

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCCEN



Faculté des Sciences  
Département de Chimie  
Laboratoire des substances naturelles et bioactives

Thèse pour l'obtention du diplôme de  
**DOCTORAT EN SCIENCES**  
Option : **CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE**

Soutenue publiquement par  
**Mme AYACHI Amel née BENDIABDELLAH**  
En 2014

---

**Etudes chimique et biologique des extraits de trois *Daucus*  
(*D. crinitus*, *D. muricatus* et *D. carota* ssp *hispanicus*) de la région  
de Tlemcen**

---

<b>Président</b>	GHALEM Saïd	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examineurs :</b>	ATIK Fouzia	Professeur	Université de Tlemcen
	MUSELLI Alain	MCA	Université de Corse (France)
	BOUSALEM Smain	Professeur	Centre universitaire de Ain Temouchent
<b>Invité</b>	AINAD TABET Driss	Professeur	Université de Sidi Belabbes
<b>Co-Directeur de thèse</b>	TABTI Boufeldja	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Directeur de thèse</b>	DIB Mohammed El Amine	MCA	Université de Tlemcen

A mes parents, que dieu les garde,  
en témoignage de ma profonde affection.

Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien.  
Leur fierté à mon égard, aujourd'hui, est pour moi la meilleure des  
récompenses

Mes remerciements s'adressent également à mon mari Hicham,  
qui est la personne la plus chère à mon cœur,  
pour son soutien et sa patience durant ces années,  
qui resteront inoubliables pour nous.

Merci à mes frères et soeur : Yacine, Hakim et Wafaa,  
A ma fille Ines norhene,  
A mon fils Mohammed Nazim  
et à mes beaux parents.

Sans vous tous,  
sans votre soutien moral et votre amour...  
rien n'aurait été possible.

## Remerciement

Ce travail est l'aboutissement d'un travail réalisé au sein du laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives –*LASNABIO*- de la faculté des sciences, Université de Tlemcen, sous la direction de Monsieur **DIB Mohamed El Amine**. Je tiens à le remercier particulièrement, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la direction de ma thèse. Sa pleine disponibilité, son aide permanente, ses précieux conseils et ses connaissances scientifiques, m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Je le remercie, également, pour ses grandes qualités humaines et son soutien moral, tout au long de ces années. Cela a été un privilège pour moi, de travailler sous sa direction.

Mes remerciements vont également à monsieur le Professeur **TABTI Boufeldja**, Doyen de notre faculté, pour son appui logistique à certains moments difficiles de la réalisation de ce travail.

J'exprime ma gratitude à Monsieur le Professeur **GHALEM Saïd**, directeur du laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives –*LASNABIO*- de la faculté des sciences, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur **BOUSALEM Smain** du centre universitaire d'Ain Temouchent, à Madame le Professeur **ATIK Fouzia** du Département de biologie de l'université de Tlemcen, et à Monsieur le Professeur **AINAD TABET Driss** de l'Université de Sidi Belabbes, qui ont bien voulu examiner ce manuscrit et participer à mon jury de soutenance.

Je tiens enfin à exprimer ma gratitude et mon profond respect à Monsieur le maître de conférence **Alain Muselli** de l'université de Corte en Corse, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Jean Costa**, Directeur du laboratoire de chimie des produits naturels de l'Université de Corse pour sa contribution et son aide dans la réalisation des analyses CPG et CPG/SM. Sans cette aide, une grande partie de cette thèse n'aurait jamais pu être réalisée.

Je reste également redevable à Monsieur le Professeur **BENABADJI Nouri**, de l'université de Tlemcen, Département de biologie, et à Monsieur le Professeur **BOUAZZA M.** du laboratoire de botanique de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans l'identification du matériel végétal.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont aussi à Monsieur **DJABOU Nassim** qui a assuré une grande partie des analyses chimiques,

Mes remerciements vont aussi à Monsieur **BENDAHOU Mourad** Professeur à l'université de Tlemcen, Département de biologie et à Madame **BELLAHSENE Chafika** , qui m'ont accueillie et permis de réaliser mes activités antimicrobiennes. Je les remercie de m'avoir donné accès à leurs laboratoires et pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur aide.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.



## LISTE DES ABREVIATIONS

**H.E** : Huile essentielle

**Rdt** : Rendement

**FID** : Flame Ionisation Detector

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**CPG /SM** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**SM** : spectrométrie de masse

**HD** : Hydrodistillation

**MEPS**: Micro-Extraction en Phase Solide

**P.A** : Partie aérienne

**E.T** : Ecart type

**%** : Pourcentage

**µl**: microlitre

**CFU**: Colony forming units

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**DPPH** : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

**DMSO** : Diméthyl sulfoxide

**IC50** : concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres

**PI** : pourcentage d'inhibition

**v/v** : volume/volume

**EAG**: Equivalent en acide gallique.

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**D.** : *Daucus*

**N** : Nord

**E** : Este

**O** : Ouest

**EdT-MEPS** : Espace de Tête - Micro-Extraction en Phase Solide

## Liste des figures

**Figure I.1 :** Schéma de l'ombelle

**Figure I.2 :** Fleur du *D. carota* L.

**Figure I.3 :** Structure générale d'un diakène d'Apiacées.

**Figure I.4 :** Répartition géographique mondiale des Apiaceae.

**Figure I.5 :** Classification du genre *Daucus* dans la famille des Apiacées.

**Figure I.6 :** Feuilles et méricarpes de quelques espèces de *Daucus* en Algérie.

**Figure I.7 :** Fruits de *D. crinitus*.

**Figure I.8 :** Fleurs de *D. crinitus*.

**Figure I.9 :** Fruits du *D. muricatus* L.

**Figure I.10 :** Fleurs, feuilles et tiges du *D. muricatus* L.

**Figure I.11 :** Fleurs, feuilles et tige du *D. hispanicus* Gouan.

**Figure I.12:** Oxydation de l'acide L-ascorbique.

**Figure I.13:** Formule des  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -tocophérols.

**Figure I.14 :** Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

**Figure I.15 :** Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup>

**Figure II.1 :** Montage d'hydrodistillation

**Figure II.2 :** Dispositif MEPS.

**Figure II.3 :** Extracteur de soxhlet.

**Figure II.4 :** Forme libre et réduite du DPPH.

**Figure II.5 :** Capacité antioxydante de l'extrait méthanolique des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*

**Figure II.6 :** Capacité antioxydante de l'extrait aqueux des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

**Figure II.7:** Capacité antioxydante de l'huile essentielle des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

**Figure II.8 :** Capacité antioxydante de l'acide ascorbique.

**Figure II.9:** Principe de la méthode de diffusion des disques sur gélose.

**Figure III.1 :** Spectre de masse de l'isochavicol isobutyrate .

**Figure III.2 :** Spectre de masse de l'isochavicol 2-méthyle butyrate.

**Figure III.3:** Variation du rendement en huile essentielle des parties aériennes de

*D. crinitus* avec les trois stades de croissance.

**Figure III.4:** Pourcentage de la variation des principales classes de composés de *D. crinitus* à travers la végétation.

**Figure III.5:** Rendements des huiles essentielles des différents organes du *D. muricatus*.

**Figure III.6:** Rendements des huiles essentielles des différents organes de *D. carota ssp. hispanicus* de la région de Hafir (S9).

**Figure III.7 :** Spectre RMN <sup>13</sup>C de la myristicine.

**Figure III.8 :** Structure chimique de la myristicine.

**Figure III.9 :** ACP des compositions chimiques des huiles du *D. carota ssp. hispanicus*.

**Figure III.10 :** AC compositions chimiques du *D. carota ssp. hispanicus* d'Algérie.

**Figure III.11:** Rendements (%) des huiles essentielles des racines de *D. carota ssp. hispanicus* en fonction des zones de récolte.

**Figure III.12:** Rendements (%) des huiles essentielles des parties aériennes de *D. carota ssp. hispanicus* en fonction des zones de récolte.

**Figure IV.1 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique à différentes concentrations.

**Figure IV.2 :** Comparaison entre les polyphénols totaux et les flavonoïdes.

**Figure IV.3 :** Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur du DPPH.

**Figure IV.4 :** Comparaison des concentrations IC50 des extraits de *D. crinitus*.

**Figure IV.5 :** Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des parties aériennes de *D. crinitus* durant les trois stades végétatifs.

**Figure IV.6 :** Activité antimicrobienne des insaponifiables de *D. crinitus*.

**Figure IV.7:** Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de *D. crinitus*.

**Figure IV.8:** Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *D. crinitus*.

**Figure IV.9 :** Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des racines et des parties aériennes de *D. muricatus*.

**Figure IV.10 :** Activité antimicrobienne des racines et des parties aériennes de *D. carota ssp. hispanicus*.

**Figure IV.11 :** Effet de l'huile essentielle du *carota ssp. hispanicus* contre Les champignons pathogènes de *A. flavus*.

**Figure IV.12 :** Pourcentage des zones d'inhibitions du mycélium en fonction des concentrations de l'huile essentielle de *D. carota ssp hispanicus*.

## Liste des tableaux

**Tableau I.1 :** Principaux composants des huiles essentielles du *D. carota* des différentes origines signalé précédemment

**Tableau I.2:** Quelques composés phénoliques à activité antioxydante dans les épices.

**Tableau I.3 :** Structures de quelques antioxydants synthétiques

**Tableau II.1 :** Données expérimentales pour le dosage des flavonoïdes.

**Tableau III.1 :** Composition chimique des huiles essentielles des racines et des feuilles de *D. crinitus*.

**Tableau III.2 :** Composition chimique des huiles essentielles des tiges, ombelles et fleurs du *D. crinitus*.

**Tableau III.3:** Influence des paramètres de Edt-MEPS (température d'extraction, temps d'équilibre et d'extraction) dans les composés volatiles du *D. crinitus*

**Tableau III.4 :** Composés volatils extraits par Edt-MEPS des racines du *D. crinitus* Desf

**Tableau III.5 :** Composés volatils extraits par Edt-MEPS des feuilles et des tiges du *D. crinitus* Desf.

**Tableau III.6:** Composés volatils extraits par Edt-MEPS des ombelles et des fleurs du *D. crinitus* Desf.

**Tableau III.7 :** Compositions chimiques des huiles essentielles de *D. crinitus* au cours des trois stades de développement.

**Tableau III.8 :** Rendement des extraits (Tiges, feuilles et racines) du *D. Crinitus*.

**Tableau III.9 :** Acides gras des extraits des racines, tiges et feuilles du *D. crinitus*.

**Tableau III.10:** Composition chimique de la fraction insaponifiable des feuilles, tiges et des racines de *D. crinitus*.

**Tableau III.11 :** Composition d'huile essentielle des racines, feuilles, tiges, fleurs et ombelles du *D. muricatus*

**Tableau III.12 :** Composés volatils du *D. muricatus* extraits par Edt-MEPS.

**Tableau III.13:** Informations concernant les lieux de récolte du *D. carota ssp. hispanicus*.

**Tableau III.14 :** Structure et données spectrales ( $\delta$ , ppm dans  $\text{CDCl}_3$ ) en RMN du Carbone-13 de la myristicine.

**Tableau III.15:** Composition de l'huile essentielle des racines, des parties aériennes, des feuilles, tiges et fleurs du *D. carota ssp. hispanicus*.

**Tableau III.16:** Composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes du *D. carota ssp. hispanicus* Gouan des dix stations de l'ouest Algérien.

**Tableau III.17:** Analyse de cluster des échantillons des racines du *D. carota ssp. hispanicus* de l'analyse statistique.

**Tableau IV.1:** Prospection phytochimique des extraits de *D. crinitus*.

**Tableau IV.2 :** Résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits de *D. crinitus*.

**Tableau IV.3:** Capacité antioxydante de l'extrait méthanolique des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

**Tableau IV.4:** Capacité antioxydante de l'extrait aqueux des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

**Tableau IV.5:** Capacité antioxydante de l'huile essentielle des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

**Tableau IV.6 :** Capacité antioxydante de l'acide ascorbique.

**Tableau IV.7 :** Concentrations minimales inhibitrices CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) des extraits des insaponifiables, méthanolique et aqueux de *D. crinitus*.

**Tableau IV.8 :** Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *D. muricatus*.

**Tableau IV.9 :** Activité antimicrobienne de *D. carota ssp. hispanicus* utilisant la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

**Tableau IV.10:** Effet de l'huile essentielle de *D. carota ssp. hispanicus* contre les champignons pathogènes *A. flavus* par la technique de petriplate inversé

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : PARTIE THEORIQUE</b>	
I. Famille des Apiacées	4
I.1. Généralités sur la famille des Apiacées	4
I.2. Morphologie des Apiacées	4
I.3. Distribution de la famille des Apiacées à travers le monde	7
I.4. Intérêt de la famille des Apiacées	8
I.5-Démarche bibliographique de sélection des plantes	9
II. Le genre <i>Daucus</i> L.	10
II.1-La classification du genre <i>Daucus</i> dans la famille des Apiacées	10
II.2. Répartition du genre <i>Daucus</i>	11
II.3. Les principales caractéristiques du genre <i>Daucus</i>	12
II.4-Liste des <i>Daucus</i> recensées en Algérie	13
II.5. Travaux scientifiques réalisés sur le genre <i>Daucus</i>	14
II.5.1. <i>D. carota</i> L.	14
II.5.2. <i>D. carota</i> ssp <i>carota</i>	16
II.5.3. <i>D. carota</i> ssp <i>maximus</i>	17
II.5.4. <i>D. carota</i> ssp <i>maritimus</i>	19
II.5.5. <i>D. gingidium</i> L. ssp. <i>gingidium</i>	19
II.5.6. <i>D. carota</i> L. ssp. <i>sativus</i>	20
II.5.7. <i>D. glaber</i> Forssk.	21
II.5.8. <i>D. carota</i> L. ssp. <i>halophilus</i> (Brot.) A. Pujadas	22
II.5.9. <i>D. reboudii</i> Coss	22
III. Etude botanique des trois espèces étudiées du genre <i>Daucus</i> L	24
III.1. <i>D. crinitus</i> Desf.	24
III.1.1. Classification systématique et nom vernaculaire	24
III.1.2.Description botanique de la plante	25
III.1.3.Domains d'application et intérêt en phytothérapie	27
III.1.4.Distribution	27
III.2. <i>D. muricatus</i> .	28
III.2.1.Classification systématique et nom vernaculaire	28
III.2.2.Description botanique de la plante	28
III.2.3.Distribution	29
III.3. <i>D. carota</i> L. subsp. <i>hispanicus</i> (Gouan)	30
III.3.1.Classification systématique et nom vernaculaire	30
III.3.2.Description botanique de la plante	30
III.3.3.Distribution	31
IV. Activités biologiques	31
IV.1. Activité antioxydante	31
IV.1.1.Les antioxydants	31
IV.1.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques	32

IV.1.3. Le stress oxydant	32
IV.1.4. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes <i>in vitro</i>	33
IV.1.5. Antioxydants d'origine naturelle	33
a. L'acide ascorbique et ses dérivés	33
b. Tocophérols	34
c. Composés phénoliques extraits de végétaux	35
IV.1.6. Antioxydants synthétiques	35
IV.1.7. Mécanisme d'action	36
IV.1.8. Essais de l'activité antioxydante dans les aliments	37
IV.2. Activité antimicrobienne	37
IV.2.1. Introduction	37
IV.2.2. Variation de la composition de l'huile essentielle	38
IV.2.3. Les principes actifs antibactériens	39
IV.2.4. Le mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles	40
IV.2.5. Matrice biologique	42
IV.2.6. Micro-organismes utilisés dans nos tests antimicrobiens	42
a. Souches bactériennes utilisées	42
b. Souches fongiques utilisées	44
IV.2.7. Méthodes d'évaluation des activités antimicrobiennes	46
IV.2.8. Expression des résultats	46
IV.2.9. Les concentrations critiques	46
a. Concentration Minimale Inhibitrice CMI	46
b. Concentration Minimale Bactéricide CMB	47
c. Notion du bactéricide et bacteriostase	47
Références bibliographiques	48

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

I. Provenance du matériel végétal et identification	59
II. Méthodes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles	60
II.1- Hydrodistillation	61
II.2- Extraction des composés volatils : Micro extraction en phase solide «MEPS»	62
III. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles	64
III.1- Analyse par CPG/FID	64
III.2- Couplage CPG/Spectrométrie de masse	64
III.3- Résonance magnétique nucléaire (RMN)	64
IV. Méthodologie d'analyse	65
V- Etudes statistiques	66
VI- Criblage phytochimique	67
VI.1- Préparation de l'extrait aqueux et méthanolique	67
VI.2- Tests de caractérisation	68
VII. Extraction des acides gras et des insaponifiables	70
VII.1- Préparation des échantillons	70
VII.2- Extraction des insaponifiables	70
VII.3- Extraction des acides gras	70

VIII. Calcul du rendement	70
IX. Dosage des phénols totaux	71
IX.1-Protocole	71
IX.2-Dosage des flavonoïdes	71
X. Évaluation de l'activité antioxydante	72
X.1. Test DPPH	72
X.2-Expression des résultats	73
XI. Activité antimicrobienne	76
XI.1- Les micro-organismes et les conditions de culture	76
XI-2 Milieux de culture et conservation des souches	76
XI.3-Préparation des pré-cultures	77
a-Pré-cultures des bactéries et des levures	77
b-Pré-cultures des moisissures	77
XI.4-Activité antibactérienne	77
a-Méthode de diffusion des disques sur gélose	77
b-Détermination de la concentration minimale inhibitrice	78
XI.5-Activité antifongique : Méthode directe	79
Références bibliographiques	80

### **CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES**

I. Introduction	82
II. Huiles essentielles du <i>D. crinitus</i>	82
II.1. Provenance du matériel végétal et identification	82
II.2. Extraction des huiles essentielles et de la fraction volatile	82
II.3. Composition chimique de l'huile essentielle du <i>D. crinitus</i>	83
II.4. Analyse des composés volatils par Edt-MEPS	89
II.4.1. Optimisation des paramètres	89
II.4.2. Analyses de fractions volatiles	90
II.4.3. Comparaison entre les deux méthodes	100
II.4.4. Conclusion	101
II.5. Etude de l'Huile Essentielle du <i>D. crinitus</i> durant les trois stades végétatifs de la plante	102
II.5.1. Caractérisation chimique	102
II.5.2. Composition chimiques des trois huiles essentielles	103
II.6. Extraction des acides gras et des insaponifiables	107
II.6.1. Les acides gras des feuilles, des tiges et des racines du <i>D. crinitus</i>	108
II.6.2. Fraction insaponifiable des feuilles, tiges et racines de <i>D. crinitus</i>	110
III. Huiles essentielles de <i>D. muricatus</i>	112
III.1-Composition chimique de l'huile essentielle	113
III.2. Analyse des composés volatiles par Edt-MEPS	117
III.2.1. Conditions Edt-MEPS	117
III.2.2. Analyse Edt-MEPS	117
III.2.3. Comparaison entre les deux méthodes	121
IV. Huiles essentielles de <i>D. carota ssp. hispanicus</i> Gouan : Description d'un	121



nouveau chémotype	
IV.1. Extraction des huiles essentielles	122
IV.2. Compositions chimiques des huiles essentielles du <i>D. carota ssp. hispanicus</i>	123
IV.3. La variabilité chimique des huiles essentielles du <i>D. carota ssp. hispanicus</i>	127
IV.4. L'analyse en composantes principales et l'analyse de cluster	132
IV.5. Corrélation entre la variabilité chimique des huiles essentielles et les paramètres environnementaux des points d'échantillonnage	134
IV.6. Conclusion	138
Références bibliographiques	139

## CHAPITRE IV : PARTIE BIOLOGIQUE

I. Investigation phytochimique et activité antioxydante des extraits de <i>D. crinitus</i>	141
I.1. Criblage phytochimique	141
I.2. Estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux	142
I.3. Activité antioxydante	144
I.4. Résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits de <i>D. crinitus</i> :	144
I.5. Conclusion générale	148
II. Activité antimicrobienne	149
II.1. Introduction	149
II. 2. Résultats et interprétations	150
II.2.1-Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du <i>D. crinitus</i>	150
II.2.2. Activité antimicrobienne des acides gras et des fractions insaponifiables du <i>D. crinitus</i>	152
a- Méthodes de diffusion des disques	152
b- Les concentrations minimales inhibitrices	153
II.2.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>D. muricatus</i>	155
a- Méthode de diffusion	155
b- Les concentrations minimales inhibitrices	156
II.2.4- <i>D. carota ssp. hispanicus</i>	157
II.2.4.1. Résultats de l'activité antibactérienne	157
a- Méthode de diffusion	157
b- Concentrations minimales inhibitrices	158
II.2.4.2. Résultats de l'activité fongicide	159
II.3. Conclusion	162
Références bibliographiques	163
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>167</b>

## Introduction

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention des substances actives. Elles représentent une source de revenus non négligeables pour de nombreuses populations.

