa fragmentation

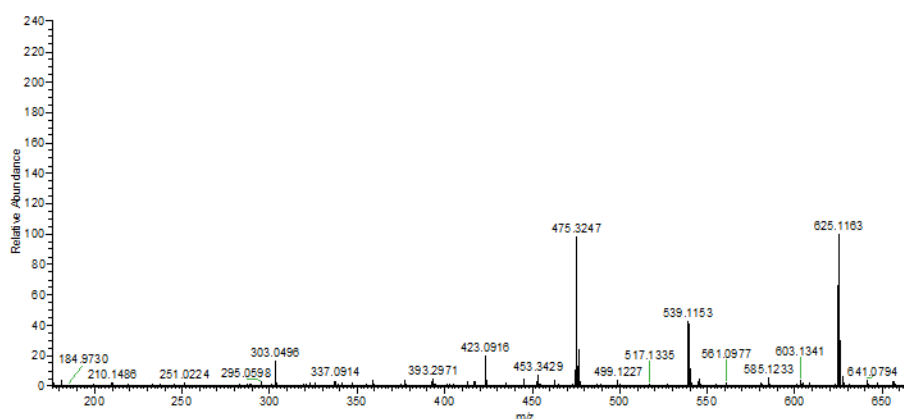


Figure 56: Spectre de masse SM en mode positif de l'isomère d'acide Malonyl-di caféoylquinique et de sa fragmentation

II.1.3. Identification des composés phénoliques dans l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*

Les composés phénoliques, détectés dans l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, sont des dérivés d'acide hydroxycinnamique (un dérivé d'acide caféique et des esters d'acide hydroxycinnamique) et des flavonoïdes (flavonols glycosylés) (**fig. 57**). Le **tableau 22** résume les UV, la masse et les caractéristiques de la fragmentation SM/SM des pics chromatographiques ainsi que la formule chimique et la structure proposée de chaque composé identifié.

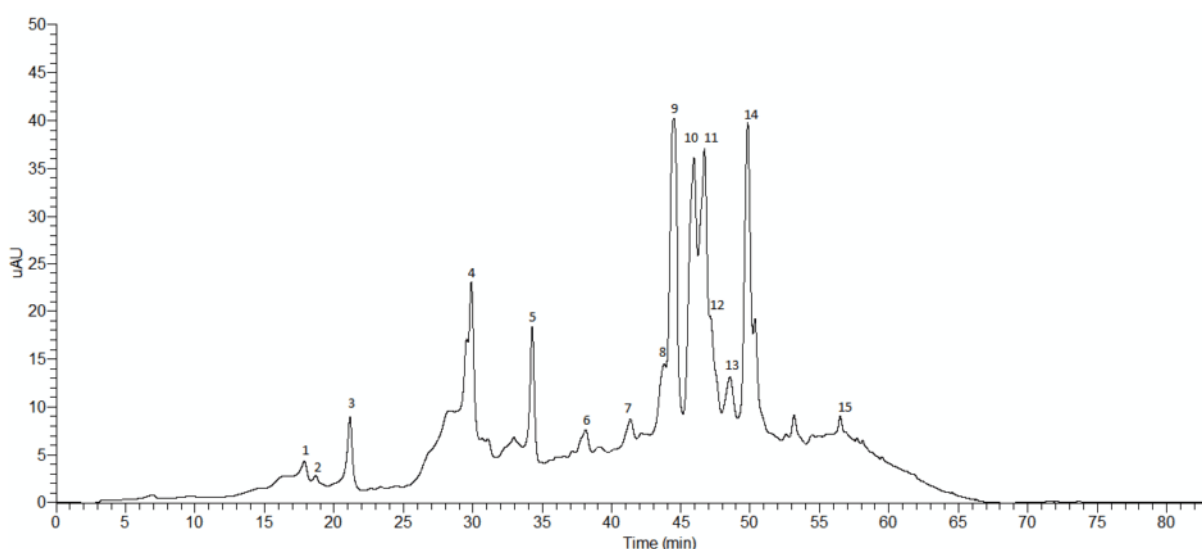


Figure 57: Chromatogramme CLHP de l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif

Tableau 22: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SMⁿ dans l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*

Pic	Tr	λ_{\max} (nm)	[M-H]-	SM/SM [M-H]-	[M+H] ⁺	SM/SM [M+H] ⁺	Masse exacte	Formule	Molécule	Références
1	17.85	259,294	353.0777	191.0521 179.0321 172.9578 135.0435	355.0761	163.0379	354.1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
2	18.67	233, 300, 324	353.0858	191.0553 179.0343 173.0451	355.1025	163.039	354.09415	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
3	21.14	233, 300, 324	353.0858	191.0553 179.0343 173.0451 135.0445	355.1025	163.039	354.09415	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
4	29.92	240, 310, 326	353.0857	191.0552	355.1022	163.039	354.09395	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
5	34.26	241, 300, 321	515.1167	353.0857 335.0755 191.0552	517.1337 539.1156 (+Na)	163.0389	516.1252	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	
6	38.1	225, 308	683.1424	341.1373					Dimère d'acide caféique -O-hexoside	Shakya et al., 2006
7	41.33	259, 352	479.0802	317.028	481.0967	319.0443	480.08845	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	Hexahydroxyflavone hexose	Schliemann et al., 2006
8	43.73	304, 332	677.1686	515.1396 353.0857 335.0754	679.1912 701.1688 (+Na)		678.1799	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₇	Acide di- Caféoylquinique glycoside	
9	44.48	300ep, 330	601.0924	579.1098 557.1277 395.0966 377.0859 233.0654	603.1341 625.1186 (+Na)	423.0916 163.0388	602.11325	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₈	Isomère d'acide Malonyl di-Caféoylquinique	Zhang et al., 2007
10	45.99	241, 300, 327	515.1169	353.0856 335.0756 191.0552 179.0342 135.0448	517.1334 539.1156 (+Na)	163.0389	516.12515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009

11	46.74	240, 305, 332	515.1169	353.0856 335.0756 191.0552 179.0342 135.0448	517.1334 539.1156 (+ Na)	163.0389	516.12515	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	
12	47.16	300ep, 330	601.0924	579.1098 557.1277 395.0966 377.0859 233.0654	603.1341 625.1186 (+Na)	423.0916 163.0388	602.11325	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₈	Isomère d'acide Malonyl di-Caféoylquinique	
13	48.55	300ep, 330	601.0924	579.1098 557.1277 395.0966 377.0859 233.0654	603.1341 625.1186 (+Na)	423.0916 163.0388	602.11325	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₈	Isomère d'acide Malonyl di-Caféoylquinique	Zhang et al., 2007
14	49.87	243, 300, 328	515.1167	353.0857 335.0757 191.0553 179.0342 173.0449	517.1332	163.0387	516.12495	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
15	56.52	268, 315	609.1217	300.026	611.1394	303.0495	610.13055	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutine	Hanhineva al., 2008

a. Dérivés d'acide hydroxycinnamique

- Esters d'acide hydroxycinnamique

Les composés 1, 2, 3 et 4 sont élués à 17.85, 18.67, 21.14 et 29.92 min et présentent tous les quatre un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 353.0858 et 355.1025. Leur masse exacte est de 354.09415 ce qui correspond à la formule de $C_{16}H_{18}O_9$ caractéristique aux isomères d'acide Caféoylquinique (**Ferracane et al., 2008; Alonso-Salces et al., 2009**). Les fragments à m/z 179.0343, 173.0451, 191.0553 en mode négatif et à m/z 163.0389 en mode positif, sur le spectre SM indiquent le composé présent.

Les composés 5, 10, 11 et 14 sont élués à 34.26, 45.99, 46.74 et 49.87 min et présentent tous les quatre un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 515.1173 et 517.1327 (539.1156 $[M+H+Na]^+$). Leur masse exacte est de 516.1252 ce qui correspond à la formule de $C_{25}H_{24}O_{12}$ caractéristique aux isomères d'acide di-*O*-Caféoylquinique (**Ferracane et al., 2008 ; Alonso-Salces et al., 2009**). Les fragments à m/z 353.086, 191.0552, 173.0449, 179.0344 en mode négatif et à m/z 163.0389 en mode positif, sur le spectre SM indiquent le composé présent.

Le pic 8 détecté à 43.73 min, correspond à l'acide di-caféoylquinique glycoside qui présente un m/z de 677.1686 en $[M-H]^-$ et un m/z 679.1912 en $[M+H]^+$ (701.1688 $[M+H+Na]^+$). Il présente une masse exacte égale à 678.1799, ce qui correspond à la formule de $C_{31}H_{34}O_{17}$ (**Zhang et al., 2007**). Le fragment à m/z 515 $[M-H-hexose]^-$ indique la libération de l'acide di-caféoylquinique. Le fragment à m/z 353.086 $[M-H-Caféoyl]^-$ indique la libération de l'acide mono-caféoylquinique, après la perte d'une unité de caféoyl. Les fragments à m/z 335 $[M-H-2Caféoyl]^-$, indique la libération de l'acide quinique et la partie hexose après la perte de deux unités caféoyl.

Les composés 9, 12 et 13 détectés à 44.48, 47.16 et 48.55 min, présentent un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 601.0924 et 603.1341 (625.1186 $[M+H+Na]^+$). Leur masse exacte est de 602.11325 ce qui correspond à la formule de $C_{24}H_{26}O_{18}$ caractéristique l'acide Malonyl di-caféoylquinique (**Zhang et al., 2007**). Les fragments à m/z 557 et 395 en mode négatif et à m/z 163.0389 en mode positif, sur le spectre SM indiquent le composé présent.

- Dérivé d'acide caféique

Le composé 6 (tr = 38.1 min) est un dimère de l'acide caféique-*O*-hexoside. Il présente un m/z de 683.1424 $[M-H]^-$ et le fragment à m/z 341 $[caféoyl\ glucose-H]^-$ est caractéristique du caféoyl-D-glucose (**fig. 58**) (**Shakya et al., 2006**).

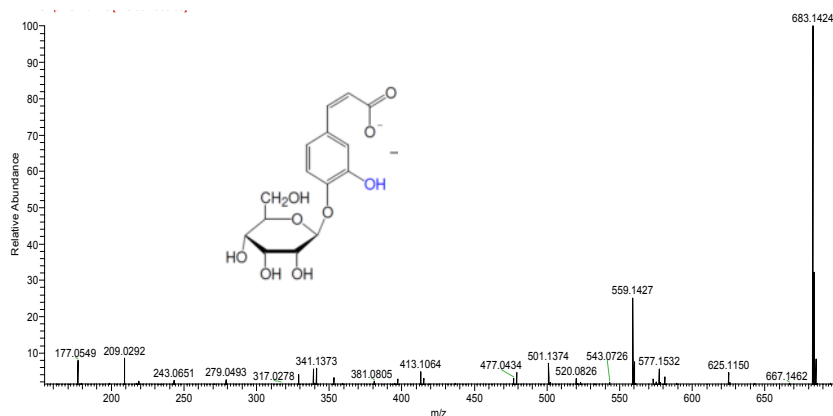


Figure 58: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif d'un dimère de l'Acide caféique -O-hexoside et de sa fragmentation

b. Flavonoïdes

- Flavonols glycosylés

Le pic 7 est détecté à 41.33 min. Ce composé a une masse exacte de 480.08845 ce qui correspond à la formule $C_{21}H_{20}O_{13}$. Il présente un m/z de 479 en $[M+H]^-$ (**fig. 59**) et un m/z de 481.0967 en $[M+H]^+$ (**fig. 60**) et se dissocie pour donner un ion à m/z 317 $[M-H]^-$, ce qui signifie la perte d'une unité de glucose ou de galactose (m/z 162). Ce fragment indique qu'il s'agit d'un hexahydroxyflavone: la myricétine (3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavone), la quercétagétine (3,3',4',5,6,7-hexahydroxyflavone) ou la gossypétine (3,3',4',5,7,8-hexahydroxyflavone) (**Schliemann et al., 2006**). Par conséquent, ce composé est probablement l'un des trois composés mentionnés ci-dessus, avec un groupe glucoside (ou galactoside). La validation de cette structure requiert une confirmation avec des méthodes d'analyse complémentaire comme la résonance magnétique nucléaire (RMN). Cependant, il est possible qu'il soit un Gossypetin-8-glucoside (Gossypin) car il s'agit d'un pigment jaune des fleurs de certaines plantes : *Gossypium sp.* (Malvacées), *Lotus corniculatus* L. (Leguminosées), *Papaver nudicaule* L. (Papaveracées), *Primula sp.* (Primulacées), *Chrysanthemum segetum* L. P (ray) (Asteracées) et *Rhododendron campylocarpum* Hook. f. (Ericacées) et qui doit sa couleur à la présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire en position 8 du cycle aromatique A.

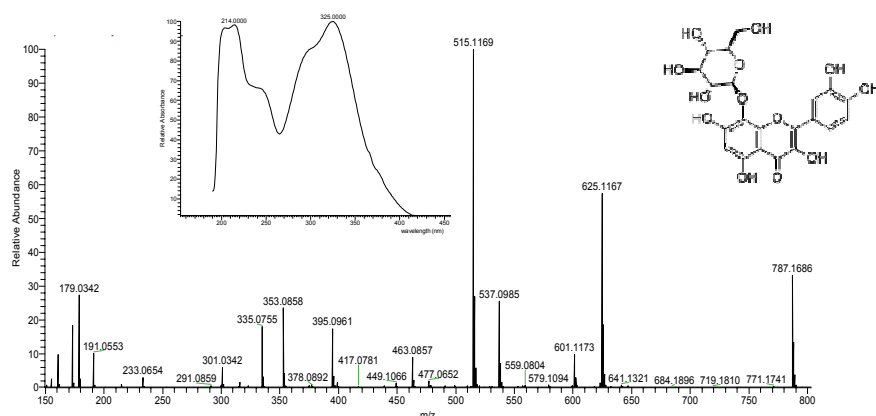


Figure 59: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif d'un Hexahydroxyflavone glycosylé et de sa fragmentation

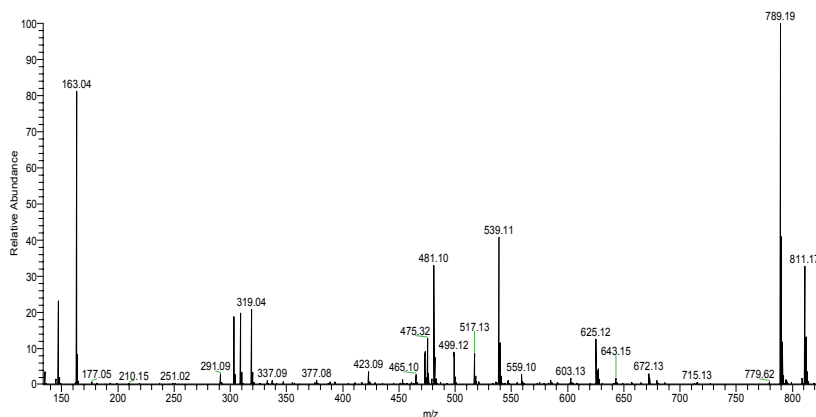


Figure 60: Spectre de masse SM en mode positif d'un Hexahydroxyflavone glycosylé et de sa fragmentation

Le pic 15 détecté à 56.52 min présente un m/z de 609.1217 en $[M-H]^-$ (**fig. 61**) et 611.1394 en $[M+H]^+$ (**fig. 62**), caractéristiques de la rutine (quercétine-3-*O*-rutinoside). Sa masse exacte est de 610.13055, ce qui correspond à la formule $C_{27}H_{30}O_{16}$ (**Hanhineva al., 2008**). Sur les spectres de masse réalisés en deux modes, nous observons un ion moléculaire à m/z 300.026 $[quercétine - H]^-$ et à m/z 303 $[quercétine + H]^+$ correspondant à la perte de la quercétine.