Plusieurs pathologies apparaissent grâce à l'usage intensif des produits synthétiques. C'est pour cela qu'il y a actuellement une tendance claire vers l'utilisation des produits naturels en tant que composés alternatifs pour la lutte contre les maladies et les organismes nuisibles. Par conséquent, la recherche de nouveaux produits naturels y compris les extraits végétaux, qui pourraient substituer les produits synthétiques, semble être importante.

Parmi les produits végétaux, les huiles essentielles, riches en terpènes et en composés non-terpéniques, possèdent des propriétés biologiques diverses et intéressantes. Elles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives. De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques.

Dans cette étude on s'intéresse à une famille de plantes autrefois appelée Ombellifères en référence à leur inflorescence en forme d'ombelles et qui est aujourd'hui nommée Apiacées, et on s'intéresse plus précisément au genre *Daucus*. Ce genre est connu pour sa richesse en huiles essentielles, de plus il est très répandu dans le bassin méditerranéen, en particulier en Algérie. Plusieurs enquêtes portent sur la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Daucus*. Cependant, il reste de nombreuses espèces et sous-espèces de *Daucus* qui n'ont pas encore été examinées. Après plusieurs recherches infructueuses, nous avons trouvé que :

- La chimie de l'espèce *D. crinitus* reste insuffisamment étudiée.

- Les deux espèces *D. muricatus* et *D. carota ssp. hispanicus* Gouan, n'ont jamais fait l'objet d'une quelconque étude chimique ou biologique. Il s'agit pour nous de contribuer à une meilleure connaissance de ces trois plantes. Dans cette optique, nos principaux objectifs se résument comme suit:

- Extraction des huiles essentielles des trois espèces du genre *Daucus*.

-Détermination de leur composition chimique par les différentes méthodes d'analyses : CPG-SM, CPG-Ir et Spectrométrie de Masse (SM).

-Évaluation, in vitro, des activités biologiques : antibactérienne, antifongique et antioxydante.

-Identification du ou des composés responsables de l'activité globale de l'huile essentielle.

La présente thèse se subdivise en quatre chapitres :

Dans le **premier chapitre**, nous avons effectué une recherche bibliographique portant sur :

- La famille des apiacées, son intérêt, sa répartition à travers le monde ainsi que les démarches bibliographiques de la sélection des plantes.

- Une étude bibliographique concernant le genre *Daucus*, sa classification, sa répartition et ses principales caractéristiques, ainsi que les différentes espèces de ce genre recensées en Algérie.

- Une description botanique des trois espèces *Daucus* : *D. crinitus*, *D. muricatus* et *D. carota ssp. hispanicus* Gouan .

- Une étude chimique et biologique des travaux scientifiques antérieurs réalisés sur le genre *Daucus*.

-Enfin, une partie théorique concernant l'activité antioxydante et antimicrobienne.

Le **deuxième chapitre** porte sur une description du matériel utilisé, la démarche expérimentale et les méthodes employées pour :

- L'extraction des huiles essentielles et des extraits (aqueux et méthanolique) ainsi que les méthodes d'identification de ces derniers,

- Le criblage phytochimique et la quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux des différents extraits par spectrophotomètre

- L'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits et de l'huile essentielle.

Le **troisième chapitre** concerne l'extraction des fractions volatiles (huile essentielle) et des extraits, qui prend en compte plusieurs facteurs (aspects botaniques, lieu de récolte, mode d'extraction, variabilité chimique). Le domaine de la recherche scientifique ne se limite plus qu'à une seule et même technique d'extraction.

Ainsi, la complémentarité des différentes méthodes d'extraction est souvent mise en œuvre dans un but de connaissance complète d'une plante médicinale.

Le **quatrième chapitre** comporte une partie expérimentale biologique qui met en évidence l'évaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydante des huiles et des extraits des trois espèces étudiées.

En **conclusion**, nous énumérons les résultats obtenus à travers les études chimiques et biologiques des trois plantes étudiées.

# *Chapitre I*

## *Partie bibliographique*

## **I. Famille des Apiacées**

### **I.1. Généralités sur la famille des Apiacées**

Autrefois appelées Ombellifères (reconnaisables par leur inflorescence en ombelle), les Apiacées comptent environ 3.000 espèces réparties en 420 genres, pour la plupart des herbacées. Les Apiacées sont faciles à reconnaître mais sont pourtant difficiles à distinguer entre elles (exemple parmi d'autres de la cigüe (*Conium maculatum* L.) avec la carotte sauvage (*D. carota* L.) [1].

### **I.2. Morphologie des Apiacées**

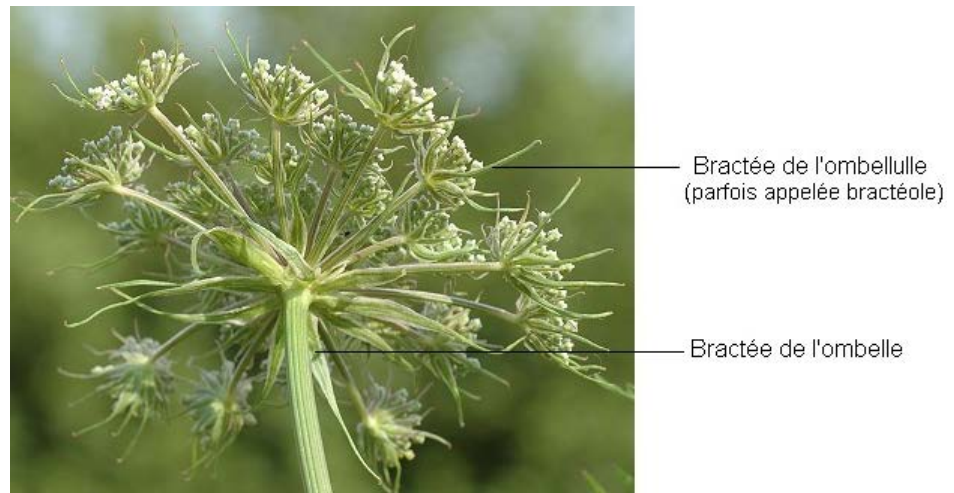
Les plantes de la famille des Apiacées sont essentiellement des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou le plus souvent vivaces. Elles sont à quelques exceptions près, toutes herbacées, rarement ligneuses et arbustives, à plan floral fixe, à fleurs hermaphrodites, rarement dioïques ou polygames, disposées en ombelles, souvent munies à la base d'un verticille de bractées (involucre) ou composées de plusieurs ombelles simples (ombellules) presque toujours pourvues de bractéoles (involucelle) [2].

**Organes souterrains:** Ce sont souvent des racines pivotantes, dures (persil, fenouil) pouvant même se tubériser (carotte) et ayant au collet une structure de tiges se prolongeant sans discontinuer en un pivot radicaire portant des racelles ou de petite racines secondaires.

**Les tiges :** Tiges à entre-nœuds souvent creux; à canaux sécréteurs, contenant des huiles essentielles, des résines, des saponines triterpéniques, des coumarines, des polyacétylènes, des monoterpènes et des sesquiterpènes; de l'umbelliférose (un trisaccharide) comme matière de réserve. Ces tiges portent à l'extérieur des sillons dans le sens de la longueur (tiges cannelées).

**Les feuilles :** Les feuilles sont alternes, sans stipules, pennées ou palmées et le plus souvent composées à folioles profondément découpées ou lobées, mais certaines espèces ont des feuilles entières (buplèvre par exemple), à nervation pennée à palmée. Les pétioles sont souvent élargis à leur base, engainant la tige [2].

**Les ombelles :** Une ombelle est une inflorescence où tous les pédoncules floraux partent du même point. L'ombelle est souvent composée d'ombellules. Cette structure est particulièrement bien représentée dans la famille des Apiacées, autrefois appelées Umbellifères. A la base des rayons de l'ombelle et des ombellules on peut trouver des bractées. On appelle involucre l'ensemble des bractées de l'ombelle et involucelle l'ensemble des bractées, parfois appelées bractéoles, de l'ombellule.



**Figure I.1 :** Schéma de l'ombelle

L'ombelle peut être pourvue d'une fleur terminale au centre de l'inflorescence. Cette fleur diffère des autres par son pédoncule plus court, son organisation florale et sa couleur. Ainsi, la carotte (*D. carota* L.) possède une fleur centrale rouge-noir stérile [2].



**Figure I.2 :** Fleur du *D. carota* L.

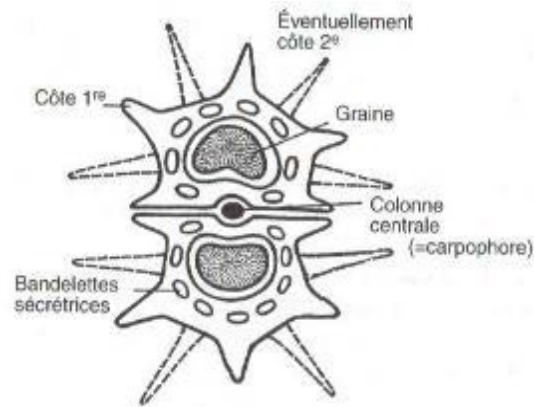
**Les fleurs :** Les fleurs sont généralement blanches et plus rarement jaunâtres, verdâtres ou rosées. Leur disposition en inflorescence relativement condensée explique qu'elles soient généralement de petite taille à cinq parties; les pétales toutes de même taille ou nettement irrégulières, les fleurs externes d'une ombelle pouvant avoir des pétales externes nettement plus grands que les autres [2].

**L'Ovaire :** Ovaire infère à placentation généralement axile; styles plus ou moins renflés à la base, formant un organe nectarifère (le stylopode) au sommet de l'ovaire; stigmates généralement de 2 à 5, réduits, capités à tronqués, ou allongés [2].

**Les Ovules :** Un ovule par loge, unitégumentés et ténuinucellés ou plus rarement crassinucellés [2].

**Le fruit :** Le fruit est un diakène (double méricarpe indéhiscent) où la paroi du fruit est constituée par la base des verticilles floraux externes et par la paroi des carpelles. Les deux méricarpes, habituellement soudés et surmontés des restes du style se séparent bientôt de bas en haut d'une columelle centrale qui les maintient unis. Chaque méricarpe présente une face commissurale plane et une face dorsale, plus ou moins arrondie, qui porte cinq côtes longitudinales saillantes : une dorsale, deux latérales et deux marginales (ce sont les côtes primaires). Sur la face commissurale, chaque méricarpe possède deux nervures et deux faisceaux. Entre deux côtes primaires existe une dépression (vallécule) où l'on trouve une ou plusieurs poches sécrétrices allongées ou bandelettes qui sont propres à la paroi du fruit. Par ailleurs, les différentes formes du fruit ainsi que la présence ou l'absence de bandelettes, leur nombre, leur évolution sont autant de critères permettant la classification des différentes espèces au sein de cette famille [2].

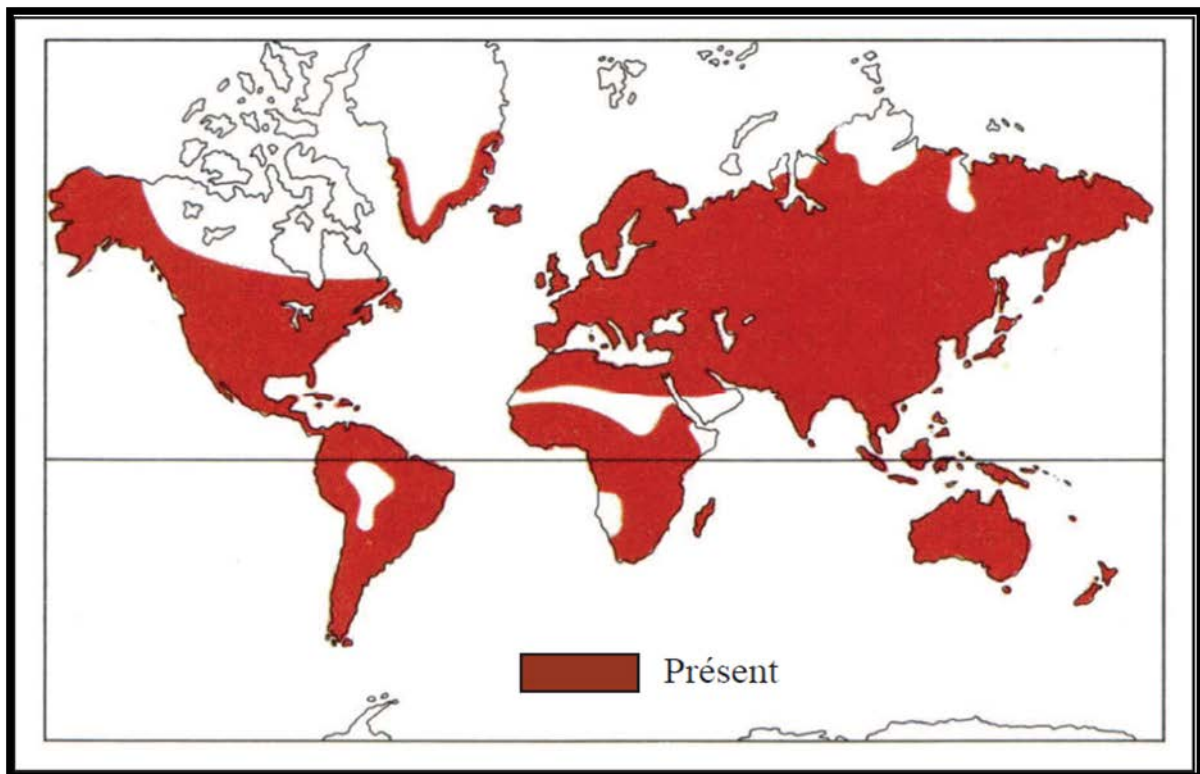




**Figure I.3 :** Structure générale d'un diakène d'Apiacées [2].

### I.3. Distribution de la famille des Apiacées à travers le monde

La famille des Apiacées renferme environ 300 genres pour plus de 2500 espèces. La famille est répartie sur la majeure partie du globe (figure I.4), plus commune dans les régions montagneuses tempérées et relativement rare en zone tropicale [3]. Les genres se répartissent entre les divers continents, avec une prédominance pour le continent asiatique (265), Amérique (197), Europe (139), Afrique (126), Australie (36) [4].



**Figure I.4 :** Répartition géographique mondiale des Apiaceae. [4]

La famille des Apiaceae occupe une place importante dans la flore Algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces [5].

#### **I.4. Intérêt de la famille des Apiacées**

Certaines plantes de la famille des Apiacées peuvent être utilisées comme aliments. Les racines de la carotte (*D. carota* L.), du panais (*Pastinaca sativa* L.), du maceron (*Smyrnum olusatrum* L.) et du céleri (*Apium graveolens* L.) peuvent être consommées ainsi que les feuilles de persil (*Petroselinum crispum* L.) et de céleri. Le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium* L.) est utilisé en tant que condiment. Les souches et le pétiole d'angélique (*Angelica archangelica* L.) sont utilisés en confiserie (sous forme confite) car riches en glucides [6].

Les plantes de la famille des Apiacées telles que l'aneth (*Anethum graveolens* L.), l'anis (*P. anisum* L.), l'angélique (*Angelica archangelica* L.), le carvi (*Carum carvi* L.), la coriandre (*Coriandrum sativum* L.) et le fenouil (*F. vulgare* Mill.) ont une importante activité antispasmodique [7].

*Panax quinquefolia* et *Panax ginseng* (ginseng) et diverses espèces d'*Aralia* (salsepareille sauvage) sont médicalement importants. Quelques genres contiennent des plantes décoratives utiles, y compris *Hedera* (lierre commun), et *Schefflera* (magnolier) [8].

Cette famille riche en métabolites secondaires présente des intérêts économiques et médicaux, comportant des coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques et des lactones sesquiterpéniques, ainsi qu'une grande richesse en huile essentielle dans la quasi-totalité de ses organes anatomiques.

Parmi les Apiaceae existent des espèces toxiques. La grande ciguë (*Conium maculatum*), celle qui fut fatale à Socrate, rudérale répandue en Eurasie tempérée et en Afrique du Nord, puis transportée en Amérique, contient, dans tous ses organes, un cortège d'alcaloïdes (coniine, méthylconiine, etc.) très toxiques ; cette plante est dangereuse, car très commune et facile à confondre avec d'autres espèces. Une autre espèce vénéneuse est la ciguë vireuse (*Cicuta virosa*), herbe de marécages de l'Europe

jusqu'au Japon, est beaucoup plus rare. Ses principes vénéneux sont une résine (cicutoxine) et des alcaloïdes (cicutine, etc.).

### **I.5. Démarche bibliographique de sélection des plantes**

Grâce à une recherche bibliographique faite à partir d'anciens et nouveaux ouvrages botaniques et de quelques sites internet [9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23, 24,25,26,27,28,29], pour limiter le nombre de plantes, les critères de rejets suivants ont été choisis :

- Espèce protégée.
- Existence dans l'huile essentielle de molécules toxiques ayant fait l'objet de peu d'études.
- Plante ayant fait l'objet de nombreuses études scientifiques.
- Absence d'huile essentielle dans la plante.
- Existence sous forme arborescente.

Afin de mettre en application ces différentes approches, nous nous sommes intéressés à l'étude de quelques espèces et sous-espèces d'un genre appartenant à la famille des Apiacées : le genre *Daucus*. Ce genre est connu pour sa richesse en huiles essentielles, de plus il est très répandu dans le bassin méditerranéen, en particulier en Algérie. Par ailleurs, les recherches bibliographiques sur les travaux effectués sur ces plantes ont montré que la chimie de l'espèce *Daucus* reste insuffisamment étudiée et que les études biologiques concernant cette espèce sont rares.

## **II. Le genre *Daucus* L.**

### **II.1-La classification du genre *Daucus* dans la famille des Apiacées [6]**

Empire : Eukaryota

Règne : Plantae

Sous-règne : Viridiaeplantae

Embranchement : Tracheophyta

Sous-embranchement : Euphyllophytina

Infra-embranchement : Radiatopses

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Cornidae

Superordre : Aralianae

Ordre : Araliales

Famille : Apiaceae

Sous famille : Apioideae

Tribu : Caucalideae

Genre : *Daucus*

La famille des Apiacées est très homogène et la classification des genres, basée sur des caractères tirés de l'organisation des ombelles et du fruit, se présente comme suit :

#### **I-Hydrocotylées :**

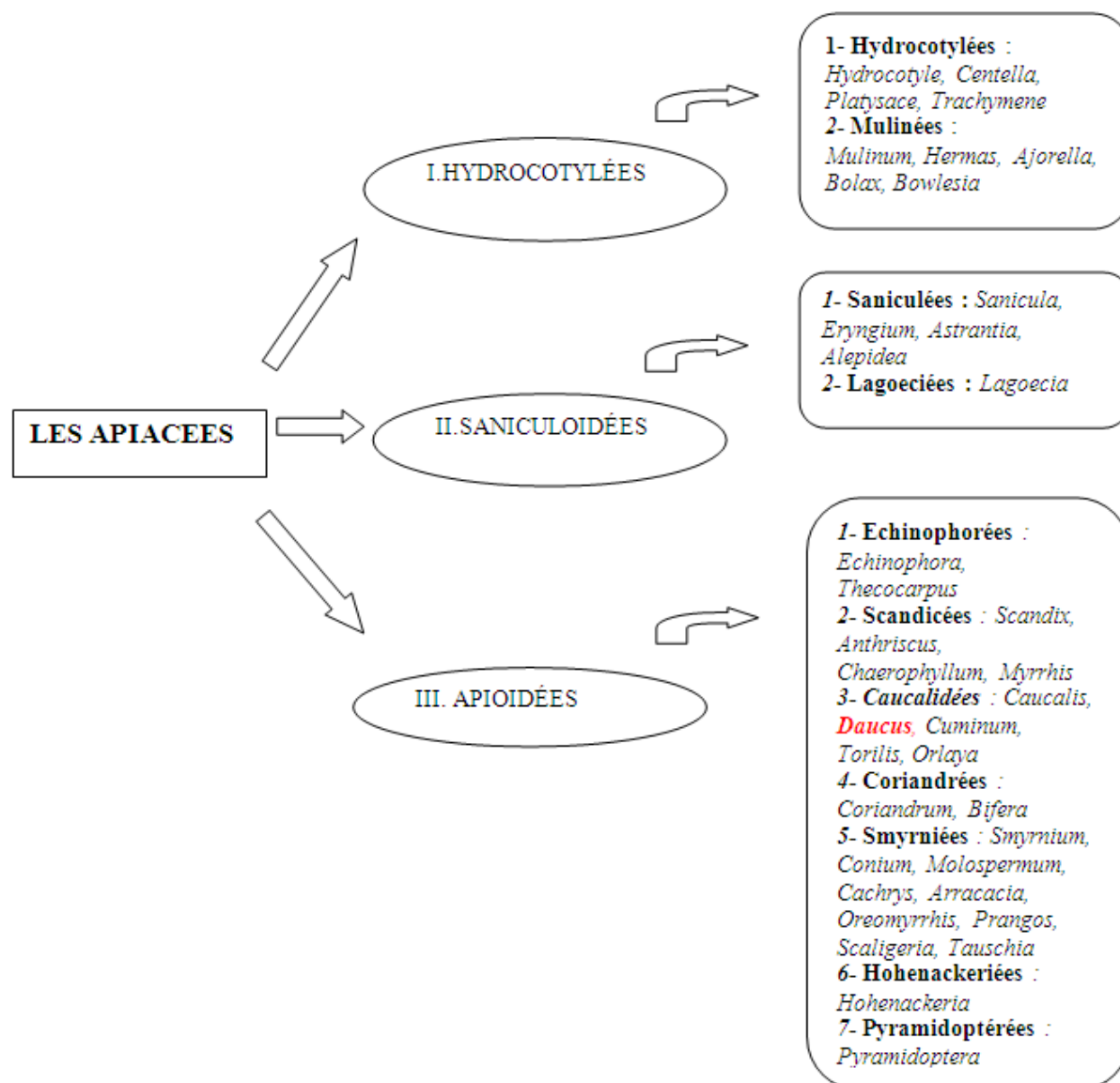
Stipules présentes; ombelle simple; fruit à endocarpe ligneux; canaux sécréteurs absents ou localisés dans les côtes primaires; espèces surtout présentes dans les montagnes tropicales et tempérées de l'hémisphère sud.

#### **II. Saniculoidées :**

Stipules absentes; ombelle simple; fruit à endocarpe mou; style surmonté par un disque annulaire.

#### **III. Apioidées :**

Stipules absentes; ombelle d'ombellules; fruit à endocarpe mou; style au-dessus du disque. L'organigramme suivant montre bien la répartition de chaque genre, l'espèce *Daucus* que nous avons étudiés appartient à la sous famille des Apioidées.



**Figure I.5** : Classification du genre *Daucus* dans la famille des Apiacées

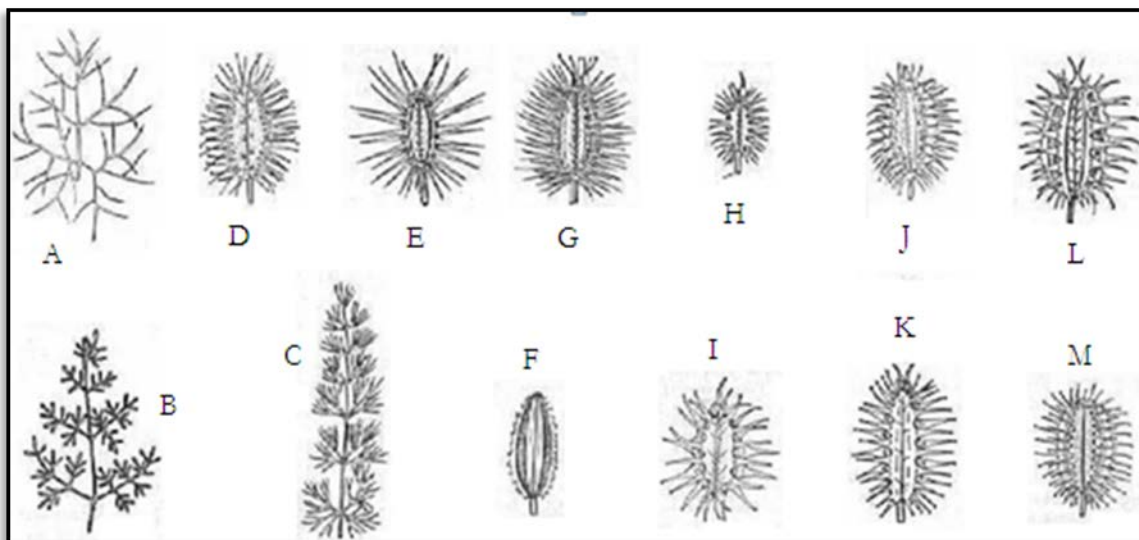
## II.2. Répartition du genre *Daucus*

Le genre *Daucus* comprend environ 30 espèces, annuelles, bisannuelles et vivaces. Le *Daucus* est considéré comme étant l'ombellifère le plus difficile à définir, parmi les quelques 3000 espèces de cette famille. Il est un genre de plantes herbacées de la famille des Apiacées (Ombellifères) dont l'espèce la plus connue est la carotte cultivée. Il est largement distribué à travers le monde. Il semble avoir son centre de dispersion dans la région méditerranéenne, particulièrement en Afrique du Nord, où la spéciation intense a eu lieu. Indépendamment de *D. carota* L., la carotte commune, qui

est cultivée dans le monde entier, il y a une espèce australienne, naturalisée également en Europe, probablement par le biais des navires, et trois autres espèces dans le continent américain. Le reste, comme nous l'avons dit, est méditerranéen [10]. En Algérie, le genre *Daucus* est représenté par des espèces vivants dans les zones arides et incultes très répandues le long de la côte ouest Algérienne [11].

### II.3. Les principales caractéristiques du genre *Daucus*

Ce genre est caractérisé par une tige solitaire dressée, ramifiée, hispide gantée en arrière. Feuilles basales pétiolées, réduites devenant sessiles vers le haut. Ombelles terminales et axillaires, peu composées; bractées nombreuses, pennées, rarement entières, généralement réfléchies; bractéoles nombreuses, dentées ou entières; ombellules fortement fleuries, fleurs centrales généralement stériles avec des pétales pourprés élargis. Pédicelles inégaux. Calice à dents obsolètes à remarquables. Pétales blancs ou jaunes, obcordés, avec un apex infléchi, pétales extérieurs en fleurs extérieures d'une ombellule élargie et radieuse. Stylopode conique; styles courts. Fruit ellipsoïde, dorsalement comprimé ; nervures principales filiformes, poilues; nervures secondaires ailées, ailes avec épines. Aspect de graine superficiellement concave à presque plat. Carpophore entier ou bifide à l'apex [12].



**Figure I.6 :** Feuilles et méricarpes de quelques espèces de *Daucus* en Algérie. (A-C) Feuilles ; (A) *D. gracilis*, (B) *D. aureus*, (C) *D. setifolius*. (D-M) Méricarpes ; (D) *D. biseriatus*, (E) *D. sahariensis*, (F) *D. virgatus*, (G) *D. gracilis*, (H) *D. carota*, (I) *D. setifolius*, (J) *D. crinitus*, (K) *D. aureus*, (L) *D. muricatus*, (M) *D. durieua*. [5]

**II.4. Liste des *Daucus* recensées en Algérie :**

<b>Espèces</b>	<b>Nom vernaculaire</b>	<b>Synonyme(s)</b>	<b>Quelques Études</b>
<i>D. carota</i> L. (sensu lato)	Carotte sauvage		Extraction de H.E et étude de l'activité antibactérienne [11].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>carota</i>	Carotte sauvage		Composition de H.E des ombelles du <i>D. carota</i> L. ssp. <i>carota</i> ) [13].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>dentatus</i>	Carotte sauvage	<i>D. alatus</i> Poiret <i>D. bocconeii</i>	Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>gingidium</i>	Carotte sauvage	<i>D. gingidium</i>	Composition de H.E du <i>D. carota</i> L. ssp. <i>gingidium</i> [14].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>mauritanicus</i>	Carotte sauvage	<i>D. commutatus</i>	Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>maximus</i>	Carotte sauvage	<i>D. mauritanicus</i>	H.E de <i>D. carota</i> ssp. <i>maximus</i> [15].
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>parviflorus</i>	Carotte sauvage	<i>D. glaberrimus</i> <i>D. micranthus</i> <i>Pomel</i>	Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>sativus</i>	Carotte sauvage		Composition chimique des huiles des ombelles du <i>D. carota</i> L. ssp. <i>sativus</i> cultivées en Pologne [16].
<i>D. crinitus</i>		<i>D. meifolius</i>	Les phenylpropanoïdes bio active du <i>D. crinitus</i> Desf. D'Algérie [17].
<i>D. durieua</i> Lange		<i>Durieua hispanica</i>	Pas d'étude
<i>D. gracilis</i>			Pas d'étude

<i>D. muricatus</i>			Pas d'étude
<i>D. reboudii</i>			Composition de H.E de l'espèce du <i>D. reboudii</i> Coss. [18a].
<i>D. sahariensis</i>		<i>D. pubescens</i>	H.E du <i>D. sahariensis</i> d'Algérie riche en myristicine [18b]
<i>D. setifolius</i>		<i>D. brachylobus</i> <i>D. setulosus</i>	Pas d'étude
<i>D. virgatus</i>		<i>D. laserpitioides</i> <i>D. = tenopterus</i> <i>Laserpitium</i> <i>daucoides</i>	Pas d'étude
<i>D. aureus</i>			Pas d'étude
<i>D. biseriatus</i>			Pas d'étude
<i>D. carota</i> L. ssp. <i>maritimus</i>	Carotte sauvage		Analyse de l'Huiles des Fleurs et des racines de <i>D. carota</i> L. ssp. <i>maritimus</i> (Tunisie) [19].

## II.5. Travaux scientifiques réalisés sur le genre *Daucus*

De précédentes investigations chimiques du genre *Daucus* ont révélé la présence de plusieurs types de composés. Les huiles essentielles de nombreuses espèces du genre *Daucus* ont également été étudiées avec en particulier l'espèce *D. carota* et ses sous espèces [20,18a].

### II.5.1. *D. carota* L.

L'huile essentielle de *D. carota* L. sauvage en provenance de la Corse a été étudiée par chromatographie gazeuse et par spectroscopie RMN du <sup>13</sup>C. Dans une première partie, l'étude a été menée sur un échantillon commercial.

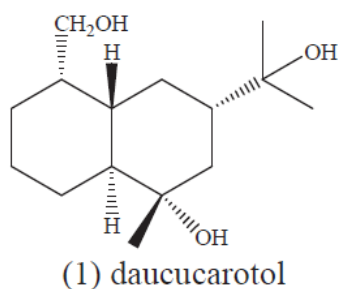
L'analyse des fractions a conduit à l'identification de 69 composants. L'huile se composait principalement de phénylpropanoïdes (45,9 %) et d'hydrocarbures



monoterpéniques (38,6 %), avec le (E) méthylisoeugénol (33,0 %),  $\alpha$ -pinène (24,9 %) et élémicine (11,4 %) comme produits majoritaires.

La deuxième partie concerne l'analyse des huiles distillées en laboratoire, obtenues à partir de différentes parties de la plante à trois stades de développement (avant la floraison, pleine floraison et à la fin de la floraison). La composition chimique de l'huile de carotte sauvage de Corse varie en fonction de son stade de développement. Les rendements en huile, ainsi que le contenu des phénylpropanoïdes, en particulier celle de (E)-méthylisoeugénol, augmenté de manière significative du début à la fin de la floraison. Ainsi le (E)-méthylisoeugénol passe de (1,5 à 41,6 %),  $\alpha$ -pinène de (29,6 à 38,0 %), le sabinène de (15,1 à 19,6 %), le myrcène de (5,5 à 6,9 %), et le limonène de (5,7 à 6,6 %). [21].

L'investigation phytochimique des fruits de *D. carota* L. a abouti à l'isolement d'un nouveau sesquiterpène nommé daucucarotol (1). Sa structure a été élucidée sur la base des expériences de RMN 1D et 2D. À noter que le composé (1) est le premier exemple d'un sesquiterpène eudesmane naturel avec un groupe hydroxyméthyle situé sur un carbone méthine alors que d'habitude on le trouve situé sur un carbone quaternaire. [22].



Un nouveau sesquiterpène alcool type daucane, le *trans*-dauc-8-ène-4b-ol, a été isolé et caractérisé à partir de l'huile de graines de carotte (*D. carota* L.). La structure et la stéréochimie de ce composé ont été établies par des méthodes spectroscopiques et chimiques. Cinq autres composés sesquiterpéniques connus : le *trans*-dauca-8,11-diène, le dauca-5,8-diène, acora-4,9-diène, acora-4,10-diène, le (E)- $\beta$ -10,11-dihydro-10,11-époxyfarnésène et le (E)-méthylisoeugénol, ont également été identifiés comme de nouveaux constituants de l'huile de graines de carotte sur la base de leurs données spectrales RMN  $^{13}\text{C}$ . [11].

Plusieurs enquêtes sur la composition chimique de l'huile essentielle de *D. carota*, ont été réalisées. En particulier, la composition de l'huile de graine de la carotte, qui a diverses applications dans la formulation de certaines boissons alcoolisées, et les parfums [17].

### **II.5.2. *D. carota* ssp *carota***

L'huile des ombelles et des fleurs de *D. carota* ssp. *carota* de Pologne était composée principalement de monoterpènes hydrocarbonés (84.0 %), et les principales composantes se sont avérées  $\alpha$ -pinène (41 %) et sabinène (18 %) [13].

La composition de l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes, comparées à trois stades de développement (stade végétatif, en pleine floraison, et ombelles mûrs), montre que toutes les huiles ont été dominées par des monoterpènes hydrocarbonés avec  $\alpha$ -pinène (16-43 %), sabinène (21-45 %) et le mycènes (4-13 %) comme les principaux composants [23].

Seules quelques études ont été réalisées sur l'activité biologique des huiles essentielles de l'espèce de *Daucus*. Les huiles essentielles des fruits de *D. carota* ssp *carota* (sauvages), présentent une activité antibactérienne contre les souches de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus b-hemolyticus* avec des valeurs de CMI (concentration minimale inhibitrice) de 0.12 à 0.90 mg/mL) [24].

Cependant l'huile des ombelles en floraison et des ombelles mures de *D. carota* ssp. *Carota* collectées dans leur habitat naturel près de Lodz en Pologne, dominée par  $\alpha$ -pinène (17-42 %) et le sabinène (19-40 %), présente des activités antibactériennes et antifongiques modérée contre les souches de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* *Bacilius*, et les *Candida albicans* avec des CMI de 3-5 mg/mL) [13].

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation et par extraction au CO<sub>2</sub> supercritique de *D. carota* L. ssp *carota* qui poussent spontanément en Italie (Sardaigne) et au Portugal (Cantanhede) ont été étudiées par Maxia *et al.* [25]. L'huile des ombelles matures avec des graines provenant de Sardaigne est essentiellement composée d'hydrocarbures sesquiterpéniques (61,6 %) et de phénylpropanoïdes (15,2

%). Le  $\beta$ -bisabolène (17.6-51,0 %), le carotol (2.4-25,1 %), le (E) méthylisoeugénol (1.3-10,0 %) et le 11  $\alpha$ -himachal-4-ène-1- $\beta$ -ol (9.0-21.6 %), sont les principaux composés.

### II.5.3. *D. carota ssp maximus*

L'huile essentielle des tiges, des feuilles et des fruits de *D. carota ssp. maximus* recueillis dans la région d'Akar, au Nord du Liban, a été étudiée par Saad et al. [15] en utilisant la chromatographie gazeuse couplée à la masse se composé essentiellement d'hydrocarbures sesquiterpéniques et de phénylpropanoïdes.