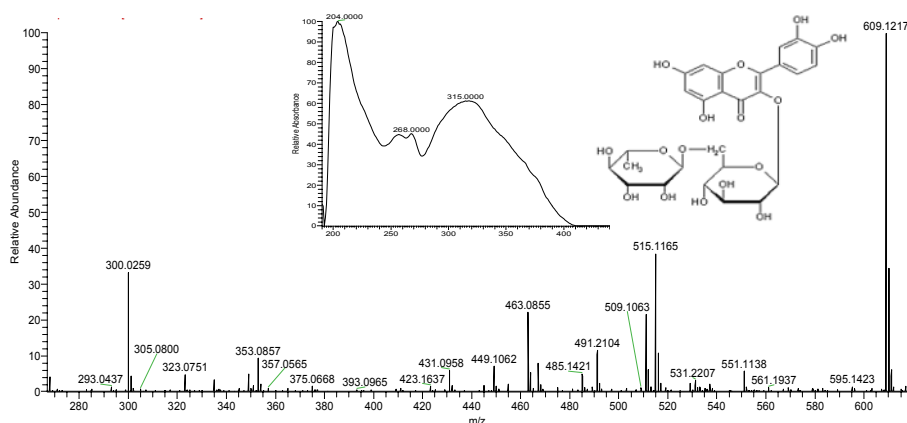


Figure 61: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de la Rutine et de sa fragmentation

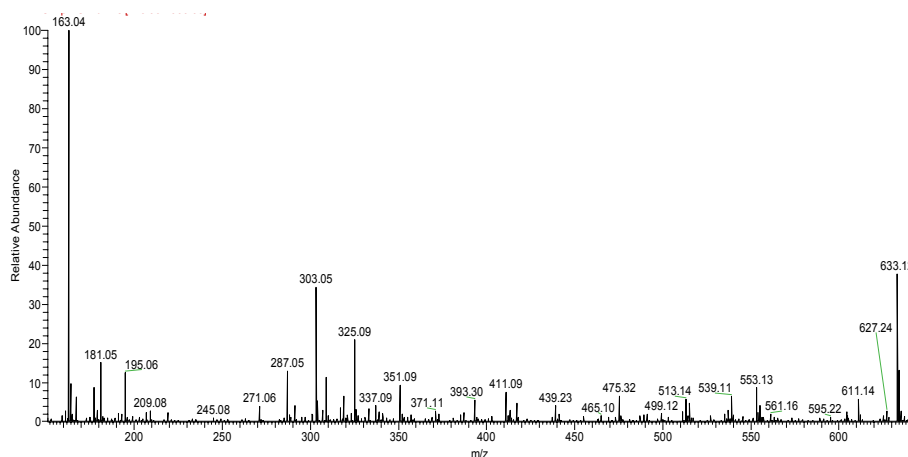


Figure 62: Spectre de masse SM en mode positif de la Rutine et de sa fragmentation

II.1.4. Identification des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

Les composés phénoliques, détectés dans l'extrait méthanolique de *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, sont des esters d'acide hydroxycinnamique et des flavonoïdes (flavonols glycosylés, flavonols aglycones et des flavones) (**fig. 63**). Le **tableau 23**, résume les UV, la masse et les caractéristiques de la fragmentation SM/SM des pics chromatographiques ainsi que la formule chimique et la structure proposée de chaque composé identifié.

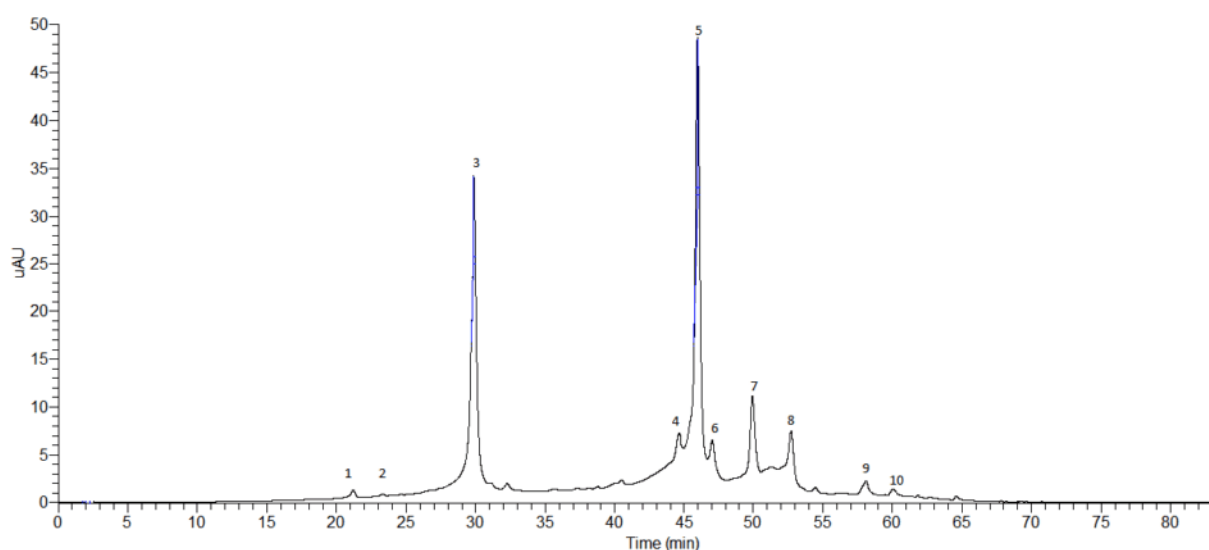


Figure 63: Chromatogramme CLHP de l'extrait méthanolique de *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 300$ nm en mode négatif

Tableau 23: Les composés phénoliques identifiés par CLHP Orbitrap-SMⁿ dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées de *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*

Pic	Tr	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	SM/SM [M-H] ⁻	[M+H] ⁺	SM/SM [M+H] ⁺	Masse exacte	Formule	Molécule	Références
1	21.19	239, 300, 324	353.0864	191.0555 179.0345 135.045	377.0835 (+Na ⁺)	163.0386	354.08495	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
2	23.3	239, 300, 324	353.0864	191.0555 179.0345 135.045	377.0835 (+Na ⁺)	163.0386	354.08495	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
3	29.85	239, 300, 326	353.0864	191.0555 179.0345 135.045	377.0835 (+Na ⁺)	163.0386	354.08495	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Isomère d'acide Caféoylquinique	
4	44.61	217, 241, 325	515.1173	353.0863 335.076 191.0555 179.0345 173.0452	517.1327	499.1223 163.0387	516.125	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
5	46	241, 300, 328	515.1171	353.0861 191.0555 179.0344 135.0449	517.1327	499.1223 163.0387	516.1249	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	
6	47.06	255, 350	447.0906	285.0385	449.1068	287.0547	448.1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Kaempférol-3-Glucoside	Sawada et al., 2009
7	49.94	242, 300, 327	515.1173	353.0863 191.0555 179.0344 173.0452 135.045	517.1332	499.1226 163.0388	516.12525	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Isomère d'acide di-Caféoylquinique	Ferracane et al., 2008 Alonso-Salces et al., 2009
8	52.72	268, 305, 338	447.0909	285.039	449.106	287.0539	448.1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Kaempférol-3-Glucoside	Sawada et al., 2009
9	58.11	254, 350	285.0385	133.0293 151.0033	287.0545	135.0437 153.0178	286.05	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempférol	Sánchez-Rabaneda et al., 2003
10	60.02	267, 342	269.0444	151.0033	271.0595	153.0178	270.05	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigénine	

a. Dérivés d'acide hydroxycinnamique**- Esters d'acide hydroxycinnamique**

Les composés 1, 2 et 3 sont élués à 21.19, 23.3 et 29.85 min et présentent tous les trois un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H+Na]^+$, respectifs de 353.0858 et 377. Leur masse exacte calculée est de 354.09415 ce qui correspond à la formule de $C_{16}H_{18}O_9$ caractéristique aux isomères d'acide Caféoylquinique (**Ferracane et al., 2008 ; Alonso-Salces et al., 2009**). Les fragments à m/z 179.0343 et 191.0553 en mode négatif et à m/z 163.0389 en mode positif, sur le spectre SM indiquent le composé présent.

Les composés 4, 5 et 7 sont élués à 44.61, 46 et 49.94 min et présentent tous les trois un m/z en $[M-H]^-$ et un m/z en $[M+H]^+$, respectifs de 515.1173 et 517.1327. Leur masse exacte est de 516.1252 ce qui correspond à la formule de $C_{25}H_{24}O_{12}$ caractéristique aux isomères d'acide di-*O*-Caféoylquinique (**Ferracane et al., 2008 ; Alonso-Salces et al., 2009**). Les fragments à m/z 353.086, 191.0552, 173.0449, 179.0344 en mode négatif et à m/z 163.0389 en mode positif, sur le spectre SM indiquent le composé présent.

b. Flavonoïdes**- Flavonols glycosylés**

Les pics 6 et 8 détectés à 47.06 et 52.72 min, correspondent à la Kaempférol-3-Glucoside qui présentent un m/z de 447.0909 en $[M-H]^-$ et 449.1077 en $[M+H]^+$ (471.0887 $[M+H+Na]^+$). Ils présente une masse exacte égale à 448.0993, ce qui correspond à la formule de $C_{21}H_{20}O_{11}$ (**Sawada et al., 2009**). En effet, le spectre SM affiche un ion fragment à m/z 285 $[Kaempférol-H]^-$ et à m/z 287.055 $[Kaempférol+H]^+$, correspondant à la perte d'unité hexose et la libération de la partie Kaempférol.

- Flavonols aglycones

Le pic 9 détecté à 58.11 min, correspond à la Kaempférol et présente un m/z de 285.0385 en $[M-H]^-$ et un m/z 287.0545 en $[M+H]^+$. Sa masse exacte est égale à 286.05, ce qui correspond à la formule de $C_{15}H_{10}O_6$ (**Sánchez-Rabaneda et al., 2003**). Le fragment à m/z 151.0033 ($^{1,3}A^-$) et m/z 133.0293 ($^{1,3}B^-$) en mode négatif et à m/z 153.0178 et m/z 135.0437 en mode positif, correspondent à des fragmentations de type Rétro Diels- Alder (RDA) des flavonols aglycones (**fig. 64**) (**Fabre et al., 2001**).

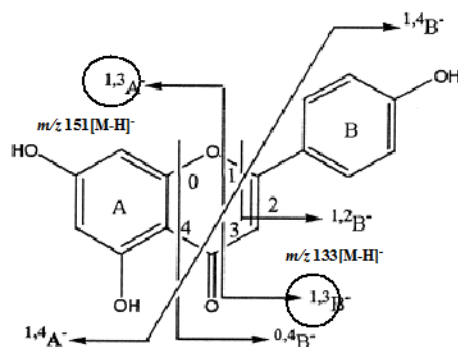


Figure 64: Nomenclature adoptée pour les différentes rétro-cyclisations
- Flavones

Le pic 10 détecté à 60.02 min, correspondent à l'Apigénine qui présente un m/z de 269.0444 en $[M-H]^-$ (**fig. 65**) et un m/z 271.0595 en $[M+H]^+$ (**fig. 66**). Elle présente une masse exacte égale à 270.05, ce qui correspond à la formule de $C_{15}H_{10}O_5$ (Sánchez-Rabaneda et al., 2003). Le fragment à m/z 151.0033 ($^{1,3}A^-$) en mode négatif et à m/z 153.0178 en mode positif, correspond à une fragmentation de type Rétro Diels- Alder (RDA) des flavonols aglycones (**fig. 64**).

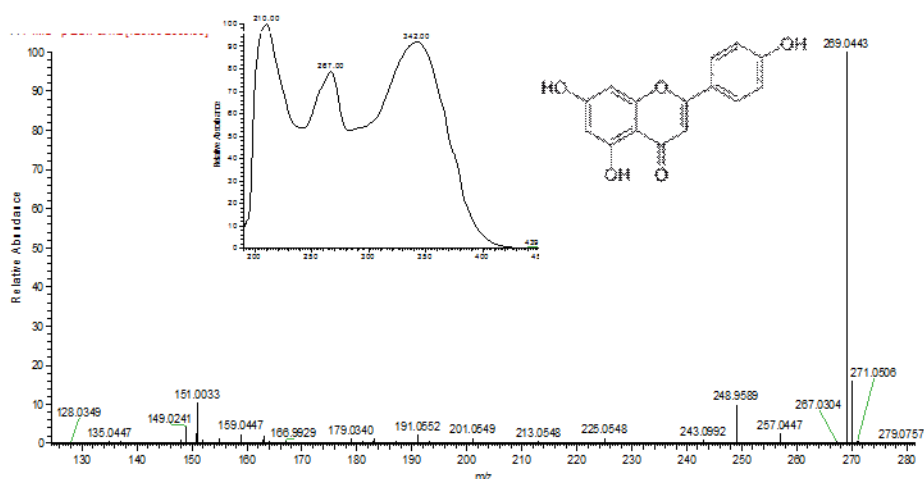


Figure 65: Spectre UV et le spectre de masse SM en mode négatif de l'Apigénine et de sa fragmentation

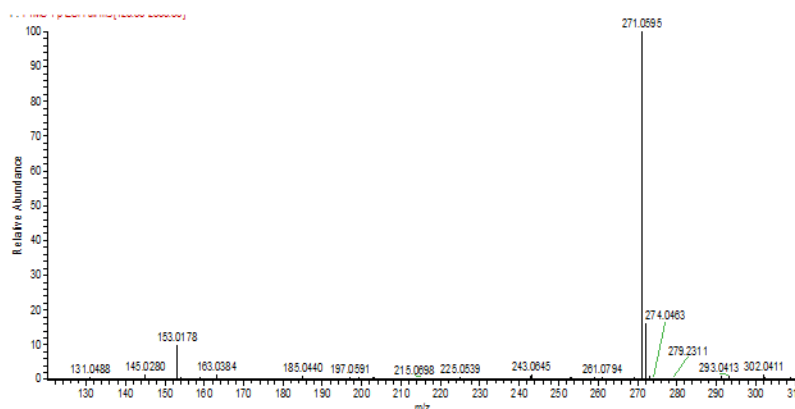


Figure 66: Spectre de masse SM en mode positif de l'Apigénine et de sa fragmentation

II.2. Analyse par CG-SM des huiles essentielles des espèces de *Ruta*

Les huiles essentielles de *R. chalepensis* var. *bracteosa*, *R. graveolens*, *R. angustifolia* et *R. tuberculata*, ont été analysées par CG-SM. Leur composition chimique ainsi que les temps de rétention des composés sont représentés dans les **tableaux 24** et **25**. Les résultats de ces analyses ont donné lieu à la rédaction d'une publication internationale présentée dans la partie «Valorisation des travaux de recherche».

Un total de 16 composés a été identifié dans l'huile essentielle de *R. chalepensis* var. *bracteosa* (**fig. 67**), ce qui représente 97.65% de l'huile extraite. Le 2-Nonanone et le 2-Undécane sont respectivement les plus dominants à 32.79 et 32.58%, suivis par le 1-Nonène à 13.95% et l' α -limonène à 5.27% (**tab. 24**).

Pour *R. angustifolia*, 6 composés, ce qui représente 96.47% de l'huile essentielle, ont été identifiés avec une domination du 2-Undécane (82.46%) suivi par le 2-Décane (10.03%) (**fig. 68, tab. 24**).

Le profil des composants de l'huile de *R. graveolens* est presque semblable à celui de *R. chalepensis* var. *bracteosa*. 10 composés, ce qui représente 97.3% de l'huile essentielle, ont été identifiés (**fig. 69**). Les principaux composants sont le 2 Undécane (55.4%) et le 2 Nonanone (21.62%), suivis par le 1-Nonène et l' α -limonène à respectivement 4.35 et 4.26% (**tab. 24**).

En revanche, 20 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *R. tuberculata* (**fig. 70**), ce qui représente 98.88% des composés volatils (**tab. 25**). 54.41% de ces composés sont représentés par une cétone, la pipéritone (13.62%) et par des alcools monoterpéniques qui sont : trans-p-Menth-2-en-1-ol (13.14%), cis-p-Menth-2-en-1-ol (11.22%), trans-p-Menth-1-en-3-ol (4.12%) et cis-p-Menth--en-3-ol 1 (12.31%). Le β -Phéllandrène, le germacrène-B et le 3-Carène représentent respectivement 10.9, 7.32 et 5.45%.