Les phénylpropanoïdes sont totalement absents à la fois des huiles des feuilles et de celles des tiges. Par ailleurs les sesquiterpènes oxygénés représentent environ 52 et 80 % de la composition respective.  $\alpha$ -Bourbonène, aristol-9-en-3-ol et aristolénol n'ont jamais été signalés en tant que composants d'une huile essentielle de *Daucus*. Contrairement à la plupart des variétés étudiées, le carotol, le daucol et l'acétate de géranyle sont complètement absents. Ces résultats reflètent la composition unique des huiles essentielles de cette variété libanaise.

La chromatographie de l'huile essentielle fraîchement distillée, révèle la présence d'au moins 19 éléments, dont 17 ont été identifiés, représentant environ 98,33 % de la composition totale de l'huile. L'huile essentielle des fruits de *D. carota ssp. maximus* se compose essentiellement de phénylpropanoïdes (56,84 %) et d'hydrocarbures sesquiterpéniques (40,79 %), accompagnés par une quantité relativement beaucoup plus faible en monoterpènes (1,33 %) et en sesquiterpènes oxygénés (1,04 %). Sa composition a semblé être de nature particulière et très différente de celles des autres variétés étudiées. Les phénylpropanoïdes sont présents en quantité étonnamment importante (56,84 %) avec le *trans*-méthylisoeugénol comme constituant majoritaire (37,22 %) et  $\beta$ -asarone en quantité remarquable (17,65 %) et une quantité beaucoup plus faible de méthyleugénol (1,97 %). Les hydrocarbures sesquiterpéniques sont nettement dominés par le  $\beta$ -bisabolène (34,70 %), tandis que le  $\beta$ -caryophyllène et  $\alpha$ -bisabolène sont détectés en quantités beaucoup plus faibles (1,48 et 3,0 %, respectivement).

La chromatographie des deux huiles a révélé la présence d'au moins 40 composants pour l'huile des feuilles et de 21 composants pour celle des tiges, dont 30 et 17 constituants environ ont été identifiés (84 % et 89 %) respectivement de la composition des huiles. L'huile essentielle des feuilles se compose essentiellement de sesquiterpènes oxygénés (environ 51,20 % et de 25,25 %) d'hydrocarbures sesquiterpéniques, ainsi que de quantités relativement faibles d'hydrocarbures monoterpéniques (6,31 %), des alcanes (4,55 %), d'alcools monoterpéniques (4,19 %) et d'un aldéhyde à chaîne droite (3,22 %). L'huile des tiges est qualitativement et quantitativement différente dans sa composition. Elle est fortement dominée par les sesquiterpènes oxygénés (80,05 %), accompagnés par des quantités relativement faibles de monoterpènes (10,07 %) et d'hydrocarbures sesquiterpéniques (6,91 %). Néanmoins, ces deux huiles sont caractérisées par l'absence complète de phénylpropanoïdes [15].

Les alcools sesquiterpéniques, carotol et daucol, comme dans l'huile essentielle des fruits, sont totalement absents. Les alcools sesquiterpéniques tricycliques, l'aristol-9-en-3-ol (feuilles, 0,82 %; tiges, 1,09 %) et son isomère aristolénol (tiges, 0,97 %), bien que présent en quantités mineures, n'ont jamais été signalés comme composants des huiles essentielles des *Daucus*. Le  $\beta$ -cubébène qui constitue environ (50 %) de la fraction d'hydrocarbures sesquiterpéniques des deux huiles, est accompagné par des quantités notables de trans- $\beta$ -farnésène (feuilles, 2,49 % et tige, 1,30 %) et de  $\beta$ -caryophyllène (2,15 %, 0,63 %). Le  $\beta$ -bisabolène, l'hydrocarbure sesquiterpénique majoritaire des huiles des fruits (34,70 %), est totalement absent des huiles des tiges et des feuilles.

$\alpha$ -pinène représente le principal hydrocarbure monoterpénique de l'huile des tiges (4,37 %), avec du limonène (2,09 %), du sabinène (1,95 %) et du myrcène (1,06 %). Par contre, le limonène est le principal hydrocarbure monoterpénique de l'huile des feuilles (2,30 %) accompagné par le myrcène (1,84 %) et de petites quantités de sabinène (0,85 %), de  $\beta$ -pinène (0,53 %) et des traces de  $\alpha$ -pinène.

Les huiles essentielles des racines de *D. carota* ont montré une puissante activité insecticide contre les mouches de la carotte, *Psila rosae* avec une  $LC_{50}$  de 2,17 mg/24h [26].

#### **II.5.4-D. *carota* ssp *maritimus***

Les huiles essentielles des fleurs et de racines de *D. carota* ssp. *Maritimus* poussant en Tunisie, ont été obtenues par hydrodistillation et analysées par combinaison de la CPG, CPG/SM et de la RMN du  $^{13}\text{C}$ . La composition chimique des huiles des racines et des fleurs de cette sous-espèce étudiée pour la première fois par Jabrane et al. [19] révèle la présence de six et trente-deux composés respectivement. Une différence notable a été observée entre les pourcentages constitutifs de ces deux organes. La composition chimique de l'huile essentielle des fleurs a été caractérisée par une forte proportion d'hydrocarbures monoterpéniques (68,4 %), avec le sabinène comme produit majoritaire (51,6 %). Les monoterpènes oxygénés représentent la seconde fraction importante de la même huile dont le terpinen-4-ol (11,0 %) comme composé prédominant. L'huile des racines présentait une composition étonnamment différente. Les dérivés phénoliques sont largement dominants avec (76,3 %) du total, le dillapiole (46,6 %) et la myristicine (29,7 %), étant les produits majoritaires.

L'effet antibactérien conduit à l'inhibition d'une série de bactéries pathogènes. Les valeurs de CMI pour toutes les souches bactériennes ont été dans la gamme de 1,25 à 5 mg/mL. Les deux huiles exposées une activité contre les souches de référence de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *S. typhimurium*. L'huile de fleur a été plus efficace que l'huile de racine contre *E. coli*. A l'inverse, l'huile de racine a été trouvée plus active que l'huile de fleur contre les *S. aureus*, *S. pneumonie*, *Shigella* spp., et *E. faecalis* (valeurs de CMI de 1,25 à 2,5 mg/mL) [19].

#### **II.5.5. *D. gingidium* L. ssp. *gingidium***

Les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles et des fruits de la plante *D. gingidium* ssp. *gingidium* originaire des sables maritimes et les falaises italiennes, ont été étudiées par Flamini et al. [14]. Les principaux constituants de l'huile essentielle des feuilles sont le sabinène (26,8 %),  $\alpha$ -pinène (10,8 %), le germacrène-D (6,9 %) et le limonène (5,7 %). Le sabinène (60,6 %) était le composé principal, identifié dans l'huile essentielle des fruits, suivie de  $\alpha$ -pinène (12,2 %) et du 4-terpinéol (5,4 %).

La composition de l'huile essentielle des fruits de *D. gingidium* ssp. *gingidium* était très différente de toutes les données rapportées pour les *D. carota*: dont aucun échantillon d'huile ne contenait des pourcentages élevés de sabinène (60,6 %); en outre, dans le *D. gingidium* ssp. *gingidium*, l'acétate de géranyle, le carotol, le daucol, et l'acétate de terpinyle n'ont pas été identifiés. Aucune activité biologique n'a été effectuée [14].

#### **II.5.6. *D. carota* L. ssp. *sativus***

La composition chimique des huiles essentielles des ombelles de *D. carota* L. ssp. *sativus* dans 3 stations différentes obtenues par hydrodistillation, a été étudiée par GC et GC-SM. Quarante composantes ont été identifiées. Les huiles ont été dominées par des d'hydrocarbures monoterpéniques (66-85 %) principalement représentées par  $\alpha$ -pinène (40-46 %) et le myrcène (12-24 %). Les constituants les plus abondants des sesquiterpène étaient le  $\beta$ -caryophyllène (4,6 à 13,2 %) et le carotol (1.2 à 6.1 %) [16]. En ce qui concerne les activités biologiques aucune étude n'a été menée.

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des différentes parties de *D. carota* ssp. *sativus*, recueillies dans la banlieue de Changchun en Chine, ont été analysées par Wu Yin et al. [27]. Les pourcentages des huiles essentielles extraites sont de 0,27 % pour les fleurs, 0,07% pour les tiges et les feuilles et 0,01 % pour les racines. Cinquante-quatre, soixante-six et trente-trois composés ont été, respectivement, séparés et identifiés dans les fleurs, les tiges et les feuilles et les racines. Dans l'huile essentielle des fleurs, 54 composés ont été séparés et identifiés représentant 94.31 % du total de l'huile, parmi lesquelles, le carotol (16,36 %),  $\alpha$ -pinène (12,64 %) et le caryophyllène (9,62 %) représentent les produits majoritaires.

Dans l'huile essentielle des tiges et des feuilles, 66 composés ont été séparés et identifiés, ce qui représente 98,12 % de l'huile essentielle totale, parmi lesquelles le caryophyllène (17,24 %), le  $\beta$ -myrcène (14,06 %) et le *pi*-bicyclosesquiphellandrène (10,14 %) sont les produits majoritaires. Dans l'huile essentielle des racines, 33 composés ont été séparés et identifiés, ce qui représente 78.89 % de l'huile essentielle totale, parmi lesquels le 1,2,4-méthèno-1Hcyclobuta[b]cyclo (32,29 %),  $\alpha$ -farnésène (17,07 %) et le caryophyllène (10,91 %) sont les produits majoritaires. [27].

#### **II.5.7. *D. glaber* Forssk.**

L'huile essentielle des fruits de l'espèce *D. glaber* Forssk se compose principalement d'hydrocarbures monoterpéniques et de phénylpropanoïdes. Les hydrocarbures monoterpéniques sont présents en quantités significatives (58,3 %) et se composent principalement de limonène (37,0 %), sylvestrène (18 %) et une petite quantité de  $\gamma$ -terpinène (2,9 %).

Le sylvestrène n'a jamais été signalé auparavant dans les huiles essentielles de toutes les espèces du genre *Daucus*. Les phénylpropanoïdes sont également majoritaires et se composent principalement de l'élémicine (23,7 %) et de méthyleugénol (2,5 %).

L'huile essentielle des fruits ne contient pas de terpènes oxygénés, à savoir, les alcools monoterpéniques, les alcools sesquiterpéniques et les esters monoterpéniques. L'huile essentielle des feuilles se compose d'hydrocarbures monoterpéniques (61,5 %), d'hydrocarbures totaux (61,8 %), de phénylpropanoïdes (19,7 %), d'alcools monoterpéniques (8,2 %) et d'alcools sesquiterpéniques (1,2 %). Les hydrocarbures monoterpéniques se composent principalement de limonène et de  $\gamma$ -terpinène en quantités égales (21,7 %). Il y a aussi de petites quantités de sylvestrène (5,3 %), de mentha-2,8-diène (3,6 %), de 2-carène (2,8 %) et de 3-carène (2,5 %). La fraction des phénylpropanoïdes ressemble à celle des fruits et se caractérise par la présence d'élémicine (18,2 %) et une petite quantité de méthyleugénol (1,6 %).

L'huile essentielle des feuilles ne contient pas de myristicine. La fraction d'hydrocarbures sesquiterpéniques de l'huile des feuilles se compose de  $\alpha$ -gurjunène (0,3 %), tandis que la fraction d'alcools sesquiterpéniques est représentée par du  $\beta$ -eudesmol (0,9 %) et du spatuléol (0,4 %), qui n'ont jamais été signalés auparavant dans l'huile essentielle de toute espèce du genre *Daucus*.

L'huile essentielle des tiges se compose principalement d'hydrocarbures monoterpéniques, d'alcools terpéniques et de phénylpropanoïdes (43,9 %, 25,8 % et 11 % de la composition de l'huile, respectivement), ainsi que de petites quantités de sesquiterpènes: hydrocarbures (3,0 %), alcools (3,8 %) et esters (1,0%). Le sylvestrène est absent de l'huile essentielle des tiges alors qu'il est présent en quantités

significatives dans l'huile essentielle à la fois des fruits et des feuilles. Il y a aussi de petites quantités d'acétate de chrysanthényle (0,6 %) et l'acétate de 4-thujen-2 $\alpha$ -yle (0,5 %), qui n'ont jamais été signalées auparavant dans l'huile essentielle de toute espèce du genre *Daucus*. L'huile essentielle des fruits, feuilles et tiges a montré une faible activité antimicrobienne contre des bactéries gram positif et gram négatif. Cela a été expliqué par la présence de taux élevé de composés phénoliques et/ou de composés oxygénés. En même temps, les huiles ont montré une activité cytotoxique avec des LC<sub>50</sub> de 21,52 ; 36,01 et 42,34  $\mu$ g/mL, respectivement qui peut être attribuée aussi à la présence de pourcentage élevé de composés phénoliques et/ou de composés oxygénés. [28].

### **II.5.8. *D. carota* L. ssp. *halophilus* (Brot.) A. Pujadas**

Les huiles essentielles ont été extraites avec des rendements de 0,4 % pour les fleurs en début de floraison et de 0,6 % à 1,0 % pour les graines mûres. En général, la composition des huiles obtenues à partir de deux endroits différents (Cabo de S. Vicente et de Arrifana au Sud du Portugal) est similaire. Néanmoins, il existe des différences importantes entre les huiles en fonction du stade de développement de la plante, en particulier dans les proportions des phénylpropanoïdes. Les échantillons obtenus à partir des fleurs sont essentiellement composés d'hydrocarbures monoterpéniques (de 64,9 à 76,8 %). Le sabinène (de 28,3 à 33,8 %) étant le constituant principal, tandis que les principaux composés de l'huile obtenue de graines mûres sont l'élémicine (26,0 à 31,0 %) et le sabinène (27,6 à 29,0 %).

Les résultats de cette étude menée par Tavares et *al.* [29]. ont montré que les huiles essentielles de *D. carota* ssp. *halophilus* étaient dotées d'une activité antifongique très importante contre les souches de dermatophytes, ce qui justifie l'utilisation traditionnelle de cette plante. En même temps ces huiles sont sans cytotoxicité sur les cellules dendritiques de la peau de souris, à des concentrations significatives montrant une activité antifongique. [29].

### **II.5.9. *D. reboudii* Coss**

L'hydrodistillation de l'huile essentielle des parties aériennes de *D. reboudii* Coss., a été analysée par CPG et CPG-SM. Vingt-quatre composés ont été identifiés,



correspondant à 87,2 %, cinq monoterpènes, 10 monoterpènes oxygénés, six sesquiterpéniques et trois sesquiterpènes oxygénés. L'huile essentielle est dominée par une grande quantité de monoterpènes. Sur un total de 87,2 % des composés identifiés, 84,3 % correspondent à des monoterpènes, dont 82,3 % du total des monoterpènes sont des hydrocarbures monoterpéniques et 17,7 % des monoterpènes oxygénés. Les principaux composés monoterpéniques sont  $\alpha$ -pinène (39,7 %), le sabinène (21,2 %) et le  $\beta$ -cimène (5,9 %). Pour les monoterpènes oxygénés, le *cis*-verbénol (4,7%) et le terpinèn-4-ol (1,9 %), représentent les principaux composés. Les sesquiterpènes représentent 2,9 % de l'ensemble des composés. Les hydrocarbures sesquiterpéniques constituent 34,5 % de l'ensemble des sesquiterpènes identifiés, pour 65,5 % de sesquiterpènes oxygénés. Le longibornéol est le constituant principal du groupe des sesquiterpènes, avec seulement 1,3 % du total de tous les composés identifiés. [18a].

**Tableau I.1** : Principaux composants des huiles essentielles du *D. carota* des différentes origines signalé précédemment

<i>D. carota</i> ssp.	Organes	Origines (pays)	Principaux composés	Références
<i>maritimus</i>	Fleurs	Tunisie	Sabinène (51.6%), terpinèn-4-ol (11.0%).	Jabrane et al., 2009
	Racines		Myristicine (29.7%), dillapiole (46.6%).	
<i>maximus</i>	Les fruits murs	Egypte	Shyobunone (16.8-24.3%), $\beta$ -cubebene (3.5-12.7%), preisocalamendiol (17.9-32.7%).	Saad et al., 1995
<i>sativus</i>	Ombelles	Pologne	$\alpha$ -Pinène (40.0- 46.0%), sabinène (12.0-24.0%), $\beta$ -caryophyllène (4.6-13.2%).	Kula et al., 2006
	Feuilles	Iran	<i>trans</i> -Anethole (23.5 %), myrcène (14.5 %),	Mojab et al., 2008.
	Ombelles	Pologne	Carotol (10.7-48.0%), $\alpha$ -pinène (9.0- 18.0%),	Staniszewska et al., 2005
<i>gummifer</i>	Fruits	Espagne	acétate de Geranyl (51.74–76.95%)	Pinilla et al., 1995
<i>halophilus</i>	Ombelles fleuries	Portugal	Sabinène (28.3-33.8%)	Tavares et al., 2008
	Ombelles mures		Elemicin (26.0–31.0%), sabinène (27.6–29.0%)	
<i>Sativa</i>	graines	Chine	$\beta$ -bisabolène (80.49%), $\alpha$ -asarone (8.8%), and <i>cis</i> - $\alpha$ -bergamotene (5.51%).	Imamu et al., 2007
	tiges et feuilles	Chine	Caryophyllène (17.24%), myrcène (14.06%), (+) epi-bicyclo-sesquiphellandréne (10.14%),	Wu et al., 2006
	Racines		$\alpha$ -farnesène (17.1%), caryophyllène (10.9%), 1, 2, 4-Methano-1H-cyclobuta [ b ] cyclo (32.3%).	
	Ombelles	Italie	$\beta$ -Bisabolène (17.6-51.0%), carotol (2.4-25.1%), 11 $\alpha$ -(H)-himachal-4-en-1- $\beta$ -ol (9.0-21.6%), E-methylisoeugènol (1.3-10.0%).	Maxia et al., 2009
		Portugal	$\alpha$ -Pinène (13.0-37.9%),acétate de géranyl (15.0-65.0%).	
	Ombelles	Tunisie	Elemicin (31.5-35.3%), carotol (48.0-55.7%), 11- $\alpha$ -(H)-himachal-4-en-1- $\beta$ -ol (12.7-17.4%), sabinène (12.0-	Marzouki et al., 2010

<i>carota</i>			14.5%), $\alpha$ -selinène (7.4-8.6%).	
	Mures, fleurs, racines, feuilles, et tiges	Serbie	$\alpha$ -pinène (7.1-51.2%), sabinène (2.7-36.7%).	Soković et al., 2009
	Fruits		Muuroène (8.2-10.9%).	
	Graines	Turquie	Carotol (68.0%), daucène (8.7%).	Özcan et al., 2007
	Partie aérienne	Corse	$\alpha$ -Pinène (15.9-24.9%), elemicin (11.4-16.3%), E-methyl-isoeugenol (21.8-33.0%).	Rossi et al., 2007; Gonny et al., 2004.
	Herbes, Ombelles	Pologne	$\alpha$ -Pinène (30.0-42.0 %), sabinène (19.5-40.5%), myrcène (2.5-7.0 %).	Staniszewska et Kula, 2001; Staniszewska et al., 2005
	Grains	Lituanie	Sabinène (28.2-37.5%), $\alpha$ -pinène (16.0-24.5%), terpinèn-4-ol (4.6-7.5%), $\gamma$ -terpinène (2.9-6.0%).	Mockute et Nivinskiene, 2004
	Racines	Vienne	$\alpha$ -terpinolène (26-56 %).	Chizzola, 2010
	Feuilles		$\alpha$ -Pinène (20.9-44.8%), sabinène (14.2-19.5%)	
	Fruits		$\alpha$ -Pinène (23.5-30.4%), sabinène (21.5-46.6%), acétate de geranyl (3.9-28.1)	
	Fruits	Nord de la Serbie	Sabinène (18.7%), Carotol (20.3%),	Glisic et al., 2007
	Herbes, ombelles	Pologne	$\alpha$ -Pinène (16.1-42.7%), sabinène (21.3-45.3%), myrcène (4.0-12.9), limonène (3.55-6.75%)	Gora et al., 2002

### III. Etude botanique des trois espèces étudiées du genre *Daucus* L.

#### III.1. *D. crinitus* desf.

##### III.1.1. Classification systématique et nom vernaculaire

Le nom latin «*Daucus*» signifie une carotte, ce nom est au masculin, la forme féminine s'écrit «*dauca*» tandis que la forme neutre s'écrit «*daucum*»; son équivalent en grec est « $\delta\alpha\upsilon\kappa\omicron\nu$ » (*daukon*). Le mot latin «*crinitus, crinita, crinitum*» veut dire une chose qui a de longs poils, et donc peut être traduit comme poilu ou chevelu; pour l'espèce, cet adjectif se réfère aux semences qui sont chevelues; c'est pourquoi la plante a pris son nom «carotte à semences chevelues» dans l'encyclopédie méthodique botanique 1811[30]. L'espèce a pour nom commun «bouzeffour» chez les habitants de l'ouest algérien; elle est connue aussi par les noms «carotte à semences chevelues» [30], «'erq Sidi Messaoud» [5] et «carotte à feuilles réduites» [31].