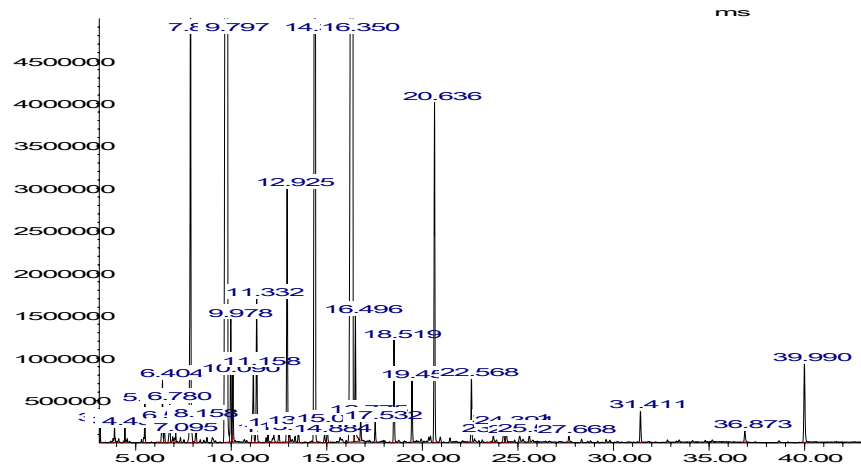


Figure 67: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de *R. chalepensis* var. *bracteosa*

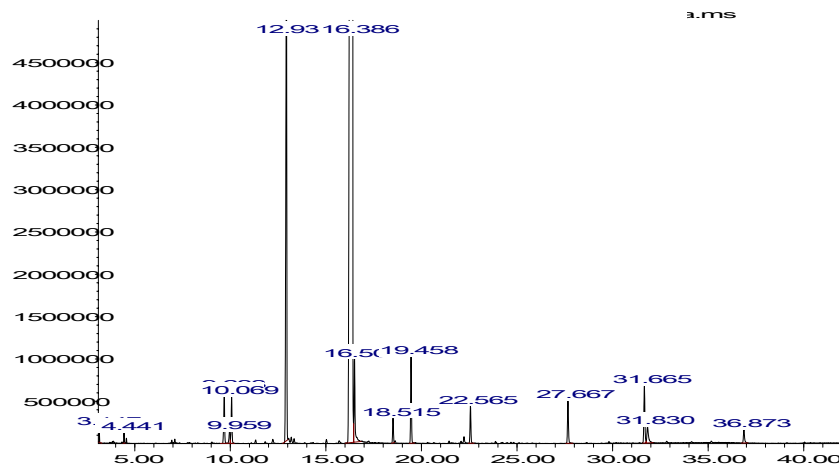


Figure 68: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de *R. angustifolia*

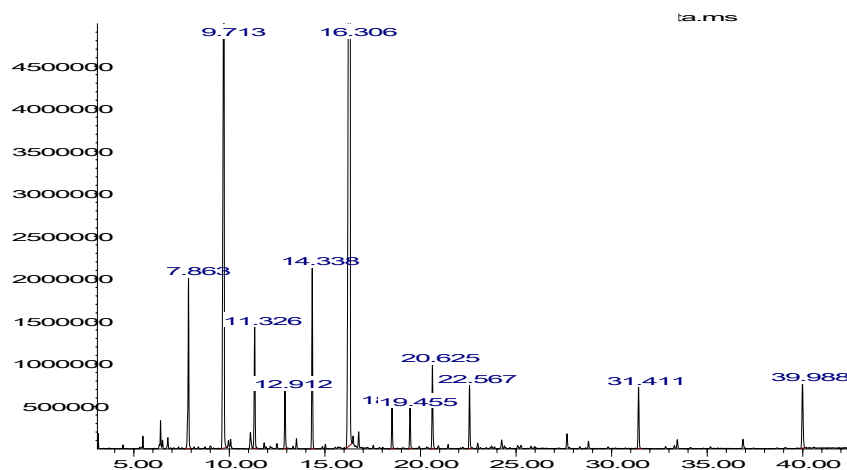


Figure 69: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de *R. graveolens*

Tableau 24: La composition des huiles essentielles (CG-SM) de *R. chalepensis* var. *bracteosa* (RCb), *R. graveolens* (RG) et *R. angustifolia* (RA)

Tr (min)	Composés	%		
		RCb	RA	RG
5.479	α -Pinène	0.31	-	-
6.406	Sabinène	0.49	-	-
6.778	2-Octanone	0.39	-	-
7.870	α -Limonène	5.27	-	4.26
9.799	2-Nonanone	32.79	0.96	21.62
9.976	NI	1.14	-	-
10.091	Nonanal	0.62	0.84	-
11.155	2-Octanol acétate	0.89	-	-
11.327	5,6-Diéthényl-1-méthyl-Cyclohexene	-	-	3.24
11.332	Geyrène	1.46	-	-
12.923	2-Décanone	2.42	10.03	1.46
14.388	1-Nonène	13.95	-	4.35
16.350	2-Undécanone	32.58	82.46	55.4
16.493	NI	1.21	1.56	-
18.513	NI	-	-	1.03
18.519	11-Dodécen-2-one	0.99	-	-
19.457	2-Dodécanone	0.6	1.51	1.02
20.636	1-Tétradécanol méthacrylate	3.29	-	2.22
22.570	2-Tridécanone	0.63	0.67	1.58
27.669	NI	-	0.83	-
31.411	NI	-	-	1.67
31.662	NI	-	1.13	-
39.988	12-Méthoxy-19-norpodocarpa-3,5,8,11,13-pentaen-7-one	0.97	-	2.14
Classes chimiques				
Cétones		71.37	95.63	83.22
• 2-cétones		69.41	95.63	81.08
Alcènes Acycliques		13.95	-	04.35
Hydrocarbures Monoterpéniques		06.07	-	07.50
Sesquiterpènes		01.46	-	-
Esters		04.18	-	02.22
Aldéhydes		00.62	00.84	-
Total des composés identifiés		97.65	96.47	97.30

Tr : temps de rétention, NI : non identifiés.

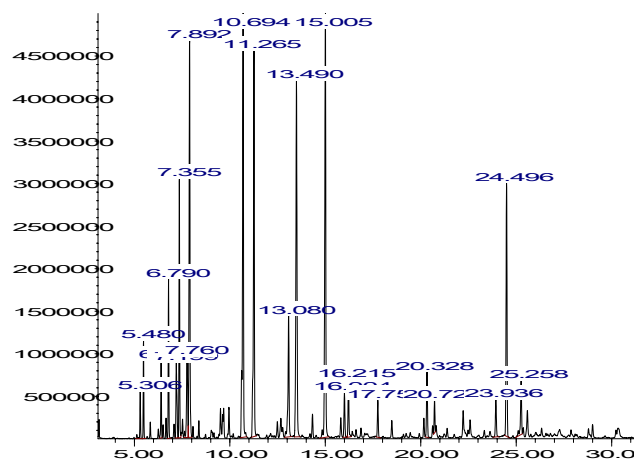


Figure 70: Chromatogramme de l'analyse par CG-SM de l'HE de *R. tuberculata*

Tableau 25: La composition de l'huile essentielle (CG-SM) de *R. tuberculata*

Tr (min)	Composés	%
5.307	α -Thujène	0.99
5.479	α -Pinène	1.79
6.406	Sabinène	1.53
6.789	β -Myrcène	3.05
7.201	α -Phéllandrène	2.22
7.355	3-Carène	5.45
7.762	p-Cymène	2.9
7.890	β -Phéllandrène	10.9
10.690	<i>trans</i> -p-Menth-2-en-1-ol	13.14
11.264	<i>cis</i> -p-Menth-2-en-1-ol	11.22
13.077	<i>trans</i> -p-Menth-1-en-3-ol (<i>trans</i> -Pipéritol)	4.12
13.489	<i>cis</i> -p-Menth-1-en-3-ol (<i>cis</i> -Pipéritol)	12.31
15.006	Pipéritone	13.62
16.001	Bornyl acétate	1.25
16.350	2-Undécanone	1.59
17.752	α -Terpinène	0.98
20.327	β -Caryophyllène	1.87
20.722	γ -Elemène	0.79
23.938	NI	1.14
24.498	Germacrène-B	7.32
25.259	β -Caryophyllène époxyde	1.84
Classes Chimiques		
Cétones		15.21
• 2-Cétones		1.59
Hydrocarbures Monoterpéniques		29.81
Hydrocarbures Sesquiterpéniques		9.98
Esters		01.25
Alcools Monoterpéniques		40.79
Oxydes tricycliques		01.84
Total des composés identifiés		98.88

Tr : temps de rétention, NI : non identifiés

III. Discussion

III.1. Analyse par CLHP Orbitrap-SMⁿ des extraits méthanoliques et aqueux d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

Les extraits analysés par CLHP-SM contiennent des dérivés des acides phénoliques et des flavonoïdes qui sont considérés comme des composants biologiquement actifs (**Harborne, 1998; Clifford et al., 2007**). L'absence des tanins dans les extraits analysés confirme les résultats du dosage colorimétrique réalisé dans le Chapitre 1.

L'acide coumarique hexose et l'acide 3-Caféoyl-4-feruloylquinique sont présents dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. Des dérivés de l'acide caféique (dimère de l'acide caféique-*O*-hexoside) et de l'acide quinique (acide dicaféoylquinique glycoside) ont été détectés dans l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et sont antérieurement identifiés dans les parties aériennes d'*H. monizii* (**Gouveia et Castilho, 2012**) et d'*H. obconicum* (**Gouveia et Castilho, 2011**).

Les isomères d'acide hydroxycinnamoylquinique ont été identifiés dans chaque échantillon analysé. Il s'agit des isomères d'acide caféoylquinique et d'acide di-caféoylquinique qui ont été déjà décrits comme étant présent dans plusieurs espèces d'*Helichrysum*, à savoir *H. stoechas* (**Carini et al., 2001**), *H. monizii*, *H. melaleucum*, *H. devium* et *H. obconicum* (**Gouveia et Castilho, 2009 ; 2010 ; 2011 ; 2012**). Plus précisément, l'acide chlorogénique (acide trans-5-*O*-caféoylquinique) a été identifié dans *H. stoechas* (**Carini et al., 2001**), dans 16 espèces d'*Helichrysum* à savoir *H. stoechas* subsp. *barrelieri* (**Albayrak et al., 2010**) et dans *H. devium*, *H. melaleucum* et *H. obconicum* (**Gouveia et Castilho, 2009 ; 2010 ; 2011**). Cependant, *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. contient l'acide 3,5-di-caféoylquinique (**Conforti et al., 2010**).

De même, nous avons pu détecter la présence des dérivés d'acide hydroxycinnamoylquinique avec un groupement malonyl (acides malonyl mono-caféoylquinique et malonyl di-caféoylquinique) dans les extraits aqueux des fleurs et des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. Les isomères d'acide malonyl-*O*-dicaféoylquinique, sont déjà identifiés dans les parties aériennes d'*H. monizii* (**Gouveia et Castilho, 2012**) et d'*H. obconicum* (**Gouveia et Castilho, 2011**). Cependant, les articles sur les acides malonylhydroxycinnamoylquiniques sont rares, et seulement quelques-uns de ces composés ont été structurellement élucidé utilisant à la fois des techniques de RMN et de SM (**Ma et al., 2011 ; Gouveia et al., 2012**).

Presque tous les flavonoïdes identifiés dans ces extraits ont été trouvés dans leur forme de glycosides, contenant une ou plusieurs unités de sucre. La présence de la rutine a été signalée dans l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, alors que la quercétine 3-*O*-glucoside, antérieurement identifiée dans la partie aérienne d'*H. compactum* (**Süzgec et al.,**

2005), *H. chasmolyticum* (Süzgeç-Selçuk et Birteksöz, 2011), *H. obconicum*, *H. devium*, *H. melaleucum* (Gouveia et Castilho, 2009, 2010) et d'*H. stoechas* (carini et al., 2001), et la quercétine dihexose sont détectées dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées de cette plante. Les formes glycosylées de la kaempférol ne sont présentes que dans les extraits méthanoliques des tiges feuillées des deux plantes. La kaempférol 3-*O*-glucoside dans les deux extraits, la Kaempférol 3-feruloyldigluco-7-glucoside et la Kaempférol dihexose glucuronide dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. La kaempférol 3-*O*-glucoside est présente dans la partie aérienne d'*H. compactum* (Süzgeç et al., 2005), *H. chasmolyticum* (Süzgeç-Selçuk et Birteksöz, 2011) et dans les capitules d'*H. stoechas* (carini et al., 2001), alors que la kaempferol-*O*-dihexoside a été identifiée dans les feuilles d'*H. obconicum* (Gouveia et Castilho, 2011).

L'identification d'un hexahydroxyflavone hexose dans l'extrait aqueux des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* n'a pas été complètement atteinte. Il s'agit d'un dérivé de la gossypétine, de la myricitine ou de la quercétagétine, qui ont une similitude dans la fragmentation des ions, avec un groupement glycoside. L'apparition de ces flavonols hydroxylés semble être beaucoup plus restreinte, que leurs dérivés méthylés et/ou glycosylés qui se produisent dans les Asteracées, Malvacées et Léguminosées. La présence de la gossypétine dans une plante appartenant à la famille des Astéracées et surtout dans des fleurs jaunes est fortement probable, car il a été signalé qu'il s'agit d'un pigment jaune des fleurs de certaines plantes de cette famille (Harborne, 1998).

Les Aglycones libres n'ont été trouvés que rarement dans ces plantes. C'est le cas de l'amentoflavone dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, de la kaempférol et de l'apigénine dans l'extrait méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*. L'Apigénine et sa forme glycosylée ont été antérieurement détectées dans *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. (Conforti et al., 2010), tandis que l'analyse d'un extrait de *P. rupestre* n'a révélé que la présence de l'apigénine glucoside (Góngora et al., 2002).

III.1.1. Relation Activité antioxydante / Composition des extraits

La relation entre l'activité antioxydante et la composition phénolique des extraits représente une approche valable dans la recherche de nouveaux principes bioactifs. Les flavonoïdes (donneur d'atome d'hydrogène) sont capables de réduire les radicaux libres hautement oxydants tels que le superoxyde, peroxy, alcoxy et les radicaux hydroxyles (Buettner, 1993). Cette capacité à piéger les radicaux dépend de la structure et des substituants de l'hétérocycle C et du noyau B.

Dans le cycle B, la présence d'un seul groupe hydroxyle diminue l'activité (**Pietta, 2000**) et la présence d'un groupe de catéchol en position 3', qui présente les meilleures propriétés donatrices d'électrons, et d'un groupement hydroxyle en position 5' est essentielle pour une bonne activité antioxydante (**Bors et al., 1990 ; Silva et al., 2002 ; Wolfe et Liu, 2008**). Un groupe hydroxyle supplémentaire dans ce cycle améliore encore cette capacité, comme exemplifié par la myricétine (**Pietta, 2000**). Les flavones et les flavonols qui contiennent le groupe catéchol sont très actifs, avec des flavonols plus puissants que les flavones correspondantes en raison de la présence du groupe 3-hydroxyle dans l'hétérocyclique C (**Pietta, 2000**).

La conjugaison du cycle B et les doubles liaisons entre les carbones C₂- C₃ et à la fonction carbonyle en C₄ (groupe 4-oxo) du cycle C, sont également importantes à la délocalisation des électrons (**Bors et al., 1990 ; Silva et al., 2002**). Cela est affirmé par la faible activité antioxydante des flavanonols et flavanones en raison de l'absence de ces conjugaisons (**Pietta, 2000**). De même, des études suggèrent que ces doubles liaisons permettent une meilleure activité antioxydante de la quercétine (flavonol) comparée à la taxifoline (flavanonol) (**Van Acker et al., 1996; Burda et al., 2001**) et à la catéchine (flavanol) (**Rice-Evans et al., 1996**).

Pour les dérivés hydroxylés des flavonoïdes, plus le nombre de groupes hydroxyles augmente, plus ils ont tendance à afficher de meilleurs effets de piégeage des radicaux. Les deux groupes hydroxyles voisins montrent aussi de meilleurs effets (**Young et al., 2007; Hyun et al., 2010**).

La contribution majeure à la chélation de métal par les flavonoïdes est due à la fraction catéchol, c'est le cas de la quercétine qui a un pouvoir à chélater le cuivre plus prononcé par rapport à celle de kaempférol (une structure similaire à la quercétine, sauf qu'il lui manque le groupe catéchol dans l'anneau B) (**Van Acker et al., 1996**).

Cependant, la *O*-glycosylation ou la *O*-méthylation de groupements hydroxyles en positions 3, 5 et 7 des cycles A et C semblent être de moindre importance et peuvent conduire à une diminution importante de l'activité antioxydante (**Pietta, 2000; Dugas et al., 2000**). C'est le cas par exemple de la rutine (glycosylation du groupe 3-hydroxyle dans l'hétérocyclique C) (**Pietta, 2000**). Cette diminution peut s'expliquer par un effet stérique qui modifie la planéité du flavonoïde, et par suite sa capacité à délocaliser les électrons. Bien qu'il ne soit pas possible d'établir un lien direct entre le nombre de substituants méthoxyles et hydroxyles et l'activité antioxydante d'un flavonoïde, on peut noter que la méthylation d'un hydroxyle du cycle B est particulièrement défavorable à l'activité antioxydante (**Musialik et al., 2009**).

Pour les non flavonoïdes, il a été déjà signalé que les dérivés de l'acide cinnamique affichent une capacité antioxydante supérieure à celle de leurs homologues benzoïque (Kim et Lee, 2004) et que le groupement caféoyl est essentiel à l'activité de piégeage des radicaux et pour l'anti-péroxydation lipidique (Góngora et al., 2003).

Toutes ces suggestions nous mènent à comprendre la bonne activité antioxydante des extraits aqueux des fleurs et des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de l'extrait méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*. Les deux plantes contiennent les mêmes familles de composés phénoliques, dérivés de l'acide hydroxycinnamique, flavonols et flavones, ce qui leur confère les hydroxyles et les conjugaisons qui permettent une excellente activité. Plusieurs travaux ont montré que les isomères des acides caféoylquinique et dicaféoylquinique, composés majeurs de tous les extraits testés dans ce travail, ont une activité antioxydante et que les isomères de l'acide di-caféoylquinique possèdent une activité antioxydante plus importante (Iwai et al., 2004).

La meilleure activité de l'extrait méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* est probablement due au fait qu'il contient, en plus du nombre important de pics des isomères de l'acide caféoylquinique, des flavonoïdes aglycones (kaempférol et apigénine) et de la kaempférol 3-*O*-glucoside, qui a selon Maffei Facino et al. (1990) et Pietta et al. (1991) une activité de piégeage des radicaux.

Les intensités des pics dans le chromatogramme de l'extrait aqueux des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, peuvent expliquer l'inactivité de l'extrait méthanolique de cette partie de plante car l'intensité du pic est proportionnelle à la concentration du composé détecté. Une quantification peut renforcer cette hypothèse. Toutefois, la glycosylation des flavonols peut être parmi les causes de cette faible activité.

Les extraits aqueux ont montré un pouvoir chélateur remarquable mais pas plus important que l'EDTA. Il est possible d'établir un lien direct entre la présence des isomères des acides malonyl caféoylquinique et malonyl di-caféoylquinique et cette activité en se basant sur les résultats de Ma et al. (2011), qui ont révélé que ces isomères ont une activité de chélation du fer importante comparés à la quercétine.