La systématique la plus récente de l'espèce suit les hiérarchies de Systema Naturae 2000 [32].

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Viridaeplantae

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-Classe :** Cornidae

**Ordre :** Araliales

**Famille :** Apiaceae

**Sous famille :** Apioideae

**Tribu :** Caucalideae

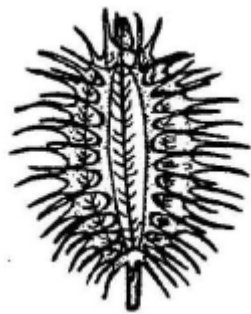
**Genre :** *Daucus*

**Espèce :** *crinitus* desf.

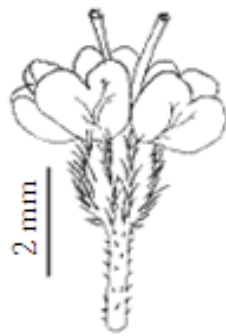
**Synonyme :** *meifolius*

### III.1.2. Description botanique de la plante

Ombelles pédonculées. Feuilles à pourtour linéaire, 2-3 pennatiséquées, à segments filiformes aigus. Plante vivace à souche épaisse. Bractées de l'involucre et de l'involucelle entières ou à peine divisées. Feuilles radicales étalées en rosette, glabres, les supérieures coniformes. Ombelles fructifères à rayons inégaux. Fruits finement pubescents à côtes toutes munies d'une rangée d'aiguillons mous (figure 6), jaunis ou rosés, égalant 1,5 à 2 fois le diamètre du fruit. Forêts, broussailles. Assez commune : dans tout le Tell. « *Eurq Sidi Messaoud* ». (= *D. meifolius* Brot.). [5]



**Figure I.7 :** Fruits de *D. crinitus*



**Figure I.8 :** Fleurs de *D. crinitus*.

Cette espèce est remarquable par les poils nombreux, mous, allongés, blanchâtres ou violets dont les semences sont chargées. Les tiges sont simples ou à peine rameuses, droites, rudes, légèrement striées, hautes de deux à trois pieds; les feuilles distantes, longuement pétiolées; les folioles glabres, un peu roides, plusieurs fois pinnatifides, presque verticillées; les découpures lobulées, filiformes, courtes, nombreuses, inégales, aiguës, divariquées, un peu roides; les pédoncules simples, très lisses, souvent longs d'un pied; l'involucre composé de huit à dix folioles linéaires, pinnatifides à leur sommet; les découpures aiguës, inégales; les folioles des involucre partiels presque simples; l'ombelle plane, touffue; les ombellules touffues; la plupart des fleurs centrales avortées; les pétales blancs, presque égaux; les semences à demi cylindriques. Les fleurs, froissées entre les doigts, répandent une odeur aromatique. [30].

C'est une plante pérenne, de 24-115 cm, dressée, ramifiée ou non au niveau de la base. Tiges scabrides à poils rétrorses. Feuilles basales 3-4 pinnatiséquées, avec des segments sessiles ou sous-sessiles, apparemment verticillés, avec des divisions de dernier ordre linéaires-lancéolées ou linéaires, longuement apiculées, avec pétiole et rachis scabrides à poils rétrorses, le rachis parfois sous-glabre, nervures sous-glabres ou avec poils antrorses dispersés; les supérieures similaires aux basales 1-3 pinnatiséquées. Ombelles longuement pédonculées, légèrement convexes, parfois planes, non contractées à la fructification, avec 15-25 rayons de 35-70 mm, d'inégaux

à sous-égaux, scabrides à poils patents ou rétrorses. Bractées 5-10, de longueur beaucoup plus petite que celle des rayons, adpressées ou patentées, indivisées linéaires-lancéolées, trifides ou pinnatiséquées avec des lobules linéaires-lancéolés, scabrides à poils antrorses, avec une large marge scarieuse. Bractéoles 5-9, de longueur inférieure ou égale à celle des fleurs, indivisées linéaires-lancéolées, parfois bifides, trifides ou pinnatiséquées avec des lobules linéaires-lancéolés, adpressés, avec une nervure médiane scabride et une large marge scarieuse. Sépales jusqu'à 0,4 mm, triangulaires, caducs. Pétales largement obovales, avec le cœur abruptement acuminé, incurvés, glabres, blancs, parfois légèrement teintés de violet, rarement jaunes à sec; les externes des fleurs extérieures plus grands (1,2-1,6 mm) que les internes (0,6-1,2 mm). Anthères jaunes. Stylopode annulaire sous-cylindrique à légèrement conique à la fructification; styles 1-2-4,5 mm, divergents à la fructification. Fruits 4-7 mm, de contour elliptique peu oblong; méricarpes avec les principales côtes équipées de 2 rangées de poils simples; les secondaires avec des épines de longueur 1,5-2,5 fois plus grande que l'étendue des méricarpes, fines, molles, ni dilatées ni confluentes sur une crête à la base, avec glochides d'un seul épi, blanches ou jaunes, avec la partie supérieure violette. Elle est rencontrée dans les prairies, les clairières d'arbustes dégradés, les marges des routes, les pistes et les bords de culture [31].

### **III.1.3. Domaines d'application et intérêt en phytothérapie**

Une enquête menée par les herboristes a montré que la plante s'emploie traditionnellement depuis longtemps :

Une boisson faite à partir des racines en décoction de *D. crinitus* est utilisée pour expulser le placenta après l'accouchement, ainsi que comme tonique. Les racines broyées sont ajoutées dans les aliments comme épices notamment avec les pâtes alimentaires. Les racines sont parfois coupées pour former un bracelet entourant les bras des enfants qui se réveillent continuellement dans la nuit, il paraît que l'odeur a un rôle tranquillisant. Elles sont également utilisées comme colloïde à miel.

### **III.1.4. Distribution**

Cette plante est largement distribuée en Algérie, Maroc, Espagne et Portugal [30].

Elle croît sur les monts Atlas et sur les collines incultes, aux environs de Mascara et de Tlemcen ; elle fleurit au commencement du printemps.

### **III.2. *D. muricatus*.**

#### **III.2.1. Classification systématique et nom vernaculaire**

Le mot latin « *muricatus* » veut dire en français : Muriqué c'est-à-dire une chose munie de pointes courtes et robustes [33] et donc peut être traduit par l'adjectif « pointu »; pour l'espèce, cet adjectif désigne le fruit qui est armé d'aiguillons pointus. Donc la plante a pris son nom « *Daucus* épineux ».

L'espèce a pour nom commun « *Ouarzdel.* » chez les habitants du maroc; elle est connue aussi par le nom « Hasket el arbiya » et « rechad » [34].

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Viridaeplantae

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Cornidae

**Ordre :** Araliales

**Famille :** Apiaceae

**Sous famille :** Apioideae

**Tribu :** Caucalideae

**Genre :** *Daucus*

**Espèce :** *D. muricatus* L.

**Synonyme :** *Artedia muricata* L., *Caucalis muricata* L., et *Platyspermum muricatum* Hoffm.

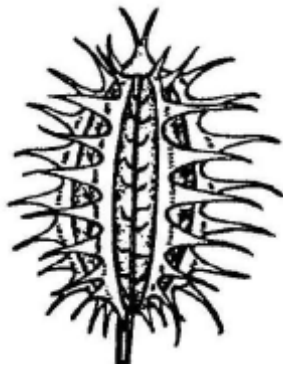
**Nom en Français :** *Daucus* épineux.

#### **III.2.2. Description botanique de la plante :**

C'est une plante annuelle de 30-50 cm., d'un vert obscur, hérissée à la base; tige épaissie aux nœuds, à rameaux étalés-dressés ; feuilles molles, lancéolées dans leur pourtour, tripennatiséquées, à segments découpés lanières étroites et mucronulées; fleurs blanches, celles de la circonférence rayonnantes, la centrale non purpurine; ombelles opposées aux feuilles, à la fin contractées, la terminale plus courte que les latérales; réceptacle ombellaire non dilaté ; involucelle à folioles linéaires sétacées; fruit gros, elliptique, comprimé, armé d'aiguillons très élargis et confluent à la base, égalant sa largeur; côtes de la commissure contiguës, parallèles [35]. Fruit mûr blanchâtre ou rougeâtre, long de 4-7 mm, à aiguillons 1-2 fois plus longs que leur



diamètre, largement confluent à leur base. Fleurs demeurent blanches sur le sec. Ombelles à rayons très inégaux Champs, broussailles CC: dans toute l'Algérie 1 *Méd.*, 1929. *D. muricatus* L. [5].



**Figure I.9 :** Fruits du *D. muricatus* L.



**Figure I.10 :** Fleurs feuilles et tiges du *D. muricatus* L.

### **III.2.3.Distribution.**

Cette plante est largement distribuée en Algérie, Espagne, Portugal, Sardaigne, Sicile, Italie, Iles Egée, et la Turquie [10].

### **III.3. *D. carota* L. subsp. *hispanicus* (Gouan)**

#### **III.3.1. Classification systématique et nom vernaculaire**

Le mot latin «*hispanicus*» veut dire en français : Qui a trait à l'Espagne ou aux Espagnols, c'est pourquoi la plante a pris son nom «carotte d'Espagne».

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Viridaeplantae

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Cornidae

**Ordre:** Araliales

**Famille:** Apiaceae

**Sous famille:** Apioideae

**Tribu:** Caucalideae

**Genre:** *Daucus*

**Espèce:** *D. carota* L. subsp. *hispanicus* (Gouan) Thell.,

**Synonyme:** *D. hispanicus* Gouan,

#### **III.3.2. Description botanique de la plante**

Ombelles fructifères étalées, planes ou convexes. Feuilles 2-3 pennatiséquées, charnues à segments ovales-oblongs - CC: Rocailles maritimes, RR; ailleurs - 1 *Méd.* 1 - (= *D. gingidium* L., *D. gummifer* Lamk incl. *D. hispidus* Desf. et *D. polygamus* Gouan ssp. *Fontanesii* Thell.). ssp. *hispanicus* (Gouan) Thell. [5].

*D. carota* ssp. *hispanicus* Gouan est une plante haute herbacée, suffruticose; la hauteur moyenne de cette dernière a dépassé de 1,50 m, tiges rainurées, rugueuses, mais pas poilues; les feuilles sont des segments triangulaires, très mucronés, glabres, coriaces; bractées 3-fides ou pennatiséquées, aussi longue ou plus courte que l'ombelle; ombelles longues pédonculées, de grands rayons c. 60, presque égales, pas contractées [10].

L'espèce est connue par quatre classifications botaniques qui considèrent quatre synonymes: *D. hispidus* Desf, *D. gingidium* L., *D. gummifer* Lamk incl et *D. polygamus* Gouan ssp. *Fontanesii fontanesii* (Quezel et Santa, 1963) [5]. Paradoxalement, Sáenz Laín 1981 [10] a défini le *D. carota* ssp. *hispanicus* et *D.*



*gingidium* comme deux espèces différentes qui montrent une variabilité morphologique considérable.



**Figure I.11** : Fleurs, feuilles et tige du *D. hispanicus* Gouan.

### **III.3.3. Distribution**

Rives de la Méditerranée, en France (Collioure), en Espagne (Majorque, Cabrera, Cataluña, Gibraltar), en Algérie (Oran). [10]. Elle pousse aussi sur les sables et les falaises maritimes et se développe le long de la côte occidentale de Tlemcen.

## **IV. Activités biologiques**

### **IV.1. Activité antioxydante**

#### **IV.1.1. Les antioxydants**

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques [36]. Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés pour lutter contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui agissent

comme capteurs de radicaux libres. Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme.

#### **IV.1.2. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques**

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

Par définition, les radicaux libres sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux [37] mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides [38], des acides nucléiques [39] en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies humaines telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, l'artériosclérose.

Des systèmes de défense permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

#### **IV.1.3. Le stress oxydant**

Le stress oxydatif est un état au cours duquel des substances oxydantes interviennent sur la capacité de défense antioxydative de la cellule [40]. Conséquemment il peut s'ensuivre un déséquilibre induit non seulement par une production excessive de radicaux libres mais aussi par une diminution des défenses antioxydantes; on parle alors de stress oxydant à l'origine bien souvent d'altérations moléculaires source d'une physiopathologie incluant l'athérosclérose, l'inflammation, la fibrose, la dégénérescence neuronale [41].

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables induisant un vieillissement des protéines, une peroxydation lipidique et un endommagement de l'ADN [41,42].

#### **IV.1.4. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro***

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques [43,44]. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron [45,46].

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation [47]. Alors que, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), de l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ), de l'hydroxyle ( $HO\cdot$ ), des anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), du peroxyde ( $ROO\cdot$ ) et de l'oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ) [45]. Parmi ces techniques, nous citons :

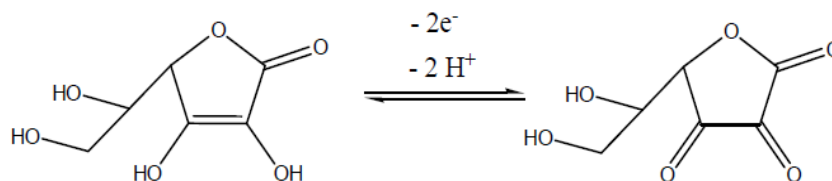
La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) [48]; La méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) [49]; La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) [50]; La méthode du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [51]; La méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- dimethyl-p-phenylenediamine) [52]; La méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) [53]; La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total)[54]; La méthode photochimiluminescence (PCL) [55]; La méthode d'hémolyse [56].

#### **IV.1.5. Antioxydants d'origine naturelle**

##### **a. L'acide ascorbique et ses dérivés : (E300)**

Il peut être d'origine naturelle (fruits et légumes) ou synthétisé. L'acide L-ascorbique

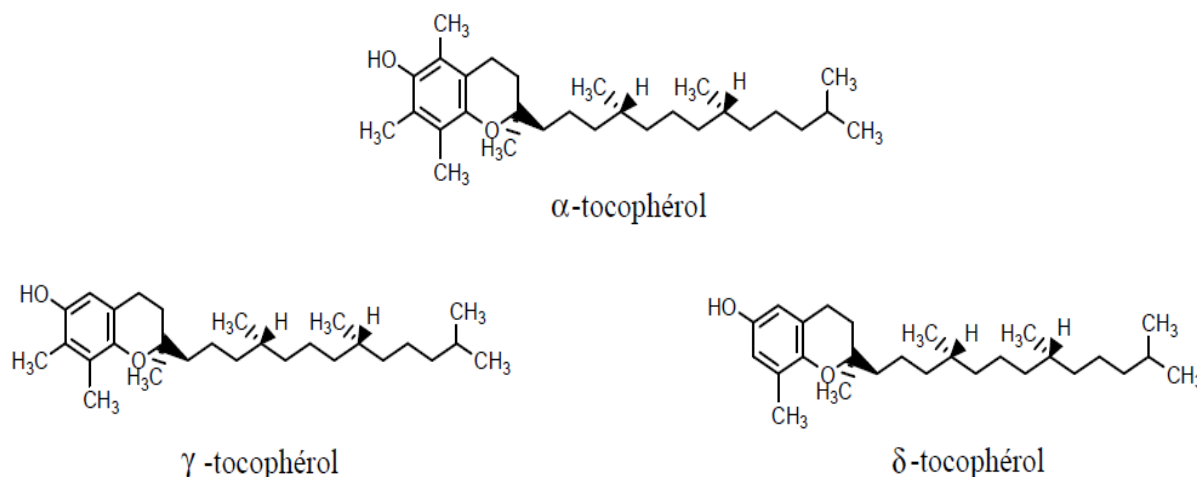
(vitamine C) et son dérivé le palmitate d'ascorbyle sont des antioxydants utilisés en synergie. La vitamine C fut découverte en 1924 par Szent-Györgyi [57] et sa synthèse fut réalisée en 1934, à partir du glucose. Il possède un caractère acide et intervient dans les échanges d'oxydoréduction grâce à sa fonction ène-diol, comme le montre la (figure I.12). L'acide Lascorbique s'oxyde en acide déshydroascorbique, prévenant ainsi l'oxydation d'autres substances moins réactives.



**Figure I.12:** Oxydation de l'acide L-ascorbique

**b. Tocophérols :**

Ces additifs sont apparentés à la vitamine E et sont contenus dans les lipides végétaux. En 1936, en étudiant le rancissement des huiles stockées, Olcott et Mattil [58] s'aperçurent que celles-ci étaient protégées contre l'autoxydation, par ce qu'ils nomment des "inhibitols" et qui sont des tocophérols. Les tocophérols sont des composés phénoliques de structure apparentée à celle de l' $\alpha$ -tocophérol. On distingue l' $\alpha$  tocophérol (E307), le  $\gamma$ -tocophérol (E308) et le  $\delta$ - tocophérol (E309) (figure I.13).