III.2. Analyse par CG-SM des huiles essentielles des espèces de *Ruta*

Les huiles essentielles des espèces du genre *Ruta* sont généralement caractérisées par un mélange de 2-cétones, qui peut atteindre 84% de la composition de l'huile (Verzera et al., 2000). Dans le présent travail, les 2-cétones représentent respectivement, 95.63, 81.08, 69.41 et

1.59% dans les huiles essentielles de *R. angustifolia*, *R. graveolens*, *R. chalepensis* var. *bracteosa* et *R. tuberculata*. Le principal composé est le 2-Undécanone sauf dans l'huile de *R. tuberculata*, dont la pipéritone est la principale cétone détectée.

L'abondance de 2-Undécanone dans ces huiles est entièrement en conformité avec les travaux effectués sur les espèces du genre *Ruta* comme dans les huiles essentielles de *R. chalepensis* d'Algérie (Merghache et al., 2009) et de la Tunisie (Mejri et al., 2010; Ben Bnina et al., 2010; Saidani-Tounsi et al., 2011), dans les huiles essentielles de *R. graveolens* d'Egypte (El-Sherbeny et al., 2007), d'Iran (Soleimani et al., 2009) et de la Malaisie (Yaacob-Karim et al., 1989) et dans l'huile de *R. angustifolia* d'Algérie (Dob et al., 2008; Kabouche et al., 2011). Cependant, en comparant avec ces travaux, la nature et les proportions des autres composés qui constituent les huiles étudiées dans ce travail, ne sont pas toujours les mêmes. Elles sont probablement affectées par les chémotypes, les conditions climatiques, saisonniers et géographiques, la période de récolte et la procédure d'extraction (Palá-Paúl et al., 1993). En effet, selon Corduan et Reinhard (1972), la lumière a un effet déterminant sur la composition de l'huile. Une espèce de *Ruta* qui pousse dans l'ombre aura des propriétés différentes de la même espèce qui pousse en plein soleil.

Cependant, les alcools monoterpéniques représentent la majorité dans l'huile de *R. tuberculata*, suivis par les hydrocarbures monoterpéniques. Nous pouvons donc en déduire que cette huile, sur laquelle les travaux sont rares, a une composition totalement différente par rapport aux autres espèces de *Ruta*. Les seuls travaux repérés sont effectués sur cette espèce sous son synonyme *Haplophyllum tuberculatum* (Forsskal) A. Juss et ont montré l'abondance des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques dans les huiles d'Iran (Yari et al., 2000), d'Egypte (Brunke et al., 1991) et d'Oman (Al-Burtamani et al., 2005).

III.2.1. Relation Activité antimicrobienne / Composition des huiles essentielles

Certains chercheurs ont indiqué qu'il y a une relation entre les structures chimiques des composés les plus abondants dans l'huile testée, leurs proportions, les interactions présentes entre eux et l'activité antimicrobienne (Dorman et Deans, 2000; Delaquis et al., 2002). Il a été rapporté que les composés oxygénés ont une activité plus élevée par rapport aux autres classes. C'est le cas des alcools et des phénols qui possèdent des niveaux élevés d'activité antimicrobienne. Le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort (Lambert et al., 2001), le thymol et l'eugénol sont capables d'induire une lyse cellulaire (Rayour et al., 2003) et les alcools agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (Dorman et Deans, 2000). Le rôle fondamental du

groupement hydroxyle dans l'action des phénols a été confirmé et sa position relative sur le noyau benzénique influence peu le degré d'activité. L'importance du noyau benzénique a été aussi mis en évidence, en démontrant le manque d'activité du menthol comparée à celle du carvacrol (Ultee et al., 2002).

Selon, Mailhebiau (1994), les alcools monoterpéniques sont des anti-infectieux et les cétones qui sont faiblement antiseptiques, ont une action antifongique confirmée par les résultats de Belghazi et al. (2002) sur l'huile essentielle de *Mentha pulegium*. Dans cette étude, le (R)-pulgéone présent à 82%, a montré une forte activité antifongique contre *Penicillium* et *Mucor*.

De même, une forte activité antimicrobienne a été observée pour les terpènes oxygénés, par rapport aux hydrocarbures terpéniques. Le limonène, qui est substitué par un groupement isopropylène en position 4, présente une plus haute activité que son homologue le *p*-cymène, substitué par un groupement isopropyle (Dorman et Deans, 2000). Ainsi, les hydrocarbures monoterpéniques, considérés comme des antiseptiques atmosphériques à cause de leur structure cyclique, sont inactifs pas la méthode de contact direct (aromatogramme) (Mailhebiau, 1994). Cependant, il a été démontré que leur présence dans de le milieu gélosé inhibe la croissance du mycélium de *Curvularia pallescens* et de *Fusarium oxysporium* (Singh et al., 2002).

D'autres groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyle est plus actif que le géraniol contre un grand nombre de bactéries Gram positives et Gram négatives (Dorman et Deans, 2000).

Toutes ces données expliquent le potentiel antifongique des composés des huiles essentielles étudiées dans le présent travail et leur faible activité antibactérienne. Cette faible activité vient confirmer les suggestions de nombreuses études (Proestos et al., 2006; Ben Bnina et al., 2010). Cette activité est variable entre les différentes huiles essentielles des espèces de *Ruta* étudiées ce qui est probablement due à leur composition chimique. Pour l'huile de *R. angustifolia*, aucune activité antibactérienne n'a été détectée, ce qui est probablement dû à la présence de 95.63% de cétones. L'activité antibactérienne modeste des huiles essentielles de *R. chalepensis* var. *bracteosa* et de *R. graveolens*, est apparemment liée à la présence d'hydrocarbures monoterpéniques. Alors que, l'activité de *R. tuberculata* contre *E. faecalis* et *B. cereus* peut être liée à la présence d'alcools et d'hydrocarbures monoterpéniques.

Le pouvoir antifongique significatif de ces huiles essentielles peut être attribué à l'abondance des alcools monoterpéniques dans l'huile de *R. tuberculata* et des composés cétoniques dans toutes les huiles.

IV. Conclusion

Les extraits méthanoliques et aqueux d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile* sont riches en isomères de l'acide caféoylquinique à forte activité antioxydante. Il ne suffit pas d'identifier cette classe de composés mais aussi de les quantifier.

Les huiles essentielles des espèces de *Ruta*, à potentiel antifongique, sont riches en cétones. Ces propriétés naturelles en font des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie alimentaire.

Conclusion générale et Perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Vu la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse, l'utilisation de ces plantes est en progression constante. Ainsi, le besoin établi à développer de nouveaux agents antioxydants et antimicrobiens pour résoudre les problèmes de l'implication du stress oxydatif dans plusieurs maladies (maladies cardiovasculaires, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer.etc.), de la résistance aux antimicrobiens et du stockage des produits alimentaires, mène plusieurs chercheurs à valoriser certaines plantes médicinales.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles et des extraits de quelques plantes aromatiques originaires d'Algérie. Il s'agit d'*Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* et de *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile* de la famille des Astéracées, qui poussent spontanément dans la région de Tlemcen et de quatre espèces de Rutacées, *Ruta angustifolia*, *R. graveolens*, *R. chalepensis* var. *bracteosa*, et *R. tuberculata*, originaires respectivement de Tlemcen, Anaba, Ain temouchent et Bechar.

Les résultats du premier chapitre révèlent que les rendements en huiles essentielles d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* sont négligeables, ce qui rend leur étude difficile. Les extraits hydro-méthanoliques de ces espèces contiennent une quantité considérable de composés phénoliques, et ont des propriétés antioxydantes intéressantes. Les plus fortes teneurs en composés phénoliques, en tanins et la plus grande capacité antioxydante totale (97.5 ± 0.33 mg EAG/g MS), ont été obtenues pour l'extrait des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. L'extrait des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, a révélé la teneur la plus élevée en flavonoïdes et la plus forte activité antioxydante par les méthodes de piégeage des radicaux DPPH[°] et ABTS^{°+} ainsi que l'inhibition de blanchiment du β -carotène, et ceci par rapport aux standards (BHT, BHA). La meilleure activité est obtenue en piégeant le radical DPPH[°] avec une valeur de CI₅₀ de 5.65 ± 0.10 μ g/mL. L'extraction sélective des molécules bioactives à partir de ces deux espèces, par des solvants appropriés (hexane, dichlorométhane, méthanol et eau), révèle que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes sont significativement plus élevées dans les extraits à polarité élevée, notamment le méthanol, et que l'utilisation de ces solvants permet l'extraction des composés doués d'une activité antioxydante puissante, sauf pour l'extrait méthanolique des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*. Comme pour les extraits hydro-méthanoliques, l'activité de quelques extraits est comparable ou plus importante que celle des BHA et BHT par les trois méthodes : piégeage des radicaux DPPH[°] et ABTS^{°+} et inhibition de blanchiment du β -carotène, avec des valeurs de CI₅₀ respectives de 5.47 ± 0.15 , 63.77 ± 0.9 et 22.71 ± 0.41 μ g/mL pour l'extrait méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.

Pour tous les extraits testés, une bonne corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés polyphénoliques a été établie. A l'exception de la capacité antioxydante totale, l'extraction successive des molécules antioxydantes par le méthanol et l'eau, après passage par l'hexane et le dichlorométhane, a permis d'avoir des activités semblables ou plus importantes par rapport à celles des extraits hydro-méthanoliques. Cependant, l'activité reste significativement inférieure à celles des standards, par les méthodes de la réduction et de la chélation du fer.

Les extraits hydro-méthanoliques n'ont montré aucune activité antimicrobienne sur les souches microbiennes testées, alors que les extraits obtenus successivement, notamment à partir de l'hexane et du dichlorométhane, ont une activité modérée sur quelques souches bactériennes.

Le deuxième chapitre révèle que les extraits hydro-méthanoliques de *R. angustifolia*, *R. graveolens*, *R. chalepensis* var. *bracteosa* et *R. tuberculata*, sont pauvres en composés phénoliques et par conséquent exercent un pouvoir antioxydant faible à modéré, par rapport aux standards. Ces extraits n'ont montré aucune activité antimicrobienne sur les souches microbiennes testées. L'étude des huiles essentielles de ces espèces, révèle leur très faible activité antioxydante et prouve leur potentiel comme inhibiteur de la croissance fongique. *Aspergillus fumigatus* et *Cladosporium herbarum* sont les souches les plus sensibles à ces huiles avec des valeurs de CMI inférieures à 4 µl/mL pour certaines huiles et atteignant 9 µl/mL pour d'autres. Contre *C. albicans*, l'huile essentielle de *R. graveolens* a l'effet inhibiteur le plus important (CMI de 22 µl/mL).

Les résultats des deux premiers chapitres ont permis de mettre en avant les propriétés antioxydantes des extraits d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de *P. saxatile* subsp. *saxatile* préparés par des solvants polaires (Méthanol et eau) à travers plusieurs méthodes et la capacité antifongique des huiles essentielles des quatre espèces de *Ruta* à l'égard de quelques champignons pathogènes. Ces résultats, ont donné naissance à un troisième chapitre, dans lequel nous avons tenté d'identifier les molécules responsables des ces activités. L'analyse par CLHP-SM a révélé la présence des dérivés d'acide hydroxycinnamique : les isomères d'acide caféoylquinique et di-caféoylquinique dans tous les extraits et les isomères d'acide malonyl caféoylquinique et di-caféoylquinique dans les extraits aqueux. D'autres classes de flavonoïdes ont été détectées à savoir les flavonols, les flavones et les biflavones. Cette composition nous mène à comprendre la bonne activité antioxydante des extraits aqueux des fleurs et des tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et de l'extrait méthanolique des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*. Cependant, il semble important de quantifier le contenu phénolique de l'extrait méthanolique de tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* pour pouvoir justifier sa faible activité.

Les huiles essentielles de *R. angustifolia*, *R. graveolens* et *R. chalepensis* var. *bracteosa*, analysées par CG-SM, ont montré une grande variation dans leur composition chimique avec celle de *R. tuberculata*. Les trois premières huiles essentielles ont été dominées par les 2-cétones (jusqu'à 95.63%) tandis que l'huile de *R. tuberculata* contient une pipéritone (13.62%) et certains alcools monoterpéniques (40.79%), ce qui explique le potentiel antifongique des ces huiles essentielles.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les deux Astéracées d'Algérie, étudiées dans ce travail, peuvent constituer une nouvelle source de dérivés d'acide caféoylquinique doués d'un potentiel antioxydant important. De même, compte tenu du pouvoir antifongique des huiles essentielles des espèces de *Ruta*, certains de leurs composants peuvent être recommandés pour la formulation d'agents de conservation.

Bien que les résultats présentés dans cette étude apportent des éléments concernant les possibilités d'utiliser ces plantes dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou cosmétique, d'autres études doivent être menées pour :

- Evaluer le potentiel antioxydant, *in vivo*, des extraits de ces deux Astéracées et de chacun de leurs composés pris séparément, pour mettre en évidence le principe actif et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques.
- Obtenir des informations sur l'efficacité pratique des huiles essentielles pour empêcher la multiplication des microbes dans les aliments. Toutefois, certaines questions associées au mauvais goût doivent être étudiées.

Par ailleurs, la détermination de la toxicité des extraits et des huiles essentielles par des essais de laboratoire, demeure une exigence très importante pour leur utilisation future.

Références bibliographiques

1. Abdulbasset MES, Abdetawab AH. 2008. *Médicinal Herbal Guide*. Edition ALFA-PUBLISHING. p. 428.
2. AFNOR. « Recueil de normes: les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles », Paris, 2000, 661-663.
3. Afolayan AJ, Meyer JJM. 1997. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 57, 177-181.
4. Aiyegoro OA, Okoh AI. 2010. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 21.
5. Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikum A. 2005. The effect of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, 93(2), 311-317.
6. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Hamzaoglu E. 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 119(1), 114- 122.
7. Albayrak S, Sagdic O, Aksoy A, Hamzaoglu H. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of *Helichrysum* species from the Mediterranean region of Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 20, 3143-3152.
8. Al-Burtamani SKS, Fatope MO, Marwah RG, Onifade AK, Al-Saidi SH. 2005. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 107-112.
9. Ali-Shtayeh MS, Abu-Ghdeib SI. 1999. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42(11-12), 665-672.
10. Ali-Shtayeh MS, Yaghmour M-RR, Faidi YR, Salem K, Al-Nuri MA. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(3), 265-271.
11. Alonso-Salces RM, Guillou C, Berrueta LA. 2009. Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry on a triple quadrupole for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(3), 363-83.
12. Al-Yahya MA, Al-Rehaily AJ, Mohammed SA, Mansourn S, Farouk S. 1992. New alkaloid from *Haplophyllum tuberculatum*. *Journal of Natural Products*, 55, 899-903.
13. Amarowicz R, Wanasundara U, Wanasundara J, Shahidi F. 1993. Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a b-carotene-linoleate model system. *Journal of Food Lipids*, 1(2), 111-117.
14. Atarés L, Bonilla J, Chiralt A. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678-687.
15. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27-36.
16. Atta AH, Alkofahi A. 1998. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plants extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 117-124.
17. Austin DF. 2002. Plant Resources of South-East Asia No.12(2). Medicinal and poisonous plants 2. *Economic Botany*, 56(3), 297.
18. Baba Aissa F. 1999. Encyclopédie des Plantes Utiles: Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition LIBRAIRIE MODERNE - ROUIBA.
19. Bacchetta, G. Brullo S, Giusso del Galdo G. 2006. *Ruta lamarmorae* (Rutaceae), a new species from Sardinia. *Edinburgh Journal of Botany* 63(2-3), 153-160.
20. Barreda VD, Palazzesi L, Tellería MC, Katinas L, Crisci JV, Bremer K, Passalia MG, Corsolini R, Rodríguez Brizuela R, Bechis F. 2010. Eocene Patagonia fossils of the daisy family. *Science*, 329(5999), 1621.

21. Barros L, Baptista P, Correia DM, Morais JS, Ferreira ICFR. 2007. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4781-4788.
22. Barros L, Oliveira S, Carvalho AM, Ferreira ICFR. 2010. *In vitro* antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 572- 579.
23. Bejar E, Bussmann R, Roa C, Sharon D. 1997. *Herbs of Southern Ecuador: A Field Guide to the Medicinal Plants of Vilcabamba*. Edition illustrated, LH Press. p. 256-257.
24. Belaiche P. 1979. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome 3, Edition Maloine. p.137-147.
25. Belghazi L, Lahlou N, Alaoui I, Abousaouiria T, Habti N, Tantaoui IA, Talbi M, Blaghen M, Fellat Z. 2002. Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de biochimie. Casablanca. *Biochimie et santé*, 38-40.
26. Ben Bnina E, Hammami S, Daamii-remadi M, Ben Jannet H, Mighri Z. 2010. Chemical composition and antimicrobial effects of tunisian *Ruta chalepensis* l. Essential oils. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 12, 1-9.
27. Bianchini A, Tomi P, Costa J, Bernardini AF. 2001. Composition of *Helichrysum italicum* G.Donfil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France). *Flavour & Fragrance*, 16(1), 30-34.
28. Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamze v, Amvam Zollo PH. 2004. Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Traditional pharmacology and medicine in Africa*, 13, 11-20.
29. Boizot N, Charpentier JP. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.
30. Bonnier G. 1999. *La Grande Flore en Couleur*. Edition BELIN. Tome 3. p. 205-206.
31. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355.
32. 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. *Comptes Rendus Biologies*, 33(1), 48-55.
33. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, GaSastri L, Marceca MX, Guffanti EE. 2006. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*, 76(2), 61-68.
34. Bramwell D, Bramwell ZI. 2001. *Wild Flowers of the Canary Islands*. 2^{ème} Edition Editorial Rueda, Madrid, Spain.
35. Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. 3^{ème} Edition Tec et doc. Paris.
36. Brunke EJ, Hammerschmidt MA, Abd El-kaway EA, El-Kashoury A, Soliman FM. 1991. Essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Egypt. *Herba Hungarica*, 30(3), 34-39.
37. Buettner GR. 1993. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 300(2), 535-543.
38. Burda S, Oleszek W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(6), 2774-2779.
39. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
40. Cáceres A. 1999. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Edition Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala. p. 325.
41. Carini M, Aldini G, Furlanetto S, Stefani R, Maffei Facino R. 2001. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum Stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(3), 517-26.