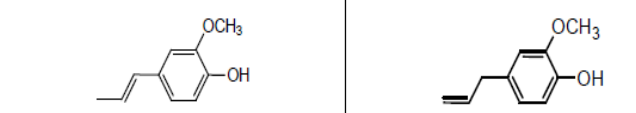
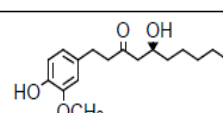
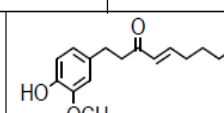
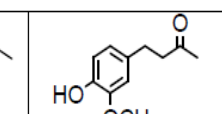
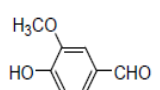
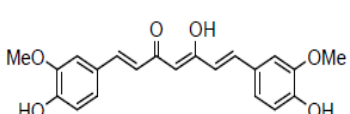
**Figure I.13:** Formule des  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -tocophérols.

Ils existent dans différentes huiles végétales issues de l'olive, de l'arachide, du maïs, du tournesol, du soja ou encore de la sauge et du romarin [59, 60,61].

**c. Composés phénoliques extraits de végétaux :**

Ces composés ne sont pas reconnus comme additifs car ils sont étiquetés comme «épices ». Leur statut pourrait évoluer de par leurs propriétés antioxydantes, la première étude des pouvoirs antioxydants des épices remonte à 1952-1955 (Chipault) [62,63]. Les principaux végétaux riches en composés phénoliques sont répertoriés dans le tableau I.2.

**Tableau I.2:** Quelques composés phénoliques à activité antioxydante dans les épices

Végétaux	Composés phénoliques présents	Structures		
Muscade	Isoeugénol / Eugénol			
Gingembre	Gingérol / Shogaol / Zingérone			
Vanille	Vanilline			
Curcuma	Curcumine			

**IV.1.6. Antioxydants synthétiques**

L'anhydride sulfureux (ou dioxyde de soufre SO<sub>2</sub>) et ses combinaisons minérales ont été utilisés comme premiers antioxydants des vins et des bières, mais ces composés possèdent un caractère fortement allergisant [64]. On trouve aussi d'autres composés dont les formules sont répertoriées dans le tableau I.3.

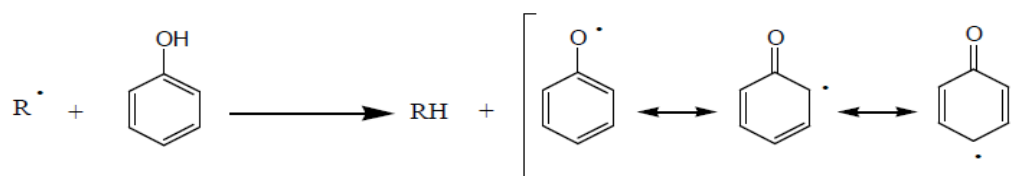
**Tableau I.3 :** Structures de quelques antioxydants synthétiques

Noms	Structures
le gallate de propyle (E310)	
le gallate d'octyle (E311)	
le gallate de dodécyle (E312)	
le butylhydroxyanisole ou BHA (E320) 2 isomères	
le butylhydroxytoluène ou BHT (E321)	

L'utilisation du BHA et du BHT est actuellement remise en question en raison des risques toxicologiques de ces deux composés.

### VI.1.7. Mécanisme d'action

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme "capteurs" de radicaux libres. Les antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin [65]. L'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un intermédiaire radical stabilisé de par ses structures mésomères conjuguées (figure I.14).



**Figure I.14 :** Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques [65].

#### **IV.1.8. Essais de l'activité antioxydante dans les aliments**

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques [66,67]. Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique [68]. Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [69,70]. Des chercheurs ont étudié les activités antioxydantes de combinaison des extraits de plantes de thym, origan, marjolaine et sauge avec l'acide citrique en saindoux stockés à 75°C. Ils ont trouvé une efficacité synergique de l'acide citrique avec les extraits de thym [69,70]. Une étude a été conçue pour comparer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Centella asiatica* et celle du BHA. Les teneurs en acide gras libre (FFA), les teneurs en peroxyde (PV), les teneurs en iode, les diènes conjugués (Cd) et les triènes conjugués (Ct) sont déterminés pour surveiller l'activité antioxydante de l'huile essentielle et du BHA dans l'huile de tournesol.

L'huile essentielle a montré une activité antioxydante forte en interdisant l'augmentation des paramètres oxydants [71]. Récemment, une autre étude a été réalisée pour essayer la formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus limon*, en vue de les exploiter et de les substituer à un additif synthétique : le Tocoblend. L'évaluation de la stabilité oxydative est réalisée par les tests de Rancimat et Schaal, les résultats obtenus ont montré que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* étaient plus résistantes que celle au Tocoblend vis-à-vis de l'oxydation forcée [72].

#### **IV.2. Activité antimicrobienne**

##### **VI.2.1. Introduction**

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles



permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres.

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques [73].

### **VI.2.2. Variation de la composition de l'huile essentielle :**

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires [74] et les effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant [75]. Il est possible de distinguer différents chémotypes au sein d'une même famille botanique de plantes. La composition exacte des huiles essentielles étudiées n'est pas toujours précisée dans les articles et on peut supposer que les différences de composition induites par la zone de provenance de l'huile peuvent influencer sur son activité [76].

Le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les huiles essentielles sont les principaux facteurs modifiant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée. Les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux huiles essentielles dans lesquelles ils se trouvent [77]. L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique.



De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « *totum* », c'est-à-dire à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires. Certaines études ont montré que l'activité des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément [74].

### **IV.2.3. Les principes actifs antibactériens [73]**

Les phénols sont les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre: thymol, carvacrol et eugénol. Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation. Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et, parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa*. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique. La dose de thymol applicable sur la peau et les muqueuses est de 0,5%. Ingéré à la dose de 2 g ou à plus fortes doses, il est responsable de gastralgies avec nausées [78]. L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives [79,80]. Son composé majoritaire, le carvacrol, possède également une forte activité antimicrobienne [81].

Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité, avec le géraniol, linalool, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus. Molécules à large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes.

Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisés sont les citrals, le citronnellal et le cuminal. Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité

antifongique. De nombreuses familles de molécules ont montré in vitro une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénals. Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques et de nombreuses pathologies virales sévères montrent des améliorations importantes avec leur utilisation. Il est donc admis que l'activité antibactérienne des HE se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires [82,83].

Phénols > Alcools > aldéhydes > Cétones > oxyde > esters > hydrocarbure.

Toutefois l'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable [84].

#### **IV.2.4. Le mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles**

Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [85,86].

**a. Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs**, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémoosmotique et une fuite d'ions ( $K^+$ ) [87].

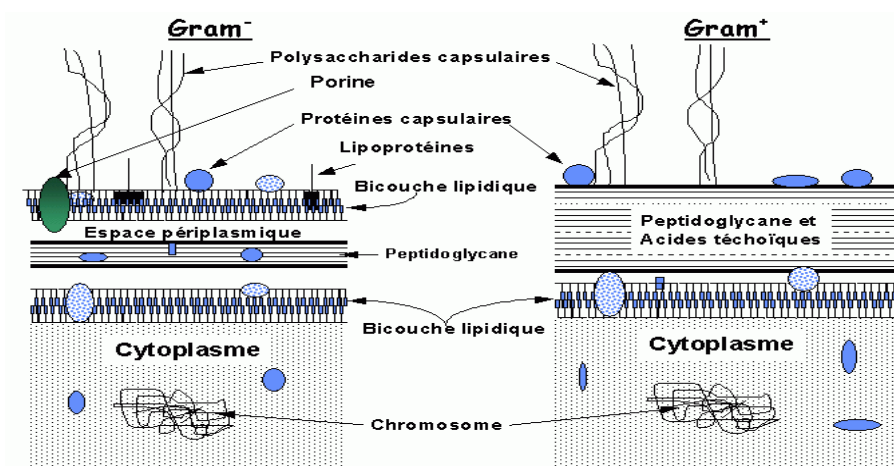
Des conclusions similaires sont obtenues par d'autres auteurs [84,88]. Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP [89]. Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée [90]. Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, de RNA, des protéines et des polysaccharides [91].

D'autres auteurs pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire [84].

**b. Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes**

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des huiles essentielles.

Les bactéries peuvent être différenciées par l'application d'une coloration appelée Gram. Les bactéries colorées sont nommées Gram<sup>+</sup> et possèdent une couche épaisse de peptidoglycane située au-dessus de leur membrane sélective (Figure I.15) [92]. Au contraire, les bactéries Gram<sup>-</sup>, qui ne sont pas ou peu colorées, possèdent une mince couche de peptidoglycane entourée par une membrane interne et une externe rendue perméable par la présence de porines. Ce sont des différences dans la taille et les propriétés du peptidoglycane qui permettent de différencier ces deux types bactériens (Gram<sup>-</sup>/Gram<sup>+</sup>) par la coloration (Figure I.15). Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries, les bactéries Gram<sup>-</sup> sont plus résistantes que les Gram<sup>+</sup> vis-à-vis des huiles essentielles [93] grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram<sup>-</sup> est plus riche en lipopolysaccharides et en protéines que ceux de Gram<sup>+</sup> qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries [91].



**Figure I.15 :** Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup>

Plusieurs travaux notamment ceux de Ouattara *et al.* (1997) [94]; Hammer *et al.* (1999) [95]; Moreira *et al.* (2005) [96]; Souza *et al.* (2006a) [85]; Ahmad *et al.* (2006b) [97]; Ağaoğlu *et al.* (2007) [98]; Bouguerra et Zeghou (2009) [99]; Derwich *et al.* (2010) [100]; et Bari *et al.* (2010) [101], ont confirmé la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-).

#### **IV.2.5. Matrice biologique**

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont différentes en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou du fait du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des huiles essentielles. Ainsi les huiles essentielles diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur des bactéries de la phase aqueuse [102]. Généralement les concentrations des huiles essentielles et leurs composés nécessaires pour empêcher la croissance microbienne sont plus élevées dans les aliments que dans des milieux de culture. Ce serait dû aux interactions entre les composés phénoliques et la matrice de l'aliment [103]. Le repartitionnement des composants antibactériens hydrophobes d'huile essentielle dans les composés gras de la nourriture peut les empêcher d'entrer en contact avec les bactéries dans les régions hydrophiles dans les aliments [104].

#### **IV.2.6. Micro-organismes utilisés dans nos tests antimicrobiens**

##### **a. Souches bactériennes utilisées**

###### *1. Escherichia coli :*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, elle représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires [105].

###### *2. Staphylococcus aureus :*

Ce sont des cocci Gram positifs avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulées, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives.

Le *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire [106].

3. *Pseudomonas aeruginosa* :

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise deux types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques [107]. *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales [108].

4. *Klebsiella pneumoniae* :

C'est un bacille à Gram-négatif, fréquemment rencontré en pathologie humaine. Il cause des infections nosocomiales, il peut aussi être à l'origine des infections communautaires, surtout chez les patients présentant des facteurs de comorbidité telle la bronchite chronique, la cirrhose hépatique, et le diabète sucré [109].

5. *Enterococcus faecalis* :

C'est une bactérie commensale à Gram positif, habitant le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Comme d'autres espèces du genre *Enterococcus*, *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'homme, particulièrement dans un environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité et au risque nosocomial. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin [110].

6. *Listeria monocytogenes* :

C'est une bactérie de type Gram positif à l'origine de la listériose. Cette maladie infectieuse grave touche à la fois l'homme et les animaux. *L. monocytogenes* constitue une bactérie très résistante qui peut se multiplier dans des atmosphères dont la température est comprise entre 1°C et 45 °C. [111,112]. Ces caractéristiques spécifiques expliquent le fait que cette bactérie dispose d'une capacité de survie importante et peut proliférer dans un environnement proche de celui de la réfrigération alimentaire. Elle peut donc être ingérée par l'intermédiaire de la nourriture.

7. *Bacillus cereus* :

Les souches de *B. cereus* sont constituées de bacilles Gram positif de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes. [113,114] .Ce sont des bactéries pathogènes que l'on rencontre dans les produits riches en amidon, dont les céréales. Ces bacilles entraînent des troubles du tube digestif dus à l'ingestion de la toxine ou de la bactérie. Les grains peuvent être contaminés par les poussières, le sol, etc. Leurs spores résistantes leur permettent une survie importante. Une température de croissance comprise entre 5 et 37 °C, un pH optimal entre 4,5 et 7 et une certaine humidité : ces trois éléments favorisent leur développement sur les grains.

8. *Bacillus subtilis* :

C'est une bactérie à gram +. Sa longueur varie de 2 à 4 µm et sa largeur de 0,5 à 2 µm. Elle a pour forme cellulaire des bâtonnets droits à bout arrondis. *B. subtilis* n'est pas considéré comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire. [115]

**b. Souches fongiques utilisées**

Les mycoses sont des maladies provoquées par les champignons microscopiques appelés micromycètes. Pour la dénomination de ces mycoses, le nom de l'infection fongique dérive habituellement du genre du champignon, en lui ajoutant le suffixe ose. Ainsi la pathologie à candida s'appelle candidose, à aspergillus aspergillose.

Un champignon appelé aussi mycète est un micro-organisme eucaryote, uni ou pluricellulaire. Sa structure est constituée d'un thalle ou mycélium. Il se nourrit par absorption (et non par phagocytose comme les composants du règne animal). Sa paroi est riche en chitine, ce qui lui assure une certaine résistance aux contraintes du milieu externe [116].

Les mycètes se divisent principalement en deux formes [117]:

- La forme moisissure : filaments longs, fins et ramifiés à structure cellulaire appelée hyphe formant un mycélium, souvent visibles à l'œil nu.

- La forme levure: champignons microscopiques unicellulaires possédant un seul noyau et se reproduisant soit de façon asexuée par bourgeonnement ou scissiparité, soit par reproduction sexuée par formation de spores.

Les Candidoses sont les plus fréquentes des levures ; elles provoquent des affections cosmopolites atteignant la peau, les ongles, les cavités naturelles [117].

*1. Candida albicans :*

C'est un champignon ovale, bourgeonnant ressemblant aux levures, qui produit un pseudo mycélium dans les cultures. Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *C. albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginal, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *C. albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco- cutanées [118].

*2. Aspergillus sp :*

Ce sont les espèces fongiques les plus communes qui sont capables de produire des mycotoxines dans les produits alimentaires. Les mycotoxines sont connues pour être une cause puissante capable de produire un cancer hépatique chez les animaux et les humains. La présence et la croissance des champignons peuvent entraîner la détérioration et la réduction de la qualité et la quantité des aliments [119]. Dans différentes parties du monde, il y a une inquiétude croissante au sujet de la contamination des aliments, l'exposition environnementale et professionnelle aux spores fongiques de différentes espèces, en particulier à l'aflatoxine produit par ces espèces fongiques comme le cas d'*A. flavus* et *A. niger* [120]. L'espèce utilisée dans notre étude fongique est *A. flavus* : C'est le principal producteur d'aflatoxines B1 (la plus importante), B2, G1 et G2. L'aflatoxine B1 est actuellement considérée comme le plus important agent carcinogène d'origine naturelle connu.

*A. flavus* est connu par ses implications dans les infections opportunistes humaines. Le mode principal de la transmission aux humains se fait par l'inhalation des conidies [121]. En plus de l'inhalation, une voie secondaire de transmission a été rapportée soit par contact avec la peau ou à travers une blessure [122].

#### **IV.2.7. Méthodes d'évaluation des activités antimicrobiennes**

Une des difficultés pour les chercheurs dans ce secteur est l'absence d'une méthode normalisée pour examiner les activités biologiques des huiles essentielles [123]. L'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux utilisés en microbiologie, explique la variété des techniques employées. L'analyse fine des méthodes montre des variations de protocole. En plus de l'insolubilité des huiles essentielles, d'autres facteurs, tels que le volume de l'extrait placé sur le disque, l'épaisseur de la couche d'agar, l'emploi ou non de dissolvant, l'utilisation de différents milieux de culture, les durées d'incubations, etc., varient considérablement entre les études [124, 125, 74,126]. L'emploi de ces différentes méthodes peut donc induire des biais dans la comparaison des résultats des différentes études [76, 124,127].

Plusieurs chercheurs ont étudié l'activité antifongique de plusieurs huiles essentielles et ont prouvé que les valeurs des concentrations minimales inhibitrices peuvent être calculées par une gamme de méthodes. Ils ont prouvé aussi que ces concentrations trouvées par des analyses qui sont faites dans des conditions fermées (boîtes de Pétri scellées), étaient inférieures à celles ayant été réalisées par des analyses dans les conditions ouvertes [76,124,127].

#### **IV.2.8. Expression des résultats**

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'huiles essentielles. Les notions de CMI, CMB, CMFS et CMFC ne sont pas définies de façon précise et universelle, les auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités. Ces concentrations peuvent être exprimées en µg/mL [128] en µl/mL [129] ou en % (vol/vol) [130] ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile. L'action des composés volatils d'huiles essentielles sur la croissance



fongique a été démontrée et a des implications importantes pour le criblage de l'activité antifongique. De ce fait, les résultats des activités antifongiques des huiles essentielles dépendront non seulement du contact direct mais également de la présence et la concentration des composés volatils [123].

#### **IV.2.9. Les concentrations critiques**

##### **a. Concentration Minimale Inhibitrice CMI**

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber la croissance du microorganisme, après 18 heures de contact. Dans le cas des bactéries, la CMI est une donnée quantitative d'un antibiotique pour une souche bactérienne. C'est une information précise, nécessaire devant une bactérie multi résistante à la recherche du niveau d'activité d'un antibiotique et permettant un choix thérapeutique adapté [131]. Concernant les huiles essentielles, les techniques de détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI sont décrites par plusieurs études [132, 133,134,133].

##### **b. Concentration Minimale Bactéricide CMB**

La CMB est définie comme étant la concentration de l'antibiotique qui laisse moins de 0,01% de survivants de microorganismes après 18 heures. Les antibiotiques classés comme bactéricides sont ceux pour lesquels il y a peu d'écart entre la CMI et la CMB [135].

##### **c. Notion du bactéricide et bacteriostase**

Quand l'antibiotique inhibe seulement la croissance des bactéries on parle ici de l'effet bactériostase, mais lorsque l'antibiotique provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide. Les huiles essentielles sont généralement très peu solubles dans l'eau, ce qui rend leur étude biologique et pharmacologique difficile, pour résoudre ce problème plusieurs auteurs suggèrent l'utilisation des solvants organiques comme l'acétone, le DMSO, DMF, ou l'utilisation des produits émulsifiants (tension actif comme le tween 20 ou tween 80) pour aider l'huile essentielle de se solubiliser dans le milieu de culture [132,133,74,136].