42. Chavan UD, Shahidi F, Nacz M. 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75(4), 509-512.
43. Chen CC, Huang YL, Huang FI, Wang CW, Ou JC. 2001. Watersoluble glycosides from *Ruta graveolens*. *Journal of Natural Products*, 64(7), 990-992.
44. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Atik-Bekkara F. 2014. Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association*. 77(6), 302–307.
45. Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225.
46. Chiu KW, Fung AY. 1997. The cardiovascular effects of green beans (*Phaseolus aureus*), common rue (*Ruta graveolens*), and kelp (*Laminaria japonica*) in rats. *General Pharmacology*, 29(5), 859-862.
47. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck, AJ. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 213-220.
48. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. 2005. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3821-3832.
49. Clifford MN, Wu W, Kirkpatrick J, Kuhnert N. 2007. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3), 929-936.
50. Conforti F, Rigano D, Formisano C, Bruno M, Loizzo MR, Menichini F, Senatore F. 2010. Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(1), 97-104.
51. Conway GA, Slocumb JC. 1979. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(3), 241-261.
52. Corduan G, Reinhard E. 1972. Synthesis of volatile oils in tissue cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 11(3), 917-922.
53. Cowan MM. 1999. Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
54. Cuyckens F, Claeys M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(4), 1-15.
55. Czinner E, Hagymasi K, Blazovics AK, Kery A, Szoke E, Lemberkovics E. 2000. *In vitro* Antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(3), 437-443.
56. Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dannaoui É. 2013. Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 43(450), 71-77.
57. De Freitas TG, Augusto PM, Montanari T. 2005. Effect of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. *Contraception*, 71 (1), 74-77.
58. De Moffarts B, Kirschvink N, Pincemail J, Lekeux P. 2005. Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149(1), 1-9.
59. De Rijke E, Out P, Niessen W MA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
60. Del Castillo JB, Secundino M, Rodriguez Luis F. 1986. Four aromatic derivatives from *Ruta angustifolia*. *Phytochemistry*, 25(9), 2209-2210.
61. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 101-109.

62. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010-3014.
63. Di Stasi LC, Hiruma CA, Guimaraes CM. 1994. Medicinal plants used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*, 65(6), 529-540.
64. Diallo D, Sanogo R, Yasambou H, Traoré A, Coulibaly K, Maïga A. 2004. Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1073-1080.
65. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.
66. Dob T, Dahmane D, Gauriat-Desrudy B, Daligault V. 2008. Volatile Constituents of the Essential Oil of *Ruta chalepensis* L. subsp. *Angustifolia* (Pers.) P. Cout. *Journal of Essential Oil Research*, 20(30), 306-309.
67. Dolci M, Tira S. 1982. Flavonoids of Gnaphalieae: *Phagnalon* species. *Atti della Accademia delle Scienze di Torino. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali*, 116, 315-318.
68. Dombrowicz E, Swiatek L, Kopycki W. 1994. Phenolic acids in Inflorescentia *Helicrysi* and herba *Hieracii pilosellae*. *Pharmazie*, 47, 469-470.
69. Dorman HJD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
70. Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4563-4569.
71. Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
72. Duffaud MH. 1998. Végétation des dunes littorales atlantiques de l'Adour à Noirmoutier. *Revue forestière française*, 4, 328-348.
73. Dugas AJ Jr, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. 2000. Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity L. Relationships. *Journal of Natural Products*, 63(3), 327-331.
74. Dupont F, Guoguard JL. 2007. *Botanique: systématique moléculaire*. 14^{ème} Edition Masson Paris.
75. Edris AE. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*. 21(4), 308-323.
76. El-Sherbeny SE, Hussein MS, Khalil, MY. 2007. Improving the production of *Ruta graveolens* L. plants cultivated under different compost levels and various sowing distance. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 2(3), 271-281.
77. Erdogan Orhan I, Sezer Senol F, Demirci B, Ozturk N, Can Baser K. H, Sener B. 2013. Phytochemical Characterization of *Phagnalon graecum* Boiss. by HPLC and GC-MS with its Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activity Profiling by Spectrophotometric Methods. *Food Analytical Methods*, 6(1), 1-9.
78. Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. 2001. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715
79. Falconner SB, Brown ED. 2009. New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 497-504.
80. Favier A. 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 390-396.

81. Ferracane R, Pellegrini N, Visconti A, Graziani G, Chiavaro E, Miglio C, Fogliano V. 2008. Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8601-8608.
82. Filomena C, Daniela R, Carmen F, Maurizio B, Monica RL, Francesco M, Senatore F. 2010. Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(1), 97-104.
83. Font Quer P. 1983. Plantas medicinales. El Dioscorides renovado, 8th edn, Ed. Labor, Barcelona. p. 783-785.
84. Frankel EN, Meyer AS. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
85. Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas N, Susanna A, Jansen RK. 2005. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biologiske Skrifter*, 55, 343-374.
86. Garcia De Quesada T, Rodriguez B, Valverde S. 1972. The constituents of *Helichrysum stoechas*. *Phytochemistry*, 11(1), 446-449.
87. Gescher K, Hensel A, Hafezi W, Derksen A, Kühn J. 2011. Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1. *Antiviral Research*, 89(1), 9-18.
88. Gijon E, Cartas L, Lorenzana-Jimenez M, Garcia X. 1995. Immobilization of frog sperm by exposure to *Ruta chalepensis* extract. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 38, 53-54.
89. Góngora L, Mániz S, Giner RM, Del Carmen-Recio M, Schinella G, Ríos JL. 2003. Inhibition of xanthine oxidase by phenolic conjugates of methylated quinic acid. *Planta Medica*, 69(5), 396-401.
90. Góngora L, Mániz S, Giner RM, Recio MD C, Gray AI, Rios JL. 2002. Phenolic glycosides from *Phagnalon rupestre*. *Phytochemistry*, 59(8), 857-860.
91. Gonzalez-Trujano M.E, Carrera D, Ventura-Martinez R, Cedillo-Portugal E, Navarrete A. 2006. Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 129-135.
92. Gouveia SC, Castilho PC. 2012. *Helichrysum monizii* Lowe: Phenolic Composition and Antioxidant Potential. *Phytochemical Analysis*, 23(1), 72-83.
93. Gouveia SC, Castilho PC. 2009. Analysis of phenolic compounds from different morphological parts of *Helichrysum devium* by liquid chromatography with on-line UV and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(24), 3939-3953.
94. Gouveia SC, Castilho PC. 2010. Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high-performance liquid chromatography with online ultraviolet and mass spectrometry detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(13), 1851-1868.
95. Gouveia SC, Castilho PC. 2011. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RPHPLC- DAD-(-)-ESI-MSⁿ method. *Food Chemistry*, 129(2), 333-344.
96. Gouveia SC, Paula C, Castilho. 2012. Validation of a HPLC-DAD-ESI/MSⁿ method for caffeoylquinic acids separation, quantification and identification in medicinal *Helichrysum* species from Macaronesia. *Food Research International*, 45(1), 362-368.
97. Hadj Salem J, Chevalot I, Harscoat-Schiavo C, Paris C, Fick M, Humeau C. 2011. Biological activities of flavonoids from *Nitrariaretusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives. *Food Chemistry*, 124(2), 486-494.
98. Hale AL, Meepagala KM, Oliva A, Aliotta G, Duke SO. 2004. Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3345-3349.

99. Halliwell B. 1995. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348.
100. Hammiche V, Maiza K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 358-367.
101. Hanhineva K, Rogachev I, Kokko H, Mintz-Oron S, Venger I, Kärenlampi S, Aharoni A. 2008. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. *Phytochemistry*, 69(13), 2463-2481
102. Harborne JB. 1998. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis*. 3^{ème} edition.
103. Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S. 2009. How relevant are flavonoids as antioxidant in plants. *Trends in Plant Science*, 14(3), 125-132.
104. Hnatyszyn O, Arenas P, Moreno AR, Rondina R, Coussio JD. 1974. Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklorica. *Revista de la Sociedad Científica*, 14, 37.
105. Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 1841-1856.
106. Hudaib M, Mohammad M, Bustanji Y, Tayyem R, Yousef M, Abuirjeie M, Aburjai T. 2008. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Jordan, Mujib Nature Reserve and surrounding area. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 63-71.
107. Hwisa N, Auzi A, Parvez N, Molvi K, Sherif F. 2011. Antinociceptive effect of *Helichrysum stoechas* in experimental animals. *IJPI's, Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1(2), 23-27.
108. Hyun J, Woo Y, Hwang D, Jo G, Eom S, Lee Y, Park JC, Lim Y. 2010. Relationships between structures of hydroxyflavones and their antioxidative effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (18), 5510-5513
109. Iauk L, Mangano K, Rapisarda A, Ragusa S, Maiolino L, Musumeci R, Costanzo R, Serra A, Speciale A. 2004. Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L, a plant with anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2-3), 267-272.
110. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. 2005. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. *Fitoterapia*. 76(3-4), 344-347.
111. Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, Mochida K, Fujita T. 2004. *In vitro* antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4893-4898.
112. Jahandiez E, Mairie R. 1934. *Catalogue des Plantes du Maroc*. Tome 3.p.751.
113. Kabouche Z, Boudiar T, Labeled I, Safaei-Ghomi J, Kabouche A. 2011. Analysis of the Essential Oil of *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia* from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14 (6), 792-795
114. Kalembe D, Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
115. Kazi Tani C, Le Bourgeois T, Munoz F. 2010. Aspects floristiques de la flore des champs du domaine phytogéographique oranais (Nord-Ouest algérien) et persistance d'espèces rares et endémiques. *Flora Mediterranea*, 20, 5-22.
116. Khelifi D, Sghaier RM, Amouri S, Laouini D, Hamdi M, Bouajila J. 2013. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 202-208.
117. Khouri NA, El-Akawi Z. 2005. Antiandrogenic activity of *Ruta graveolens* L in male Albino rats with emphasis on sexual and aggressive behavior, *Neuro endocrinology letters*, 26(6), 823-829.

118. Kil HY, Seong ES, Ghimire BK, Chung IM, Kwon SS, Goh EJ, Heo K, Kim MJ, Lim JD, Lee D, Yu CY. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*, 115(4), 1234-1239.
119. Kim DO, Lee CY. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 253-273.
120. Koleva II, Teris AB, Jozef PH, Linssen AG, Lyuba NE. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Analysis*, 13(1), 8-17.
121. Kumaran A, Karunakaran RJ. 2007. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT Food Sci Technol*, 40(2), 344-352.
122. Kuzovkina I, Al'terman I, Schneider B. 2004. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 65(8), 1095-1100.
123. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
124. Larbat R, Le Bot J, Bourgaud F, Robin C, Adamowicz S. 2012. Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. *Plant Biology*, 14(5), 760-769.
125. Lieutaghi P. 2006. *Petite ethnobotanique méditerranéenne*. Edition Actes Sud.
126. Llorach R, Gil-Izquierdo A, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. 2003. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) agroindustrial byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3895-3899.
127. Lourens ACU, Reddy D, Baser KHC, Viljoen AM, Van Vuuren SF. 2004. *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2-3), 253-258.
128. Ma C, Dastmalchi K, Whitaker BD, Kennelly EJ. 2011. Two new antioxidant malonated caffeoylquinic acid isomers in fruits of wild eggplant relatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9645-9651.
129. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Edition Springer-Verlag
130. Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. 2005. *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. 1^{ère} édition Presses polytechniques et universitaires romandes.
131. Maffei Facino R, Carini M, Franzoi L, Pirola O, Bosisio E. 1990. Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G. Don (compositae). *Pharmacological Research*, 22(6), 709-721.
132. Mailhebiau P. 1994. La nouvelle aromathérapie: caractérogénie des essences et tempéraments humains: [biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs]. Edition Jakin.
133. Mansour S, Al-Said Tariq M, Al-Yahya MA, Rafatullah S, Ginnawi OT, Ageel AM. 1990. Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 28(3), 305-312.
134. Mantle D, Eddeb F, Pickering AT. 2000. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 47-51.
135. Medjahdi B, Ibn Tattou M, Barkat D. et Benabedli K. 2009. La flore vasculaire des Monts des Trara (Nord Ouest Algérien). *Acta Botanica Malacitana*, 34, 57-75.

136. Meepagala KM, Schrader KK, Wedge DE, Duke SO. 2005. Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*, 66 (22), 2689-2695.
137. Mejri J, Abderrabba M, Mejri M. 2010. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L.: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 671-673.
138. Merghache S, Hamza M, Tabti B. 2009. Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. *Afrique Science*, 5(1), 67-81.
139. Meyer JJM, Dilika F. 1996. Antibacterial activity of *Helichrysum pedunculatum* used in circumcision rites. *Journal of Ethnopharmacology*, 53(1), 51-54
140. Miraliakbari H, Shahidi F. 2008. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 111(2), 421-427.
141. Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabetta W, Blanco A, Lorusso E, Avato P. 2010. Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 639-649.
142. Mossa JS, Al-Yahya MA, Al-Meshal IA. 1987. *Medical Plants of Saudi Arabia*. Tome 1. Edition King Saud University Libraries.
143. Moure A, Franco D, Sineiro J, Dominguez H, Nunez, MJ, Lema, JM. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3890-3897.
144. Musialik M, Kuzmicz R, Pawtowski TS, Litwinienko G. 2009. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *Journal of Organic Chemistry*, 74(7), 2699-2709.
145. Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA. 2011. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173-179.
146. NCCLS "National Committee for Clinical Laboratory Standards". 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, PA, USA.
147. Novais MH, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. 2004. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 183-195.
148. Oyaizu M. 1986. Studies on products of the browning reaction: antioxidative activities of browning reaction. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(66), 307-315.
149. Ozenda P. 1991. *Flore et végétation du Sahara*. 3^{ème} Edition CNRS.
150. Palá-Paúl J, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Varadé J, Ma Villa A, Sanz J, Panizzi L, Flamini G, Cioni P.L, Morelli I. 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(3), 167-170.
151. Paolini J, Desjobert JM, Costa J, Bernardini AF, Castellini CB, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. 2006. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands. *Flavour & Fragrance*, 21(5), 805-808.
152. Paris M, Hurabielle M. 1981. *Abrégé de matière médicale (Parmacognosie)*. Tome 1. Edition Masson, Paris.
153. Penchev P, Angelov G, Condoret JS. 2010. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de lamélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de génie industriel*, 5, 115-123.
154. Peters U, Sinha R, Chatterjee N, Subar AF, Ziegler RG, Kulldorff M, Bresalier R, Weissfeld JL, Flood A, Schatzkin A, Hayes RB. 2003. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet*, 361(9368), 1491-1495.
155. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson Å, Bolmstrom A. 1998. Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2586-2589.

156. Pietta P, Mauri P, Gardana C, Maffei Facino R, Carini M. 1991. *High-performance liquid chromatographic determination of flavonoid glucosides from Helichrysum italicum*. *Journal of Chromatography A*, 537, 449-452.
157. Pietta P. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
158. Ponce AG, Fritz R, del Valle C, Roura SI. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
159. Prasain JK, Wang CC, Barnes S. 2004. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1324-1350.
160. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
161. Proestos C, Boziaris IS, Nychas G-JE, Komaitis M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95(4), 664-671.
162. Psotová J, Lasousky J, Vičar J. 2003. Metal-chelating properties. Electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six naturel phenolics. *Biomedical Papers*, 147(2), 147-153.
163. Qaiser M, Abid R. 2003. *Flora of Pakistan. No. 210, Asteraceae (II): Inuleae, Plucheeae & Gnaphalieae*. Edition University of Karachi.
164. Quezel P, Santa S. 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Edition Centre national de la recherche scientifiques. Tome II.
165. Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Goswami K, Das HR. 2006. Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2), 234-239.
166. Rayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K, Remmal A. 2003. Mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components in *E. coli* & *Bacillus subtilis*. *The Journal of Essential oil Research*, 15(5), 356- 362.
167. 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 Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
168. Reico MC, Giner R, Terencio M, Sanz M, Rios J. 1991. Anti-inflammatory activity of *Helichrysum stoechas*. *Planta Medica*, 57(2), 56-57.
169. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
170. Rios J, Recio M, Villar A. 1991. Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Ethnopharmacology*, 33(1-2), 51- 55.
171. Rivas Martinez S, Fernández Gonzalez F, Loidi J, Lousa M, Penas A. 2001. Sintaxonomical checklist of vascular plant communities of Spain and Portugal to association level. *Itinera geobotánica*, 14: 5-341.
172. Rodrigues E, Gianfratti B, Tabach R, Negri G, Mendes FR. 2008. Preliminary investigation of the central nervous system effects of 'Tira-capeta' (Removing the Devil), a cigarette used by some Quilombolas living in Pantanal Wetlands of Brazil. *Phytotherapy Research*, 22(9), 1248-1255.
173. Rodríguez Vaquero MJ, Aredes Fernández PA, Manca de Nadra MC, Strasser de Saad AM. 2010. Phenolic compounds combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6048-6052.
174. Rojas-Escudero E, Alarcón-Jiménez AL, Elizalde-Galván P, Rojo-Callejas F. 2004. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1027(1-2), 117-120.
175. Romanik G, Gilgenast E, Przyjazny A, Kamiński M. 2007. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 253-261.

176. Ruberto G, Baratta MT. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69(2), 167-174.
177. Saavedra MJ, Borges A, Dias C, Aires A, Bennett RN, Rosa ES, Simões M. 2010. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Medicinal Chemistry*, 6(3), 174-183.
178. Sagdic O, Karahan AG, Ozcan M, Ozcan G. 2003. Effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *Food Science and Technology International*, 9(5), 353-356.
179. Saidani-Tounsi M, Aidi-Wannes W, Ouerghemmi I, Msaada K, Smaoui A, Marzouk B. 2011. Variation in essential oil and fatty acid composition in different organs of cultivated and growing wild *Ruta chalepensis* L. *Industrial Crops and Products*, 33(3), 617-623.
180. Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Figueiredo AC, Barroso JG, Canigual S. 1997. Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry*, 45(2), 307-311.
181. Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Casals I, Andrés-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventós RM. 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 35-42.
182. Santayana MP, Blanco E, Morales R. 2005. Plants known as *té* in Spain: An ethno-pharmaco-botanical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1-2), 1-19.
183. Sawada Y, Akiyama K, Sakata A, Kuwahara A, Otsuki H, Sakurai T, Saito K, Hirai MY. 2009. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. *Plant and Cell Physiology*, 50(1), 37-47.
184. Schliemann W, Schneider B, Wray V, Schmidt J, Nimtz M, Porzel A, Bohm H. 2006. Flavonols and an indole alkaloid skeleton bearing identical acylated glycosidic groups from yellow petals of *Papaver nudicaule*. *Phytochemistry*, 67(2), 191-201.
185. Sen CK, Packer L. 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72 (2), 653-669.
186. Senatore F, Formisano C, Grassia A, Rigano D, Bellone G, Bruno M. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. (Asteraceae) growing wild in Southern Italy. *Journal of essential oil-Bearing Plants*, 8(3), 258-263.
187. Shakyia, R. Navarre DA. 2006. Rapid screening of ascorbic acid, glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5253-5260.
188. Shehadeh MB, Afifi FU, Abu-Hamdah SM. 2007. Platelet Aggregation Inhibitors from Aerial Parts of *Ruta Chalepensis* Grown in Jordan. *Integrative Medicine Insights*, 2, 35-39.
189. Sheriha GM, Abouamer K, Elshaiwi BZ, Ashour AS, Abed FA, Alhallaq HH. 1987. Quinoline alkaloids and cytotoxic lignans from *Haplophyllum tuberculatum*. *Phytochemistry*, 26(12), 3339-3333.
190. Silva MM, Santos MR, Caroco G, Rocha R, Justino G, Mira L. 2002. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a reexamination. *Free radical research*, 36(11), 1219-1227.
191. Singh G, Singh OP, Maurya S. 2002. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 45(1-2), 75- 81.
192. Sobhy EA, El- Feky SS. 2007. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian Journal of Plants Sciences*, 6 (4), 692-695.
193. Soleimani M, Aberoomand-Azar P, Saber-Tehrani M, Rustaiyan A. 2009. Volatile Composition of *Ruta graveolens* L. of North of Iran. *World Applied Sciences Journal*, 7(1), 124-126.
194. Soliman KM, Badeaa RI. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11), 1669-1675.
195. Sun B, Richardo-da-Silvia JM, Spranger I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267-4274.

196. Süzgeç S, Meriçli AH, Houghton PJ, Cubukçu B. 2005. Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. *Fitoterapia*, 76(2), 269-272.
197. Süzgeç-Selçuk S, Birteksöz AS. 2011. Flavonoids of *Helichrysum chasmolycicum* and its antioxidant and antimicrobial activities. *South African Journal of Botany*, 77(1), 170-174.
198. Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (10), 3133-3141.
199. Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA. 2005. *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*, 90(4), 685-689.
200. Tomas-Barberan F, Iniesta-Sanmartín E, Tomás-Lorente F, Rumbero A. 1990. Antimicrobial Phenolic Compounds From Three Spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry*, 29(4), 1093-1095.
201. Tomas-Barberan FA, Msonthi JD, Hostettmann K. 1988. Antifungal Epicuticular Methylated Flavonoids from *Helichrysum nitens*. *Phytochemistry*, 27(3), 753-755.
202. Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. 1995. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 1, 25-34.
203. Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C. 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT Food Science and Technology*, 43(4), 632-639.
204. Trabut L. 2006. *Noms indigènes des plantes d'Afrique du Nord*. Edition Ibis Press Paris. p.127.
205. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), 835-841.
206. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
207. Ulubelen A, terem B. 1988. Alkaloids and coumarins from roots of *ruta chalepensis*. *Phytochemistry*, 27(2), 650- 651.
208. Valdes B, Talavera S, Fernandez-Galiano E. 1987. *Flora Vasculare de Andalucía Occidental*. Edition Ketrès, Barcelona. p.263.
209. Valnet J. 2005. *L'aromathérapie*. 10^{ème} Edition Maloine.
210. Van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van der Vijgh WJF, Bast A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 275-283.
211. Van Wyk BE, Oudtshoorn BV, Gericke. 2012. *Medicinal Plants of South Africa*. Edition Briza Publications.
212. Vazquez G, Fontenla E, Santos J, Freire MS, Gonzalez-Alvarez J, Antorrena G. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*, 28(3), 279-285.
213. Vermerris W, Nicholson R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Edition Springer.
214. Verzera V, Mondello L, Ragusa S, Dugo G. 2000. L'olio essenziale delle foglie di piante tipiche della flora mediterranea: Nota II. *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) =Essential oil of the leaves of a typical mediterranean plant: Note II. *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae). *Essenze E Derivati Agrumari*, 70(4), 207-210.
215. Watt JM. 1967. African plants potentially useful in mental health. *Lloydia*, 30, 1-22.
216. Wei A, Shibamoto T. 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7218-7225.

217. Wichtl M, Anton R. 2003. *Plantes thérapeutiques: Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. 2^{ème} Edition Tec & Doc Lavoisier.
218. Wolfe KL, Liu RH. 2008. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56(18), 8404-8411.
219. Wong SP, Leong LP, Koh JHW. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4), 775-783.
220. Yaacob-Karim, B, Abdullah, Che Mazenah, Joulain. 1989. Essential oil of *Ruta graveolens* L. Kebangsaan Malaysia, Selangor, Malay. *Journal of Essential Oil Research*, 1(5), 203-207.
221. Yari M, Masoudi S, Rustaiyan A. 2000. Essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk) A. Juss grown wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 69-70.
222. Yen GC, Hung CY. 2000. Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tsoa (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Food Research International*, 33(6), 487-492.
223. Young JM, Park YH, Lee YU, Kim HJ, Shim YH, Ahn JH, Lim YHJ. 2007. Antimicrobial effects of flavone analogues and their structure-activity relationships. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 530-533.
224. Yu-Ling, L, Yang JH, Mau JL. 2008. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chemistry*, 106(3), 1128-1137.
225. Zaouali Y, Chograni H, Trimech R, Boussaid M. 2013. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. Organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 43, 412-419.
226. Zeichen de Sa R, Rey A, Arganaraz E, Bindstein E. 2000. Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 93-98.
227. Zhang Y, Shi P, Qu H, Cheng Y. 2007. Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(18), 2971-84.
228. Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L. 2006. Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7277-7286.
229. Zohair HM, Hamed JJ, May A, Ali ZS. 1989. Insecticidal effects of *Haplophyllum tuberculatum* against *Cluex quinquefasciatus*. *Journal of Crude Drug Research*, 27(1), 17-21.

Annexes

Annexe 1 : Courbes d'étalonnage

Les courbes d'étalonnage réalisées pour les dosages de PPT, Flavonoïdes et Tanins :

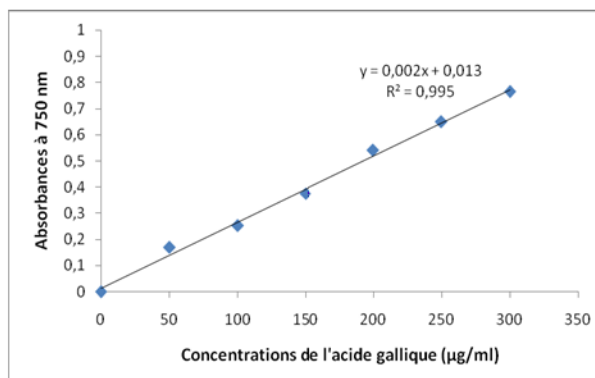


Figure 71 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols

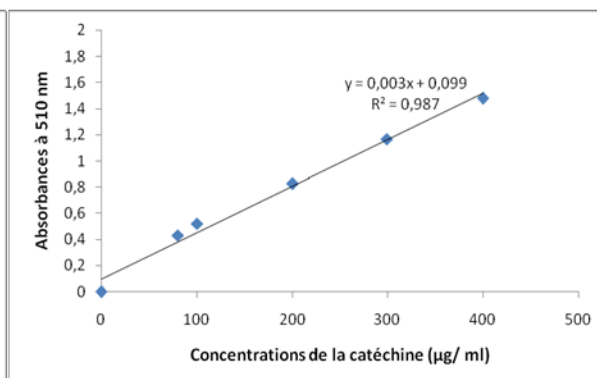


Figure 72 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

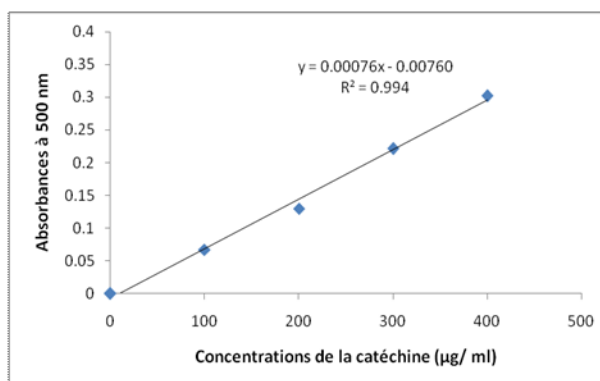


Figure 73 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins

La courbe d'étalonnage réalisée pour la détermination de la capacité antioxydante totale :

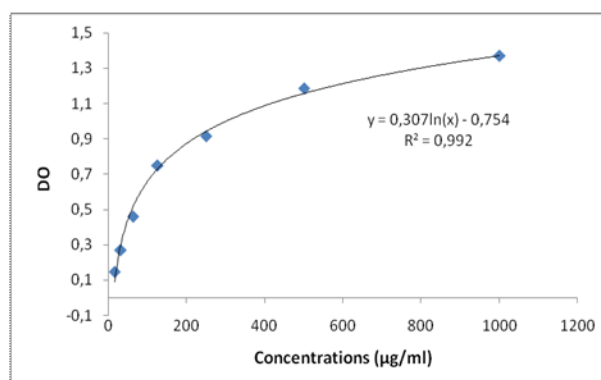


Figure 74 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale

Annexe 2 : Activité antioxydante des extraits hydro-méthanoliques d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

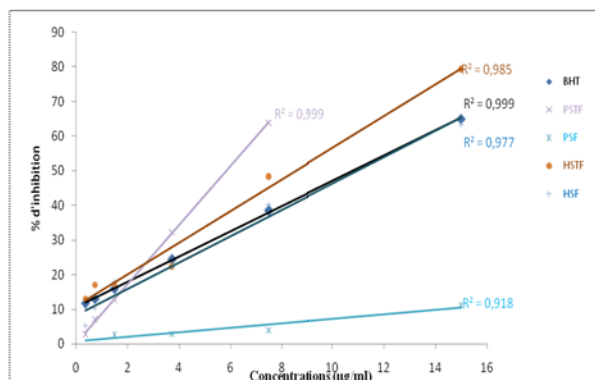


Figure 75: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH^o pour la substance de référence et les extraits testés

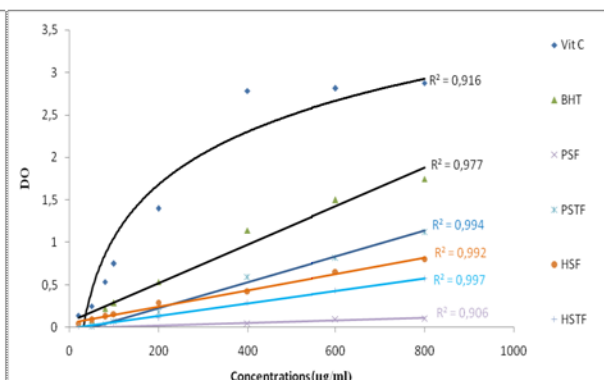


Figure 76: Pouvoirs réducteurs des standards et des extraits testés

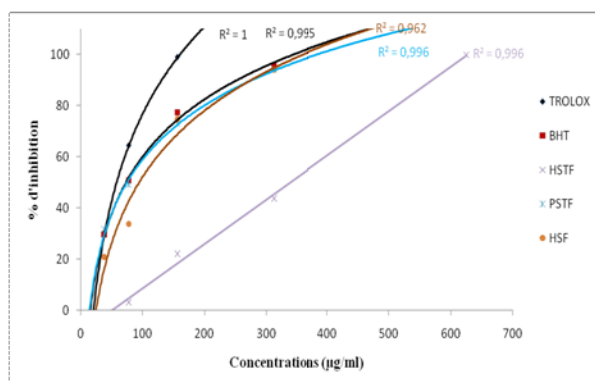


Figure 77 : Pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS^{•+} pour les substances de référence et les extraits testés

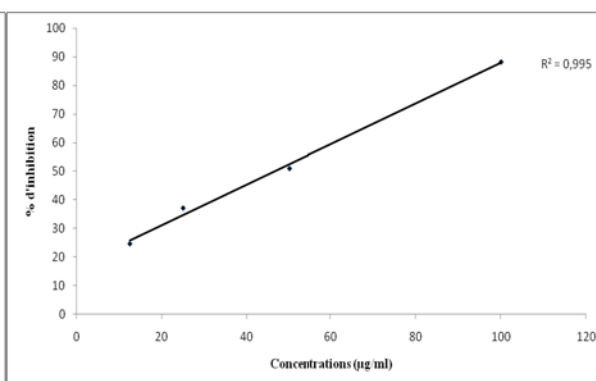


Figure 78: Pouvoir chélateur du standard EDTA

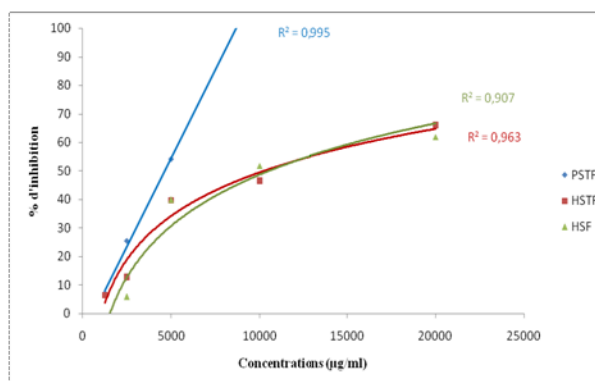


Figure 79 : Pouvoir chélateur des extraits testés

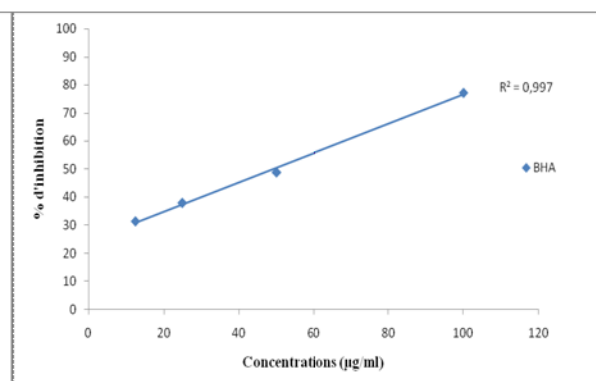


Figure 80 : Capacité du standard BHA à inhiber le blanchiment du β -carotène

BHA, BHT et Trolox: Antioxydants de synthèse, HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSF : Fleur de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