## Références bibliographiques

- [1] Jensch D, Poschlod P. Germination ecology of two closely related taxa in the genus *Oenanthe*: Fine tuning for the habitat. *Aquat Bot.*, 2008, 89: 345-351.
- [2] Bach D, Mascré M, Deysson G, Organisation et classification des plantes vasculaires, cours de botanique générale quatrième série, tome II, Paris, 1979, 529 pp.
- [3] Heywood VH, Moore DM, Richardson IB, Stearn WT. Les plantes à fleurs 306 Familles de la flore mondiale, 1996, 218-219 pp.
- [4] Pimenov MG, Leonov MV. The genera of the Umbelliferae Nomenclator. Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom, 1993, 156 pp.
- [5] Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ; Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1963.
- [6] Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Tec & Doc, Paris, 2010, 1335 pp.
- [7] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4 Ed, Tec & Doc, Paris, 2009, 1269 pp.
- [8] Wood CE. A student's atlas of flowering plants: Some dicotyledons of eastern North America. Harvard University, prepared as part of the Generic Flora of the Southeastern U.S. Project, 1974, 78 PP.
- [9] Pujadas Salvà A J, *Daucus* L. in Flora Iberica, Araliaceae-Umbelliferae. *Real Jardín Botánico de Madrid*, 2003, 10: 97-125.
- [10] Sáenz Laín C. Research on *Daucus* L. (Umbelliferae). Actas III Congreso Óptima. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 1981, 37: 481-534.
- [11] Mazzoni V, Tomi F, Casanova J. A daucane-type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil. *Flv Frag .j*, 1999, 14: 268-272.
- [12] Meng-lan S, Watson MF. "*Daucus*" in Flora of China. Science Press (Beijing) and Missouri Botanical Garden Press, 2005, 14: 204.
- [13] Staniszevska M, Kula J. Composition of the essential oil from wild *carrot*. L. ssp. *carota* growing in Poland. *J Essent Oil Res.*, 2001, 13: 439-441.
- [14] Flamini G, Cioni PL, Maccioni S, Baldini R. Composition of the essential oil of *Daucus gingidium* L. ssp. *Gingidium*. *Food Chem.*, 2003, 103: 1237-1240.
- [15] Saad HEA, ElSharkawy SH, Halim AF. Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1995, 70: 79-84.

- [16] Kula J, Izydorczyk K, Czajkowska A, Bonikowski R. Chemical composition of carrot umbels oils from *Daucus carota* ssp. *sativus* cultivated in Poland. *Flav Frag J.*, 2006, 21: 667-669.
- [17] Lanfranchi DA, Laouer H, El Kolli M, Prado S, Maulay-Bailly C, Baldovini N. Bioactive Phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J Agric Food Chem.*, 2010, 58: 2174-2179.
- [18a] Djarri L, Medjroubi K, Akkal S, Elomri A, Seguin E, Vérité P. Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss. *Flav Frag J.*, 2006, 21: 647-649.
- [18b] Smaili T, Zellagui A, Cioni P L, Flamini G. A myristicin-rich essential oil from *Daucus sahariensis* growing in Algeria. *Natural product communications*, 2011, 6:883-886.
- [19] Jabrane A, Ben jannet H, Harzallah-skhir F, Mastouri M, Casanova J, Mighri Z. Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy, and in vitro Antibacterial Activity, *Chem. Biodivers.*, 2009, 6: 881-889.
- [20] Williams CA, Harborne JB. Essential oils in the spiny-fruited umbelliferae, *Phytochem*, 1972, 11: 1981-1987.
- [21] Gonny M, Bradesi M, Casanova J. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, *Flav Fragr. J.*, 2004, 19: 424-433.
- [22] Fu HW, Zhang L, Yi T, Tian JK. A New Sesquiterpene from the Fruits of *Daucus carota* L., *Molecules*, 2009, 14: 2862-2867.
- [23] Bauer K, Garbe D, Surburg H. In Common Fragrance and Flavor Materials, Preparation, Properties and Uses, 2 Ed, VCH, Weinheim, 1990, 142 pp.
- [24] Lawrence BM. Flavourings: Production, Composition, Applications, Regulations, *Flavor*, 1999, 24: 52.
- [25] Maxia A, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast, *Fitoterapia*, 2009, 80: 57-61.
- [26] Guerin JC, Ryan MF. Insecticidal effect of trans-2-nonenal, a constituent of carrot root, *Daucus carota*, *Experientia*, Basel, 1980, 36: 1387-1388.

- [27] Wu Y, Xu ZL, Li HJ, Meng XY, Bao YL, Li YX, Components of Essential Oils in Different Parts of *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm., *Chem. Res. Chinese U.*, 2006, 22: 328-334.
- [28] Mansour ES, Maatooq GT, Khalil AT, Marwan SM, Sallam A Z. Essential oil of *Daucus glaber* Forssk, *Naturforsch*, 2004, 59: 373-378.
- [29] Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro LR. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity, *J. Ethnopharmacol.*, 2008, 119: 129-134.
- [30] Lamarck M, Poiret JLM. Encyclopédie méthodique botanique, Tome II. *Agasse*, Paris, 1811.
- [31] Pujadas Salvà A J, *Daucus* L. in Flora Iberica, Araliaceae-Umbelliferae. *Real Jardín Botánico de Madrid*, 2003, 10: 97-125.
- [32] Brands S J .*Systema Naturae 2000*, Amsterdam, The Netherlands, 1989-2005.
- [33] Lecoq H, Juillet J. Dictionnaire raisonné des termes de botanique et des familles naturelles, Clermont- Ferrand, 1831, 419 pp.
- [34] Trabut L. Répertoire des noms indigènes des plantes dans le nord de l'Afrique, 1935, 91 pp.
- [35] Coste H, Flahault CH .*Flore descriptive et illustrée de la France, de la corse et des contrées limitrophe*, tome II, 1937, 158-627 pp.
- [36] Shahidi F. *Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications*, Ed aocs mission statement, 1997, 174-197 pp.
- [37] Bartosz G. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 2003, 9 : 5-21.
- [38] Pourrut B. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat, Toulouse, France, 2008.
- [39] Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, 2003.
- [40] Morelle J, L'oxydation des aliments et la santé. Ed Impression Librairie F-X. de Guibert, 2003, 257 pp.
- [41] Baudin B. Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*, 2006, 2: 43-52.
- [42] Negre-Salvayre A, Salvayre R. Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire. *OCL volume*, 2005, 12: 433-438

- [43] Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, Bora U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int.*, 2008, 41: 1-15.
- [44] Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.*, 2009, 112: 654-658.
- [45] Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int.*, 2002, 8: 121-137.
- [46] Huang D, Ou B, Prior RI. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric Food Chem.*, 2005, 53: 1841-1856.
- [47] Sanchez-Moreno C, Larrauri JA. Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci. Technol. Int.*, 1998, 4: 391-399.
- [48] Cao GH, Alessio HM, Cutler RG .Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med.*, 1993, 14: 303-311.
- [49] Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.*, 1993, 84: 407-412.
- [50] Benzie I F F, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analyt Biochem.*, 1996, 239: 70-76.
- [51] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol.*, 1995, 28: 25-30.
- [52] Li C, Oldham CD, May SWN. N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem J.*, 1994, 300: 31-36.
- [53] Winston GW, Regoli F, Dugas AJ, Fong JH, Blanchard KA. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med.*, 1998, 24: 480-493
- [54] Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters.* 1985, 187: 33-37.
- [55] Popov I, Lewin G, Baehr R. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta.*, 1987, 46: 775-779.
- [56] Charfi D. Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax, 1995.

- [57] Szent-györgyi A. The identification of vitamin C. *Science*, 1938, 87: 214-215.
- [58] Olcott HS, Mathill HA. Antioxidants and autoxidation of fats. VII. Preliminary classification of inhibitors. *J Am Chem Soc.*, 1936, 58: 2204-2208.
- [59] Cuvelier ME, Berset C , Richard H, Pellerin P. Pouvoir antioxygène d'extraits naturels. *9ème journée internationale des huiles essentielles*, Digne les Bains, 1990, 374-385 pp.
- [60] Eddari H. Etude de la sauge officinale, Thèse de doctorat, université de Lyon, 1994.
- [61] Fiess M. Antioxygènes contre le rancissement. *Revue de l'Industrie Agroalimentaire*, 1994, 520: 47-50.
- [62] Chipault JR, Mizuno CL, Hawhinsj M, Lundberg WO. The antioxidant properties of natural spices. *Food Res.*, 1952, 17: 46.
- [63] Chipault JR, Mizuno CL, Hawhinsj M, Lundberg WO. Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions. *Food Res.*, 1955, 20: 443.
- [64] Just N, Nyunga M, Lelong J, Wallaert B. Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, 2005, 26: 331-334.
- [65] Sherwin ER. Antioxidants for vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc.*, 1976, 53: 430-436.
- [66] Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS .*Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz J Microbio.*, 2010, 41: 1070-1078.
- [67] Hussain AI, Anwar F, THS Sherazi, Przybylski R. Chemical composition antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* 2008, 108: 986-995.
- [68] Hussain AI. Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. *Doctorale thesis*, Pakistan 2009, 257pp.
- [69] Caillet S, Lacroix M. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA). 2007, 1- 8 pp.
- [70] Kulevanova S, Panovska TK. Antioxidant activity of essential oils of different Wild *thymus* L. Species. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 2001, 20: 61-66.

- [71] Raza SA, Rehman A, Adnan A, Qureshi F. Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and Butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions. *Biharean Biol.*, 2009, 3: 71-75.
- [72] Himed L. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon*: application à la margarine. *Mémoire de Magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie, 2011,91 pp.
- [73] Zhiri A. Aromathérapie, Nutranews, Ed: fondation libre choix ; 2006, 2-16.
- [74]Lahlou M. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytoth Res.*, 2004, 18: 435-448
- [75] Pibiri MC. Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, 2006, 28-52 pp.
- [76] Degryse AC, Delpla I, Voinier MA. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 2008, 87 pp.
- [77] Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J App Microbiol.*, 2001, 91: 492-497.
- [78] Zambonelli A, D'Aurelio AZ, Severi A, Benvenuti E, Maggi L, Bianchi A. Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of *thymus vulgaris* L. *J. Essent. Oil Res.*, 2004,16: 69-74.
- [79] Bourrel C. Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de l'Institut National Polytechnique de toulouse. Toulouse, France, 1993.
- [80] Agnihotri A, Khatoon S, Shanta M. Pharmacognostical evaluation of an antioxidant plant-Acorus calamus linn. *Nat. Prod. Sci.*, 2003, 9: 264-269.
- [81] Caccionni D, Guizzardi M, Biondi D, Agantio R, Guiseppe R. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on penicillinum digitatum and penicillium italicum. *International J. Food Microbiol.*, 1998, 43: 73- 79.
- [82] Franchomme P, L'aromatologie à visée anti-infectieuse. *Phytomedecine*, 1981, 1: 25-47.
- [83] Lec KH, Huang ES, Paguna JS, Geissman TA, *Cancer Res.*, 1971, 31: 1649-1654.
- [84] Rhayour K. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium*



*fortuitum*. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 2002, 170p.

[85] Souza EL, Stamford TLM, Lima EO. Sensitivity of spoiling and pathogen food related bacteria to *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil. *Braz J Microbiol.*, 2006, 37: 527-532.

[86] Bajpai VK, Kang SC. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 2010, 87: 327-336.

[87] Souza EL, Guerr NB, Stamford TLM, Lima EO. Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, 2006, 87: 22-25.

[88] Chami F. Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimées. Thèse de doctorat, Fès, Maroc, 2005, 266pp.

[89] Pavel M, Ristić M, Stević T. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2009, 75: 27-34.

[90] Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prote.*, 1995, 58: 280-283.

[91] Malecky M. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris, 2007, 30-35pp.

[92] Bisognano C, Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires, Thèse de Doctorat, Genève, 2000.

[93] Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol.*, 2000, 88: 170-175.

[94] Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJP, Begin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, 37: 155-162.



- [95] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol.*, 1999, 86: 985-990.
- [96] Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology.* 2005, 38: 565-570.
- [97] Ahmad AM, Khokhar I, Ahmad I, Kashmiri MA, Adnan A, Ahmad M. Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *Int J Food Safety.* 2006, 5: 56-60.
- [98] Ağaoğlu S, Dostbil N, Alemdar S. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. *Bull Vet Inst Pulawy.*, 2007, 51: 53-57.
- [99] Bouguerra A, Zeghou K. Etude des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle extraite des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. *Mémoire d'ingénieur.* INATAA, Université Mentouri Constantine, 2009, 46pp.
- [100] Derwich E, Benziane Z, Boukir A. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric Biol. Sci.*, 2010, 6: 191-198.
- [101] Bari MA, Islam W, Khan AR, Mandal A. Antibacterial and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae). *Int. J. Agric. Biol.*, 2010, 12: 386-390.
- [102] Mejlholm O, Dalgaard P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *lett appl microbiology.*, 2002, 34: 27-31.
- [103] Karatzas AK, Kets EPW, Smid EJ, Bennik MHJ. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Appl Microbiol.*, 2001, 90: 463-469.
- [104] Gill AO, Delaquis P, Russo P, Holley RA. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 73: 83-92.
- [105] Percival SL. Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, 480 pp.
- [106] Dworkin MM, Falkow S. Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, 2006, 1248 pp.
- [107] Percival SL. Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, 480 pp.

- [108] Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, 4: 551-560.
- [109] Méric de Bellefon L, Legrand JC, Codden T, Carlier E, Vanhaeverbeek M. *Rev. Méd Brux.*, 2007, 28: 460-463.
- [110] Ruiz-Garbajosa P, Canton R, Pintado V, Coque TM, Willems R, Baquero F, Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. *Clin Microbiol Infect.*, 2006, 12: 1193-1198.
- [111] Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Veterinary Journal*, 1997, 153: 9-29.
- [112] Donnelly CW. *Listeria monocytogenes*: A continuing challenge. *Nutrition Reviews*, 2001, 59: 183-194.
- [113] Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology, 9.Ed. American Society of Microbiology Press, 2007.
- [114] Logan NA, Rodriguez-Diaz M. *Bacillus spp.* and Related Genera. In S.H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 2. Ed, 2006, 139-158pp.
- [115] Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R. The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *PLoS One.*, 2011, 6: 176-177.
- [116] Chabasse D, Guiguen CI, Contet-Audonneau N. Mycologie médicale, 3.Ed. Masson, collection abrégés, 1999.
- [117] Moulinier C. Parasitologie et mycologie médicales : élément de morphologie et de biologie, Ed. Emi, 2003.
- [118] Delorme J, Robert A. Mycologie médicale. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, Mont-Royal, Québec, 1997, 184pp.
- [119] Rasooli I, Abyaneh MR. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 2004, 15: 479-483.
- [120] Takahashi H, Kamimura H, Ichinoe M. Distribution of Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Sugarcane Fields in the Southernmost Islands of Japan. *J. Food Prot.*, 2004, 67: 90-95.

- [121] Desai MR, Ghosh S. Occupational exposure to airborne fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. flavus* strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2003, 10: 159-162.
- [122] Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses.*, 2009, 52: 206-222.
- [123] Wilkinson JM. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Ed. *WILEY-VCH* Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006, 157-165 pp
- [124] Inouye S, Tsuruoka T, Watanabe M, Takeo K, Akao M, Nishiyama Y, Yamaguchi H. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 2000, 43: 17-23.
- [125] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol.*, 2003, 95: 853-860.
- [126] Tepsorn R. Antimicrobial activity of the traditional medicinal plants extract incorporated alginate-tapioca starch based edible films against food related bacteria including foodborne pathogens. *Doctorate Theses*. Thailand, 2009, 370 pp.
- [127] Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils, *Microbiol. Immunol.*, 2001,45: 201–208.
- [128] Oussou KR, Yolou S, Boti JB, Guessennnd KN, Kanko C, Ahibo C, Casanovad J. Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *Eur J Sci Res.*, 2008, 24: 94-103.
- [129] De Billerbeck VG, Roques C, Vanière P, Marquier P. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Revue hygiène*. 2002, 10: 248-254.
- [130] Bourkhis B, Ouhssine M, Hnach M, Bourkhiss M, Satrani B, Farah A. Composition chimique et bio activité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2007, 146: 75-84.
- [131] Eyouen A, Alouf J, Montagnier L. *Traité de microbiologie clinique*, Ed. Piccin, Padou, Italie, 1998.
- [132] Bendahou M, Muselli A, Grignon- Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini AF, Costa J. Antimicrobial activity and Chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential Oil and Extract Obtained by Microwave extraction: Comparison with Hydrodistillation. *Food chem.*, 2008, 106: 132-139.

[133] Duraffourd C, Lapraz JC, Traité de phytothérapie clinique, 3. Ed. Masson, Paris, 2002.

[134] Raoult D, Dictionnaire de maladies infectieuses, Ed. Elsevier, Paris, 1998.

[135] Nauciel C, Bactériologie médicale, Masson. Ed. Paris, 2000.

[136] Lens-Lisbonne C, Cremieux A, Maillard C, Balansard D. *J Pharm Belg.*, 1987, 42: 297-302.

## *Chapitre II*

### *Matériel et méthodes*

## I. Provenance du matériel végétal et identification

### *Daucus crinitus* :

#### Étude de la variabilité du lieu de récolte:

Les échantillons de chaque organe (racines, tiges, feuilles, fleurs et ombelles) du *D. crinitus* ont été collectés au mois de novembre 2008 dans 4 stations situées dans la wilaya de Tlemcen :

Bensekrane (A) [260 m, 35°04'N 1°13'O], Sid Abdelli (B) [258 m, 35°05'N 1°12'O], Terni (C) [1199 m, 34°47'N 1°21'O] et Beni Snous (D) [854 m, 34°37'N 1°34'O].

#### Étude de la variabilité des cycles végétatifs :

Les échantillons (tiges et feuilles) du *D. crinitus* ont été récoltés en 2009 à la fin du mois de Mars (stade végétative), à la mi-Mai (stade de floraison) et à la fin du mois de Juillet (en pleine floraison) dans la région forestière de Chelaida [34° 57' 17.39" N 1° 13' 18.92" W ] à environ 8 km au Nord Est de Tlemcen-Algérie.

#### Étude de la composition chimique des extraits au solvants (acides gras et des fractions insaponifiables):

Des échantillons de chaque organe (tiges, feuilles et racines) du *D. crinitus* étaient recueillis au mois de septembre 2009 dans la forêt de Bensekrane [287 m, 35° 07'N 1° 22'O].

#### Étude des extraits aqueux et méthanolique :

Les parties aériennes (tiges / feuilles) du *D. crinitus* étaient recueillies en Novembre 2010, à Bensekrane [260 m, 35° 04'N 1° 13'O].

L'identification de la plante a été faite par le professeur **M. BOUAZZA** (Laboratoire d'écologie et de gestion de l'écosystème de l'Université de Tlemcen Algérie). Les spécimens ont été déposés dans l'herbier du laboratoire de botanique de l'université de Tlemcen (voucher numéro : UBL 05.09).