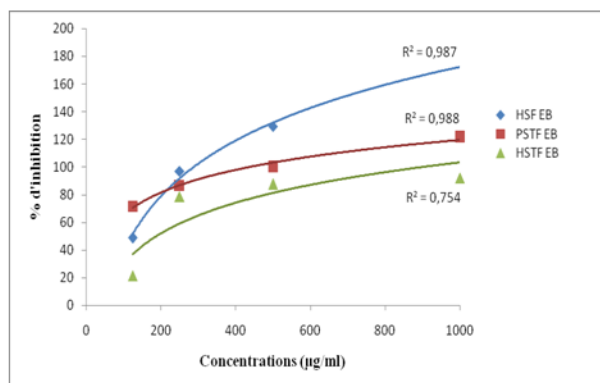


Figure 81: Capacité des échantillons à inhiber le blanchiment du β -carotène

Annexe 3 : Activité antioxydante des extraits obtenus par des extractions successives d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, et de *P. saxatile* subsp. *saxatile*

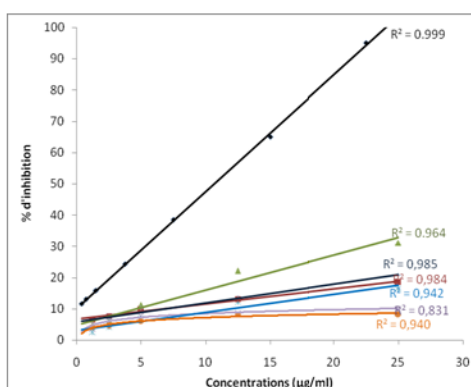


Figure 82 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH[°] pour la substance de référence et les extraits d'hexane (Hx) et de dichlorométhane (D)

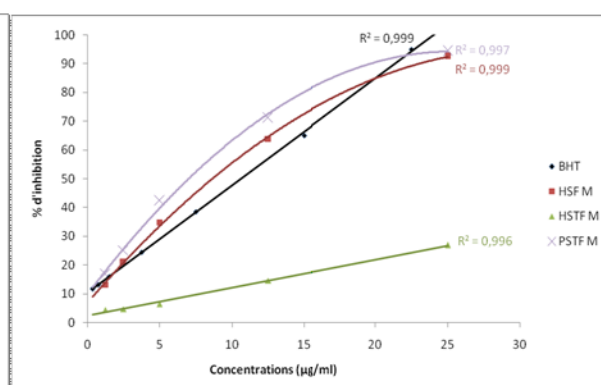


Figure 83 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH[°] pour la substance de référence et les extraits méthanoliques (M)

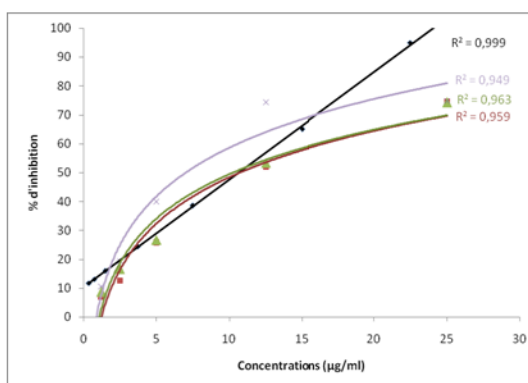


Figure 84 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH[°] pour la substance de référence et les extraits aqueux (A)

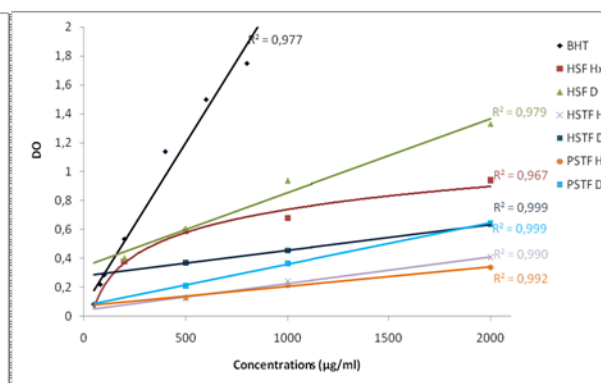


Figure 85: Pouvoirs réducteurs de la substance de référence et des extraits d'hexane (Hx) et de dichlorométhane (D)

BHT : Antioxydant de synthèse, HSF : Fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, HSTF : Tiges feuillées d'*H. stoechas* subsp. *rupestre*, PSF : Fleur de *P. saxatile* subsp. *saxatile*, PSTF : Tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile*.

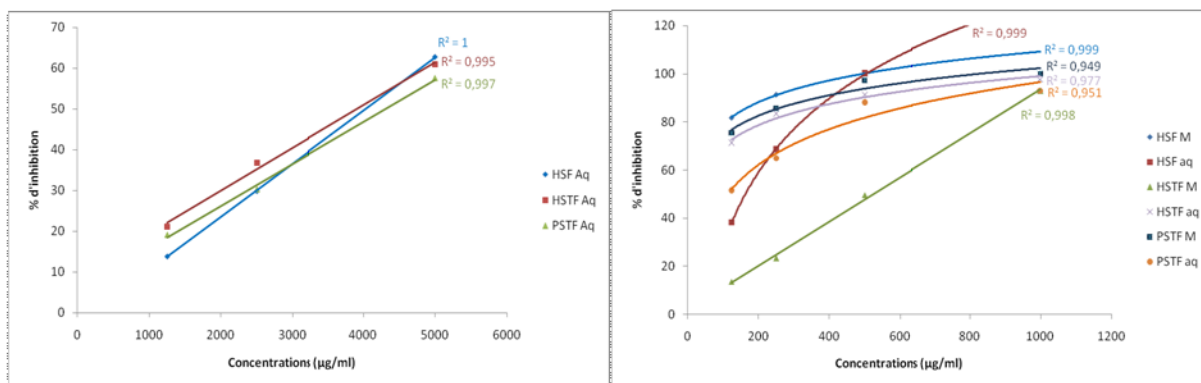
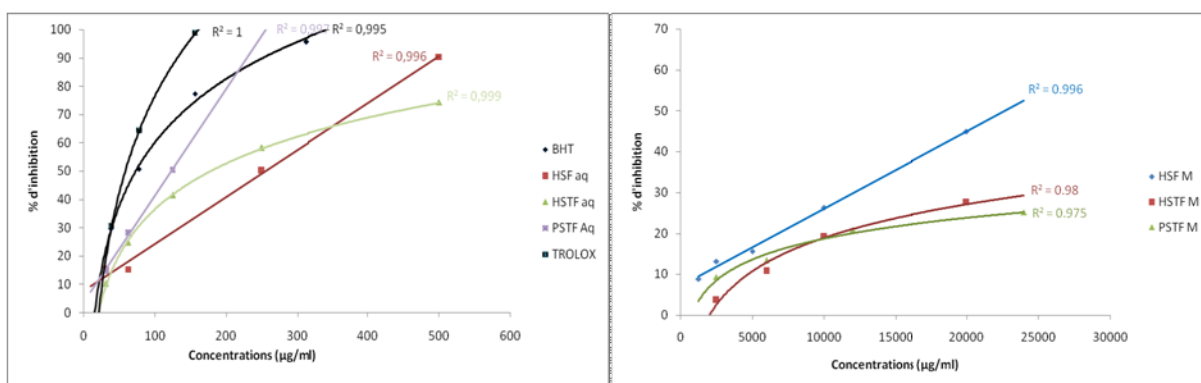
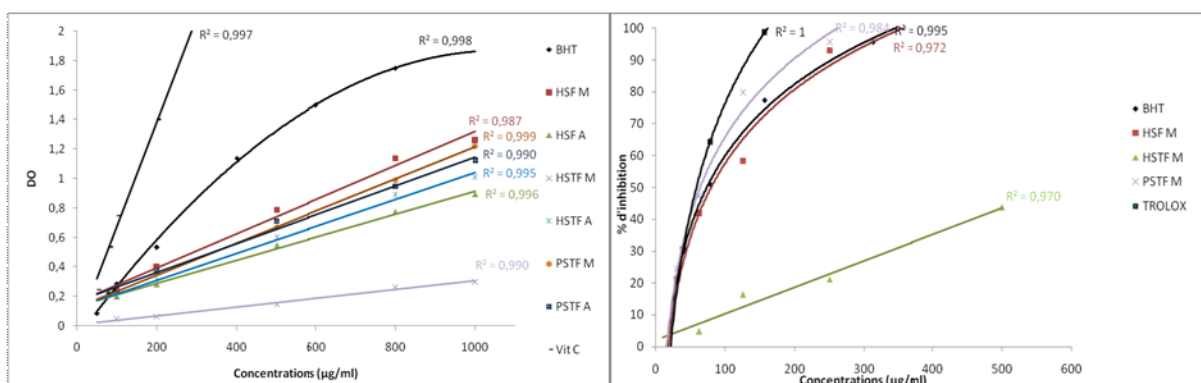


Figure 90: Pouvoir chélateur des extraits aqueux (A)

Figure 91: Capacité des échantillons méthanoliques (M) et aqueux (A) à inhiber le blanchiment du β -carotène

Trolox et BHT : Antioxydants de synthèse, HSF : Fleurs d'H. stoechas subsp. rupestris, HSTF : Tiges feuillées d'H. stoechas subsp. rupestris, PSF : Fleur de P. saxatile subsp. saxatile, PSTF : Tiges feuillées de P. saxatile subsp. saxatile.

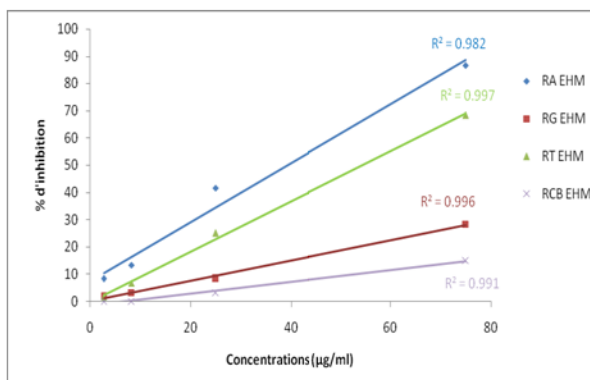
Annexe 4 : Activité antioxydante des extraits et des huiles essentielles des espèces de *Ruta*

Figure 92: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH° pour les extraits hydro-méthanoliques des espèces de *Ruta*

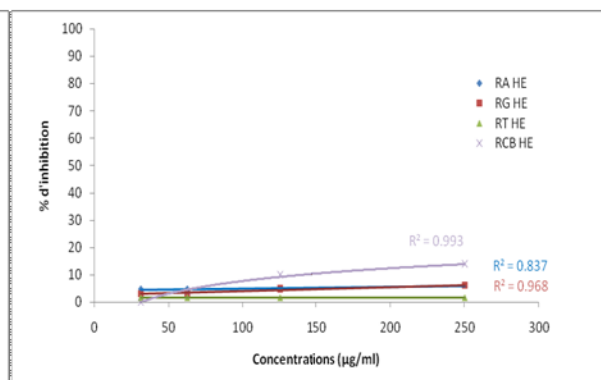


Figure 93: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH° pour les huiles essentielles des espèces de *Ruta*

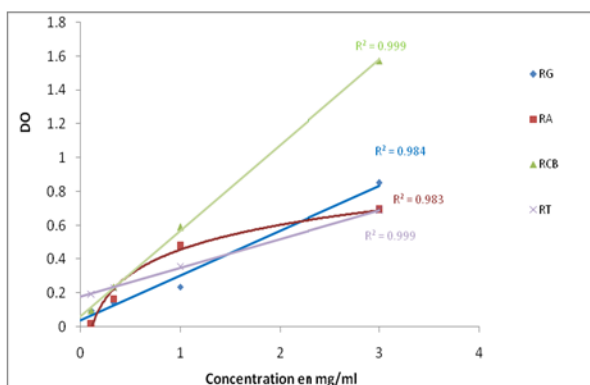


Figure 94: Pouvoirs réducteurs des extraits hydro-méthanoliques des espèces de *Ruta*

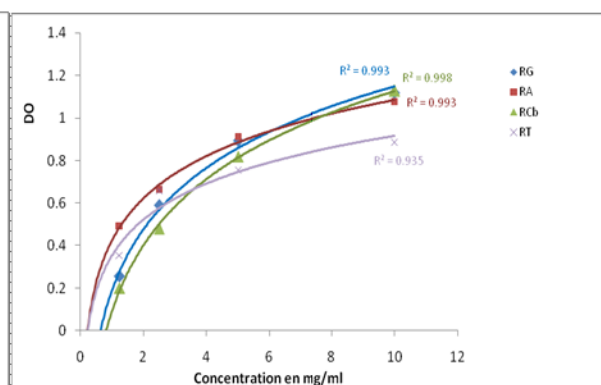


Figure 95: Pouvoirs réducteurs des huiles essentielles des espèces de *Ruta*

EHM : extrait hydro-méthanolique. HE : huile essentielle.
RCb : *R. chalepensis* var. *bracteosa*, RG : *R. graveolens*, RA : *R. angustifolia*, RT : *R. tuberculata*

Annexe 5 : Activité antifongique des huiles essentielles des espèces de *Ruta*Tableau 26 : Les pourcentages d'inhibition des champignons par les huiles essentielles des espèces de *Ruta*.

Pourcentage inhibition (%)					
Concentrations (µl/ml)	9	8	7	5	4
HE de <i>R. angustifolia</i>					
<i>Cladosporium herbarum</i>	100				89
<i>Fusarium oxysporum</i>	100		75	42	17
<i>Alternaria alternaria</i>	100	75	73	58	53
<i>Aspergillus flavus</i>	77				36
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100				
HE de <i>R. graveolens</i>					
<i>Cladosporium herbarum</i>	100		80.5	72	61
<i>Fusarium oxysporum</i>	100	73	50	27	17
<i>Alternaria alternaria</i>		52	34	27	20.5
<i>Aspergillus flavus</i>	85			79	43
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100				
HE de <i>R. chalepensis</i> var. <i>bracteosa</i>					
<i>Cladosporium herbarum</i>	100				78
<i>Fusarium oxysporum</i>	100	50	34		
<i>Alternaria alternaria</i>	100				70
<i>Aspergillus flavus</i>	100	72	64	62	61
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100		80	67	45
HE de <i>R. tuberculata</i>					
<i>Cladosporium herbarum</i>	100	87	72	65	52
<i>Fusarium oxysporum</i>	100		53	42	35
<i>Alternaria alternaria</i>			61	48	32
<i>Aspergillus flavus</i>	100			80	65
<i>Aspergillus fumigatus</i>				75	65

Valorisation des travaux de recherche

Comunications Internationales

8-9/12/2009.	1^{er} séminaire international sur l'alimentation et la qualité nutritionnelle
Tlemcen Algérie	Contrôle de qualité et activité antifongique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques originaire de l'ouest algérien. HADDOUCHI F., CHAOUCHE T., BENMANSOUR A., LAZOUNI H.A.
15-17/03/2012	3^{eme} colloque international de Biotechnologie Microbienne Innovation Technologique et Valorisation des Biomolécules.
Tanger MAROC	Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux espèces de RUTA originaire de l'ouest algérien : <i>Ruta chalepensis</i> var <i>bracteosa</i> (DC) Bois et <i>Ruta angustifolia</i> . HADDOUCHI F., ATTOU A., CHAOUCHE T., BENMANSOUR A.
21-24/03/2012	23^{eme} forum international de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques
Hammamet Tunisie	Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux espèces de RUTA originaire de l'ouest algérien : <i>Ruta chalepensis</i> var <i>bracteosa</i> (DC) Bois et <i>Ruta angustifolia</i> . HADDOUCHI F., ATTOU A., CHAOUCHE T M., BENMANSOUR A.
10-11/04/2013	4th International workshop on industrial biotechnology.
Tlemcen Algerie	Efficacy of Ruta species essential oils as antimicrobial agents. HADDOUCHI F., CHAOUCHE T M., ZAOUALI Y., KSOURI R., BENMANSOUR A.
21-23/03/2014	3^{eme} Congrès International sur les Molécules bioactives, Aliments fonctionnels et Maladies associées au stress oxydant.
Hammamet Tunisie	Capacité antioxydantes et caractérisation des polyphénols par HPLC orbitrap-MS ⁿ des extraits d' <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> d'Algérie. HADDOUCHI F., CHAOUCHE T., KSOURI R., MEDINI F., LARBAT R., BOURGAUD F., BENMANSOUR A.
24-27/03/2014.	25^{eme} Forum des Sciences Biologiques et de Biotechnologie
Hammamet Tunisie	Activités antioxydantes et analyse par HPLC orbitrap-MS ⁿ des polyphénols des extraits d' <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> d'Algérie. HADDOUCHI F., CHAOUCHE T., KSOURI R., MEDINI F., LARBAT R., BOURGAUD F., BENMANSOUR A.

Communications Nationales

11-12/04/2012 Mostaganem	3^{èmes} Journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux espèces de RUTA originaire de l'ouest algérien : <i>Ruta chalepensis</i> var <i>bracteosa</i> (DC) Bois et <i>Ruta angustifolia</i> . HADDOUCHI F., ATTOU A., CHAOUCHE T M., BENMANSOUR A.
14-15/05/2013 Tlemcen	Forum sur le développement des sciences de la vie et de l'univers Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de trois espèces de Ruta. HADDOUCHI F., CHAOUCHE T M., ZAOUALI Y., KSOURI R., ATTOU A., BENMANSOUR A.
09-10/04/2013 Mostaganem	4^{èmes} Journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante d'extraits hydro-méthanoliques d' <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>Phagnalon saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> . HADDOUCHI F., CHAOUCHE TM., KSOURI R., MEDINI F., SEKKAL FZ., BENMANSOUR A.
23/04/2014 Oran	Journée des doctorants Chemical composition and antifungal activity of the essential oils from four Ruta species growing in Algeria. HADDOUCHI F., CHAOUCHE T M., ZAOUALI Y., KSOURI R., BENMANSOUR A.
20-24/04/2014 Alger	USTHB: 40 ans de contribution au développement du pays Activité antimicrobienne de quelques extraits d' <i>Helichrysum stoechas</i> subsp. <i>rupestre</i> et de <i>Phagnalon saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> . HADDOUCHI F., ZERHOUNI T., CHAOUCHE TM
07-08/05/2014 Mostaganem	5^{èmes} Journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie Activité antioxydante de <i>Phagnalon saxatile</i> subsp. <i>saxatile</i> et Identification de ses composés phénoliques par CLHP-DAD-ESI/SM ⁿ . HADDOUCHI F., CHAOUCHE T., KSOURI R., BENMANSOUR A, LARBAT R.
03/06/2014 Tlemcen	1^{ère} Journée Scientifique des Sciences de l'Agriculture, Environnement et Santé Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from Ruta species HADDOUCHI F., CHAOUCHE TM., ZAOUALI Y., KSOURI R., BENMANSOUR A.



Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria



Farah Haddouchi^{a,*}, Tarik Mohammed Chaouche^a, Yosr Zaouali^b, Riadh Ksouri^c, Amina Attou^a, Abdelhafid Benmansour^a

^aLaboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaid University, B.P. 119, Tlemcen 13000, Algeria

^bLaboratory of Plant Biotechnology, Department of Biology, National Institute of Applied Science and Technology (INSAT), B.P. 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisia

^cLaboratory of Plant Adaptation to Abiotic Stresses, Biotechnological Center in Borj-Cedria Technopol (CBBC), B.P. 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2013

Received in revised form 1 March 2013

Accepted 2 March 2013

Available online 14 March 2013

Keywords:

Antibacterial activity

Antifungal activity

Ruta species

Essential oil

GC/MS analysis

ABSTRACT

Antimicrobial properties of plants essential oils have been investigated in order to suggest them as potential tools to overcome the microbial drug resistance and the increasing incidence of food borne diseases problems. The aim of this research is to study the antibacterial and antifungal effects of four traditional plants essential oils, *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens* and *Ruta tuberculata*, against standard bacterial and fungal strains. The chemical compounds of the oils were examined by GC/MS. Results revealed a powerful antifungal activity against filamentous fungi. *Aspergillus fumigatus* and *Cladosporium herbarum* are the most sensitive strains to these oils with MIC values less than $3.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ for certain oils, reaching $7.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ for other. GC/MS essay exhibited ketones as the most abundant constituent of these oils except for *R. tuberculata* essential oil which has a completely different composition, monoterpenes alcohols being the most abundant. These compositions explain their potential antifungal activity.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of drug resistance as well as the appearance of side effects of certain antibiotics has led to the search of new antimicrobial agents mainly among plant extracts with the goal to discover new chemical structures which overcome the above disadvantages (Lewis & Ausubel, 2006). Thus, the food industry at present uses chemical preservatives to prevent the growth of food borne and spoiling microbes and to extend the life of foods. Mainly due to undesirable effects such as toxicity and carcinogenicity of synthetic additives, interest has considerably increased for finding naturally occurring antimicrobial compounds suitable for use in food (Feng & Zheng, 2007). With antimicrobial studies, the chemical composition should ideally be used to correlate any structure activity relationships (Van-Vuuren & Viljoen, 2007).

Essential oils are complex mixtures comprising many single compounds. Each of these constituents contributes to the beneficial or adverse effects of these oils. Therefore, the intimate knowledge of essential oil composition allows for a better and specially directed application (Dorman & Deans, 2000). Many oils have been identified as antimicrobials. This activity is variable of one to another and from one microbial strain to another (Kalemba & Kuniczka, 2003).

Ruta chalepensis var. *bracteosa* is characterised by its petals fringed, matching only half the width of the petals and bracts much larger than the stem to which they are attached. *Ruta graveolens* is branded by its petals not fringed and its fruit rounded, while *Ruta angustifolia* is determined by its oval leaves in their general outline, 2–3 times divided into segments oblong and ciliate-fringed sepals (Bonnier, 1999). *Ruta tuberculata* is characterised by its leaves lanceolate or often elongated and small flowers with four petals yellow (Ozenda, 1991).

The phytochemical studies conducted on these species characterise the presence of amino acids, saponins (Hnatyszyn, Arenas, Moreno, Rondina, & Coussio, 1974), alkaloids, flavonoids, coumarins, tannins, volatile oil, glycosides, sterols and triterpenes (Chen, Huang, Wang, & Ou, 2001). They are used in the traditional medicine of many countries for the treatment of a variety of diseases. Exciting, diaphoretic, antiseptic, antispasmodic, anthelmintic (Bonnier, 1999), emmenagogue, abortifacient and anti-inflammatory properties (Raghav, Gupta, Agrawal, Goswami, & Das, 2006), are assigned to *R. chalepensis* var. *bracteosa*, *R. graveolens* and *R. angustifolia*. *R. tuberculata* treats bone and joint pain, dysmenorrhea, infertility in women, anaemia and headache (Hammiche & Maiza, 2006).

In this paper we report the chemical composition and the antibacterial and antifungal activities of four *Ruta* species essential oils belonging to the family of *Rutaceae*. These are *R. chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *R. graveolens* L., *R. angustifolia* Pers.,

* Corresponding author.

E-mail address: biofar23@yahoo.fr (F. Haddouchi).



Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*

Farah Haddouchi ^{1*}, Tarik Mohammed Chaouche ¹, Riadh Ksouri ², Faten Medini ²,
Fatima Zohra Sekkal ³, Abdelhafid Benmansour ¹

¹ Laboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaid University, B. P 119, Tlemcen, 13000, Algeria;

² Laboratory of Plant Adaptation to Abiotic Stresses, Biotechnologic Center in Borj-Cedria Technopol (CBBC), B. P 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia;

³ Department of Biotechnology, Faculty of Natural Science and Life, Abdelel Hamid Ibn Badiss University, Mostaganem, 27000, Algeria

Available online 20 June 2014

[ABSTRACT]

AIM: The aqueous methanolic extracts of two plants from Algeria, *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, were investigated for their antioxidant activity.

METHOD: Total phenolics, flavonoids, and tannins were determined by spectrophotometric techniques. *In vitro* antioxidant and radical scavenging profiling was determined by spectrophotometric methods, through: Total antioxidant capacity, and radical scavenging effects by the DPPH and ABTS methods, reducing and chelating power, and blanching inhibition of the β -carotene.

RESULTS: All of the extracts showed interesting antioxidant and radical scavenging activity. The highest contents in phenolics, tannins, and the highest total antioxidant capacity as gallic acid equivalents of 97.5 ± 0.33 mg GAE/g DW was obtained for the flowers of *H. stoechas* subsp. *rupestre* extract in the phosphomolybdenum assay. An extract of the leafy stems of *P. saxatile* subsp. *saxatile* revealed the highest content of flavonoids, and the highest antioxidant activity by the radical scavenging and β -carotene assays when compared with standards. The best activity was by the scavenging radical DPPH with an IC_{50} value of 5.65 ± 0.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

CONCLUSION: The studied medicinal plants could provide scientific evidence for some traditional uses in the treatment of diseases related to the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress.

[KEY WORDS] *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*; *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*; Phenolic compounds; Antioxidant activity

[CLC Number] R965 **[Document code]** A **[Article ID]** 2095-6975(2014)06-0415-08

Introduction

When oxygen is supplied in excess, or its reduction is insufficient, reactive oxygen species (ROS) are generated. It is generally accepted that free radicals play an important role

in the development of tissue damage and pathological events ^[1].

In order to prolong the storage stability of foods, and to reduce damage to the human body, synthetic antioxidants, such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), are commonly used. However, restrictions on the use of these compounds are being imposed because of their carcinogenicity and some side effects ^[2]. Thus, evaluation of the antioxidant activity of naturally occurring substances has been the focus of interest in recent years ^[3-4]. The antioxidant activity of plants, which contain a diverse group of phenolic compounds, is mainly due to their redox proper-

[Received on] 20-Mar.-2013

[*Corresponding author] Farah Haddouchi: Tel: 213-772735216, E-mail: biofar23@yahoo.fr

These authors have no conflict of interest to declare.

Published by Elsevier B.V. All rights reserved

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent d'une part, à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes de quelques plantes d'Algérie et d'autre part à la caractérisation de ces plantes par l'étude de la composition chimique des huiles essentielles et des extraits (macérats hydro-méthanoliques, extraits obtenus successivement par soxhlet par des solvants de polarité croissante -hexane, Dichlorométhane, méthanol, eau-) par des outils d'analyse des mélanges complexes naturels. Il s'agit de deux Astéracées : *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. et *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* et de quatre Rutacées : *Ruta angustifolia* Pers., *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *Ruta graveolens* L. et *Ruta tuberculata* Forsk.

Pour les deux espèces d'Astéracées, les extraits hydro-méthanoliques, et ceux obtenus successivement par des solvants polaires, généralement le méthanol, contiennent des composés phénoliques et ont une activité antioxydante intéressante, à l'exception des fleurs de *P. saxatile* subsp. *saxatile*. Les extraits des fleurs d'*H. stoechas* subsp. *rupestre* et des tiges feuillées de *P. saxatile* subsp. *saxatile* sont les plus actifs, avec les teneurs les plus élevées en composés phénoliques. Ces activités sont comparables à celles des standards à l'exception des pouvoirs de réduction et de chélation du fer. La meilleure activité est obtenue en piégeant le radical DPPH° avec des valeurs de IC_{50} comprises entre 5.47 et 6.58 µg/mL. Une activité antifongique puissante, des huiles essentielles des espèces de *Ruta*, a été révélée contre les champignons filamenteux. *Aspergillus fumigatus* et *Cladosporium herbarum* sont les souches les plus sensibles à ces huiles avec des valeurs de CMI inférieures à 4 µl/mL pour certaines huiles, atteignant 9 µl/mL pour les autres.

La relation entre les potentiels étudiés et les compositions des extraits et des huiles essentielles a été établie, respectivement, par CLHP-SM et CG-SM. *H. stoechas* subsp. *rupestre* et *P. saxatile* subsp. *saxatile*, de l'ouest algérien, constituent une nouvelle source des dérivés d'acide hydroxycinnamique à activité antioxydante. Riches en cétones (jusqu'à 95%), les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* var. *bracteosa*, *R. angustifolia* et de *R. graveolens*, possèdent des compositions chimiques fréquemment décrites dans la littérature. En revanche, l'huile essentielle de *R. tuberculata* présente une composition différente et rarement décrite, caractérisée par la présence majoritaire des alcools monoterpéniques (40.79%). Les propriétés antifongiques de ces huiles essentielles permettent de les proposer comme un outil potentiel à surmonter le problème de l'incidence croissante de maladies d'origine alimentaire.

Mots-clés : *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*, *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, *Ruta*, activité antioxydante, activité antimicrobienne, composés phénoliques, huile essentielle, CG-SM, CLHP-SM.

ملخص

يساهم العمل المقدم، في هذه الأطروحة، من جهة في دراسة تقدير النشاطات المضادة للأكسدة، المضادة للميكروبات لبعض النباتات في الجزائر، من جهة أخرى في وصف هذه النباتات من خلال دراسة مفصلة عن التركيب الكيميائي للزيوت العطرية والمستخلصات: (مستخلصات الميثانول المائية، ومستخلصات أعدت عن طريق الإستخلاص المتعاقب باستعمال منيبت مختلفة - الهكسان، ثنائي كلوروميثان، الميثانول والماء-)، وذلك باستخدام تقنيات تحليل مركبات طبيعية معقدة. ويتعلق الأمر بنبتين من عائلة Asteraceae : *Helichrysum stoechas* و *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* : *Ruta tuberculata* Forsk. ، *Ruta graveolens* L.، *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss.، *Ruta angustifolia* Pers.، : Rutaceae subsp. *rupestre* auct فيما يخص نبتتي Asteraceae ، مستخلصات الميثانول المائية وتلك التي تنحصر عليها بالمذيبات القطبية عن طريق الإستخلاص المتعاقب، خاصة الميثانول، تحتوي على مركبات فينولية ولها نشاط مضاد للأكسدة مثير للاهتمام من خلال ستة طرق مختلفة باستثناء زهر *P. saxatile* . مستخلصات زهر *Helichrysum stoechas* والسيقان ذات الأوراق ل *P. saxatile* هي الأكثر نشاطاً، ولها أعلى المستويات من المركبات الفينولية. هذه الأنشطة هي مماثلة لمضادات الأكسدة النموذجية ماعدا في اختياري قوة تثبيط وإزالة الحديد. ولقد تم الحصول على أفضل نشاط لتثبيط جذر DPPH مع قيم IC_{50} تتراوح بين 5.47 و 6.58 µg/mL . كما تبين لنا نشاط قوي مضاد للفطريات للزيوت العطرية من أنواع *Ruta* و ذلك ضد الفطريات الخيطية *Aspergillus fumigatus* و *Cladosporium herbarum* هي السلالات الأكثر حساسية لهذه الزيوت مع قيم CMI أقل من 4 µl/mL لبعض الزيوت، وقد تصل إلى 9 µl/mL للبعض الأخر.

تم ربط نشاطات المستخلصات والزيوت العطرية والتراكيب التي تمت دراستها، على التوالي، من خلال *CG-SM*، *CLHP-SM* و *P. saxatile* و *H. stoechas* ، المتواجدة في غرب الجزائر، تمثلان مصدر جديد لمشتقات حمض hydroxycinnamique الذي يتميز بنشاط مضاد للأكسدة، حيث يمكن أن تستخدم في الوقاية من الأمراض الناجمة عن الأكسدة. الزيوت الأساسية ل *Ruta graveolens*، *R. angustifolia*، *R. chalepensis* الغنية بالكيتونات بنسب تصل حتى 95%، تختص بتراكيب كيميائية وصفت كثيراً في الأعمال السابقة. أما زيت *R. tuberculata* فلها تكوين مختلف، وندراً ما وصفت، إذ تتميز بوجود سائد لمونوتربين الكحولي (40.79%). تسمح الخصائص المضادة للفطريات لهذه الزيوت العطرية باقتراحها كأداة للتغلب على مشكلة تزايد الإصابة بالأمراض المتعلقة بالأغذية. الكلمات الرئيسية: *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct.، *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. Subsp. *saxatile*، *Ruta*، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، مركبات الفينولية، الزيوت العطرية، *CG-SM*، *CLHP-SM*.

Abstract

The work presented in this thesis contribute one hand, the study of antioxidant and antimicrobial activities of some plants in Algeria and also in the characterization of these plants by studying the chemical composition of essential oils and extracts (hydro-methanolic macerates, extracts obtained successively by soxhlet with solvents of increasing polarity -hexane, dichloromethane, methanol, water-) by analytical tools of natural complex mixtures. There are two Asteraceae: *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* auct. and *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. subsp. *saxatile* and four Rutaceae: *Ruta angustifolia* Pers., *Ruta chalepensis* var. *bracteosa* (DC.) Boiss., *Ruta graveolens* L. and *Ruta tuberculata* Forsk.

For both species Asteraceae, aqueous-methanolic extracts, and those obtained successively by polar solvents, typically methanol, contain phenolic compounds and have an interesting antioxidant activity, with the exception of *P. saxatile* subsp. *saxatile* flowers. Extracts of *H. stoechas* subsp. *rupestre* flowers and of *P. saxatile* subsp. *saxatile* leafy stem are the most active, with the highest levels of phenolic compounds. These activities are comparable to those of standards with the exception of iron reducing power and iron chelation method. The best activity is obtained by scavenging radical DPPH° with IC_{50} values between 5.47 and 6.58 µg/mL. Potent antifungal activity of essential oils of species of *Ruta*, was revealed against filamentous fungi. *Cladosporium herbarum* and *Aspergillus fumigatus* are the most sensitive to these oils strains with MIC values below 4 µl/mL for some oils, up to 9 µl/mL for the others.

The relationship between potential studied and the compositions of the extracts and essential oils has been established, respectively, by HPLC-MS and GC-MS. *H. stoechas* subsp. *rupestre* and *P. saxatile* subsp. *saxatile*, of western Algeria, providing a new source of hydroxycinnamic acid derivatives with antioxidant activity. Rich ketones (up 95%), essential oils of *Ruta chalepensis* var. *bracteosa*, *R. graveolens* and *R. angustifolia*, possess chemical compositions frequently described in the literature. However, the essential oil of *R. tuberculata* has a different composition and rarely described, characterized by the predominant presence of monoterpene alcohols (40.79%). The antifungal properties of those essential oils allow them to provide a tool to overcome the problem of the increasing incidence of foodborne illness.

Keywords: *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*, *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*, *Ruta*, antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic compounds, essential oil, GC-MS, HPLC-MS