### *Daucus muricatus*

Les Organes séparés (tiges, feuilles, fleurs, ombelles et les racines) du *D. muricatus* ont été récoltés dans la forêt de Bensekrane [287 m, 35 ° 07'N 1° 22'O] en Septembre 2009. L'espèce a été identifiée par le Pr. **M BOUAZZA** (Laboratoire d'écologie et de

gestion de l'écosystème de l'Université de Tlemcen Algérie). Les spécimens ont été déposés dans l'herbier du laboratoire de botanique de l'université de Tlemcen (voucher numéro: UBL 128.09).

#### ***D. carota ssp. hispanicus* Gouan**

Les parties aériennes et les racines étaient recueillies en Juillet 2012, à partir de 10 stations d'Algérie : Kihal (S1) [490 m, 35° 12' 16"N 1° 11'46"E], Amieur (S2) [319m, 34° 02' 05"N 1° 14'17"E] , Bensekrane (S3) [263 m, 34° 04' 49"N 1° 13'10"E], Saf Saf (S4) [599m, 34° 53'58"N 1° 16'49"E], Mansourah (S5) [907 m, 34° 51' 27"N 1° 20'50"E], Beni Boublene (S6) [908 m, 34° 51' 41"N 1° 20'15"E], Lalla Setti(S7) [1030 m, 34° 51' 45"N 1° 18'56"E], Mafrouche (S8) [1140 m, 34° 51' 00"N 1° 17'48"E], Hafir (S9) [1100 m, 34° 49' 60"N 1° 22'0"E], Terny (S10) [1220 m, 34° 47' 44"N 1° 21'32"E].

Le matériel végétal était identifié par le Pr. **Noury BENABADJI** (Laboratoire de botanique d'Ecologie et gestion des écosystèmes de l'Université de Tlemcen en Algérie). Les spécimens étaient déposés dans l'herbier de l'Université de Tlemcen.

## **II. Méthodes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles**

De manière générale, la distillation est un procédé de séparation basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée [1]. La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes. On parle de distillation simple ou fractionnée lorsqu'il s'agit de liquides miscibles. On peut également procéder à la distillation de liquides non miscibles. C'est le cas de l'hydrodistillation des huiles essentielles.

En ce qui concerne notre travail, les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger et une autre technique de caractérisation la microextraction sur phase solide (SPME, *Solid phase microextraction*).

### II.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique.

Cependant une verrerie adaptée a été mise en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobage de l'huile essentielle. Ces phénomènes ont été rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clevenger [2].



**Figure II.1** : Montage d'hydrodistillation

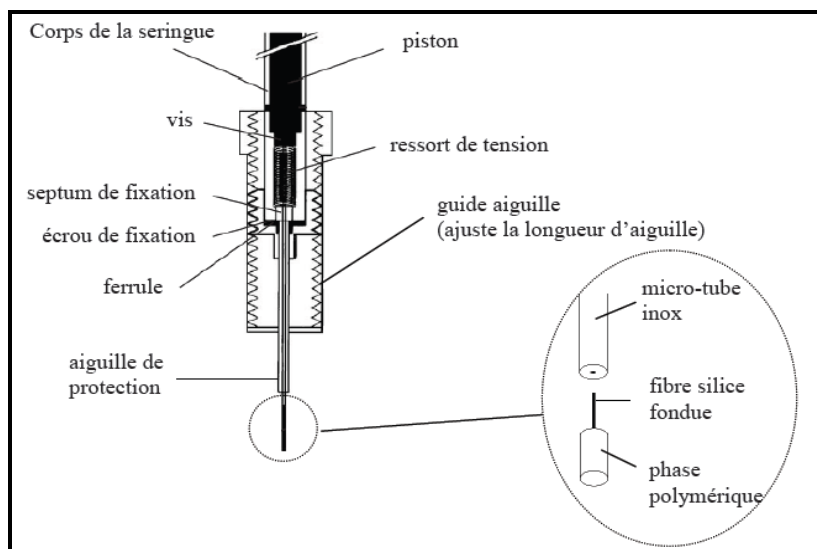
La matière végétale est introduite dans un ballon de six(6) litres après avoir été coupée en petits morceaux avec quatre(4) litres d'eau. La mise en marche du chauffage se fait à douce ébullition. Le réfrigérant est mis en fonction en réglant le débit d'eau. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation. La récupération de cette huile essentielle (pour l'analyse chromatographique) est effectuée du haut de l'essencier, à l'aide d'une pipette pasteur.



Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'être retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant (sulfate de magnésium anhydre) : C'est l'opération de séchage. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des piluliers en verre ambré et conservée au congélateur jusqu'à analyse. Les rendements en huiles essentielles ont été calculés par rapport à la matière végétale sèche.

## II.2. Extraction des composés volatils : Micro extraction en phase solide «MEPS»

Cette méthode d'extraction présente l'avantage de regrouper toutes les étapes de la préparation d'un échantillon (extraction, concentration et transfert au chromatographe) en un seul procédé. En particulier, elle peut se révéler une meilleure méthode pour les analyses qui requièrent des extractions longues et coûteuses et nécessitent une grande consommation de solvants.



**Figure II.2 : Dispositif MEPS**

La MEPS est constituée d'une fibre en silice fondue dont une partie est insérée et maintenue dans un micro-tube en acier inoxydable. L'autre partie de la fibre est recouverte d'une phase polymérique pour extraire les composés organiques d'un échantillon [3], comme le montre le schéma de la Figure II.2. Introduit dans une aiguille inox, le micro tube fonctionne alors comme un piston et permet ainsi au polymère soit d'être exposé à la matrice pour l'extraction ou d'être protégé lors du

stockage par exemple. L'ensemble est supporté par une seringue modifiée permettant une utilisation plus aisée.

L'Edt-MEPS est une technique d'extraction sans solvant très simple et rapide qui est maintenant parfaitement automatisée. Les fibres peuvent être réutilisées plusieurs fois, ce qui en fait une technique peu onéreuse. Cependant, l'optimisation des conditions d'extraction peut se révéler assez longue. Selon la littérature, il apparaît que le meilleur rendement d'extraction par exposition dans l'Edt, est obtenu avec les fibres triples constituées d'une phase liquide, le Polydiméthylsiloxane (PDMS) pour les composés les moins polaires et de deux phases solides poreuses, le Carboxen (CAR) et le Divinylbenzène (DVB) pour les composés les plus polaires.

Ce type de fibre permet l'extraction de composés volatils sur une large gamme, s'étendant de C<sub>3</sub> à C<sub>20</sub>. Pour l'étude des composés volatils extraits d'une plante, la préparation de l'échantillon est généralement réalisée à température ambiante (TA) sur du végétal frais, coupé en morceau dont le rapport entre la masse de la matrice et le volume de l'espace de tête sont compris entre 0.01 et 0.1 [4-5-6].

Les composés volatils émis par le *D. crinitus* et le *D. muricatus* ont été étudiés en utilisant Edt-MEPS selon des paramètres optimisés. Les organes ont été coupés grossièrement avec des ciseaux (1-2 cm de long), le dispositif MEPS recouvert avec (DVB/CAR/PDMS; 30 µm) a été utilisé pour l'extraction des composés volatils de la plante. L'optimisation des paramètres d'extraction a été réalisée en utilisant la partie aérienne fraîche (1g dans un flacon de 20 mL) et sur la base de la réponse maximale mesurée en CPG-FID c'est à dire la somme des aires de tous les pics chromatographiques intégrés sur le chromatogramme.

La température, le temps d'équilibrage et le temps d'extraction ont été sélectionnés après 9 expériences combinant quatre (4) températures (30, 50, 70 et 90°C), quatre équilibrages (20, 40, 60 et 80 min) et trois (3) temps d'extraction (15, 30 et 45 min). Après prélèvement, la fibre SPME a été insérée dans la CPG et CPG-SM pour injection/désorption des composants volatils (5min); tous deux à l'aide du mode d'injection

SPLITLESS. Avant échantillonnage chaque fibre a été reconditionné pendant 5 mn dans le port d'injection CG à 260°C.

### **III. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles**

#### **III.1. Analyse par CPG/FID**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem CPG, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composants, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 µm) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (1mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 45 mm à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µL. Pour chacun des composants, les indices de rétention (Ir) polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

#### **III.2. Couplage CPG/Spectrométrie de masse**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i.; épaisseur du film : 0,25 µm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur est l'hélium (1mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25psi. La température de l'injecteur est de 250°C. La programmation de la température se fait en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 35 mm à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80.

La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µl. La détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C.

***En mode impact électronique :***

Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. La température de la source est de 150°C.

**III.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

C'est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules. Dans cette optique les données de la littérature constituent une base intéressante permettant la comparaison avec les valeurs des déplacements chimiques du carbone 13 des composés absents de nos bibliothèques de données, mais aussi elles proposent les valeurs de déplacements chimiques de molécules « modèles » à partir desquelles des reconstitutions de spectres sont possibles.

**IV. Méthodologie d'analyse**

Une huile essentielle, fractionnée ou non, est analysée simultanément par CPG/Ir et CPG/SM. Le calcul des indices de rétention, polaires et apolaires, et la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir. L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, l'une élaborée au laboratoire et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées (König-Joulain [7-8], Wiley [9-10], Adams [11], Nist [12] ).

Chaque proposition du logiciel de comparaison des spectres de masse est assortie d'une note de concordance qui reflète la validité de la structure proposée. Si la note de concordance est correcte, on compare les indices de rétention du constituant proposé à ceux présents dans la bibliothèque élaborée au laboratoire, ou dans des bibliothèques commerciales (Joulain [7-8], Jennings [13], Adams [11] ), ou répertoriés dans la littérature.

Toutefois, on ne se limite pas simplement à la note de concordance ; on procède systématiquement à l'examen du spectre de masse du composé recherché afin d'en tirer les principales informations : masse de l'ion moléculaire, fragmentations caractéristiques ou encore mise en évidence de coélutions. A ce stade, trois approches différentes (**a**, **b**, **c**) sont envisagées :

(a), le spectre de masse du constituant et ses indices de rétention correspondent à ceux d'un composé présent dans les bibliothèques afférentes élaborées au laboratoire. L'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté. Sa structure peut éventuellement être confirmée par RMN du carbone-13.

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

(c), les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé d'aucune bibliothèque. Dans ce cas, deux solutions sont envisageables :

- soit le composé est présent dans les bibliothèques RMN du carbone-13 (auquel il est identifié sans ambiguïté),
- soit le composé est absent des bibliothèques RMN du carbone-13, auquel nous n'avons d'autre ressource que le schéma classique de purification du constituant dans l'optique d'une étude structurale.

C'est cette méthodologie que nous avons mis en œuvre pour l'analyse des huiles essentielles et des fractions volatiles des différentes espèces de *Daucus* (*crinitus*, *muricatus* et *carota ssp hispanicus*).

## V. Etudes statistiques

Les études statistiques ont été menées avec XLSTAT Version 2009.4.06. Les ACP ont été réalisées avec des matrices de type Pearson. Les CAH et dendrogrammes ont été réalisés avec des matrices de dissimilarités calculées en distance euclidienne et la méthode d'agrégation choisie systématiquement est le lien moyen. Les composés dont le pourcentage relatif était au moins égal à 2 % dans l'un des échantillons étudiés ont été inclus dans les matrices de CAH et ACP.

## VI. Criblage phytochimique

### VI.1. Préparation de l'extrait aqueux et méthanolique

Deux solvants (méthanol et eau) ont été utilisés successivement afin d'extraire les différentes familles de composés chimiques dans un extracteur continu de Soxhlet.



**Figure II.3 :** Extracteur de soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition, puis condensé avec le réfrigérant, dans le réservoir à siphon, contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation de solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant. Ainsi, 15 g de matériel végétal pulvérisé a été extrait par 200 mL de solvant pendant 3 à 4h, jusqu'à l'épuisement total. Il serait nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extraits. Les solutions récupérées sont évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après le calcul des rendements, les extraits secs sont repris dans leurs solvants pour subir les différents tests phytochimiques et biologiques.

## VI.2. Tests de caractérisation

Une fois le matériel végétal prétraité, les différentes parties de la plante (racines, feuilles/tiges) sont soumises à des tests pour détecter de façon qualitative les principales familles de produits naturels qui peuvent se trouver dans l'échantillon: La détection de ces familles constitue le screening ou criblage phytochimique. Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et de complexation avec formation de complexes insolubles et colorés. La coloration observée et provoquée par l'utilisation d'un réactif approprié, est due généralement à la formation d'une conjugaison ou d'une insaturation dans une molécule. Les essais phytochimiques ont été menés suivant les méthodes phytochimiques usuelles et décrites pour la plupart par Harborne (1998) [14].

- Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes ont été mis en évidence par la réaction à la cyanidine : Dans un tube à essai de 5 mL d'infusé, ajouter 5mL d'alcool chlorhydrique ; 1 mL d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de précipitation pendant quelques minutes.
- L'apparition d'une coloration rose orangée indique la présence de flavones ou rose-violacée indique celle des flavanones ou rouge indique la présence de flavonones et flavanonols.

La même réaction, sans ajouter de copeaux de magnésium et chauffer pendant 15 mn au bain-marie, permet de détecter la présence de leucoanthocyane en cas d'apparition de coloration rouge cerise ou violacée ; les catéchols donnent une teinte brun-rouge.

- La caractérisation des tanins était faite par la réaction au chlorure ferrique:

Nous avons commencé par la préparation de l'infusé:

Mettre la poudre sèche (5 g) dans de l'eau distillée bouillante (100 mL) contenue dans un erlenmeyer de 250 ml puis laisser infusés pendant 15 mn .A 30 mL d'infusé à 5%, nous avons ajouté 15 mL de réactif de Stiasny (10 mL de formol à 40% plus 5 mL HCl concentré), puis chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques. Nous avons filtré et saturé le filtrat

d'acétate de sodium pulvérisé. Le développement d'une teinte bleu noire après addition de 1 ml d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1% indique la présence de tanins galliques.

- La recherche des alcaloïdes a été faite à l'aide des réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes. Deux réactifs voire trois ont été utilisés à savoir le réactif de Dragendorff, le réactif de Mayer et le réactif de Wagner.

Sur l'extrait méthanolique :

Evaporer 25 mL de l'extrait méthanolique à sec, ajouter 5 mL d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Mayer et/ ou de Wagner. La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels.

Sur l'extrait aqueux :

Prendre 25 mL de l'extrait aqueux, ajouter 15 mL d'HCl 10%, porter l'ensemble à reflux pendant 30 mn, refroidir le mélange et l'extraire 3 fois avec l'éther diéthylique. Décanter et effectuer les tests sur les deux phases avec le réactif de Wagner et/ou de Mayer. Un test positif est révélé par la présence de précipité ou turbidité.

- La recherche des saponosides est basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses contenant des saponosides de mousser après agitation :  
Ajouter à 2 mL de la solution à tester un peu d'eau et ensuite agiter d'une manière forte. Laisser reposer le mélange pendant 20 mn. Une écume persistante confirme la présence des saponosides.
- La recherche des coumarines s'est fait grâce au test suivant :  
Evaporer 5 mL de la solution extractive. Dissoudre le résidu dans 1 à 2 mL d'eau chaude. Diviser le volume en deux parties. Prendre le demi-volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière UV. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.



- La détection des acides phénoliques a été faite à l'aide du perchlorure de fer : Ajouter a 1 ml de solution à l'éthanol quelques gouttes de perchlorure de fer. Une coloration bleue-verte confirme la présence des acides phénoliques.

## **VII.Extraction des acides gras et des insaponifiables**

### **VII.1. Préparation des échantillons**

Les échantillons (racines, feuilles et tiges) ont été séchés a l'air et broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine ( $\varnothing = 0.355-0.600$  mm). 50 g de chaque organe ont été extraites avec 2x200 mL de méthanol et d'éther de pétrole sous reflux (soxhlet), séparément. Après évaporation du solvant sous pression réduite, les extraits ont été rassemblés et séchés sur  $MgSO_4$ .

### **VII.2.Extraction des insaponifiables :**

1 g d'extrait d'éther de pétrole est saponifié avec 50 mL de solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (2 mol/L), pendant 1 h sous reflux; les composants de l'insaponifiable sont ensuite extraits trois fois avec 100 mL d'éther. Les extraits sont rassemblés et lavés trois fois avec 50 mL d'eau déminéralisée. Le solvant est ensuite éliminé à 35 °C sous pression réduite avec un évaporateur rotatif puis pesé.

### **VII.3.Extraction des acides gras :**

La solution savonneuse aqueuse obtenue précédemment est acidifiée avec du HCl 1N, jusqu'à précipitation des acides gras (pH 5-6). Les acides gras libérés sont extraits à l'éther (3x 50 mL) et séchés sur  $MgSO_4$  puis pesés. Les acides gras sont transformés en leurs dérivés ester méthylique par l'ajout d'une solution méthanolique de  $BF_3$  à 10%. Par la suite, les acides gras sont extraits trois fois avec 50 mL d'hexane à température ambiante. La couche organique est évaporée et séchée sur  $Na_2SO_4$ .

## **VIII. Calcul du rendement**

Le rendement est le rapport de la quantité de l'extrait recueillie après extraction sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage.

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

**P1** : poids du ballon après évaporation ; **P2** : poids du ballon avant évaporation (vide);

**P3** : poids de la matière végétale de départ.

### **IX. Dosage des phénols totaux :**

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et leur teneur sont extrêmement variables d'une espèce à autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3 PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3 PMO_{12}O_{40}$ ). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé [15].

#### **IX.1. Protocole :**

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par Miliauskas, 2004 [16]. 1 mL de l'extrait éthanolique de la plante est mélangé avec 5 mL de folin ciocalteu (2M) dilué 10 fois et 4 mL de carbonate de sodium ( $Na_2 CO_3$ ) à concentration de 75 g/L. L'absorbance est mesurée à 765 nm, après incubation pendant 1 heure à température ambiante. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, en suivant les mêmes étapes du dosage. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

La quantité des phénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$C = c.V/m$$

C : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique /g d'extrait de la plante).

c : concentration d'acide gallique (mg/mL).

v : volume de l'extrait (mL).

m : masse de l'extrait pur de plante (g).

#### **IX.2. Dosage des flavonoïdes :**

La quantification du contenu flavonoïque est estimée par la méthode d' $AlCl_3$ , selon le protocole modifié de: Kumaran et Karunakaran, 2005 [17].

1mL de l'extrait de la plante est mélangé avec 1 mL de la solution trichloride d'aluminium (10%), 0.2 mL d'acétate de potassium 1 M et 5.6 mL de H<sub>2</sub>O. L'absorbance est mesurée à 420 nm, après incubation à température ambiante pendant 40 min. Dans les mêmes conditions, la solution standard d'acide gallique est préparée avec une concentration égale à 0,1 mg/mL. Toutes les manipulations sont répétées au moins 2 fois. Le taux des flavonoïdes contenus dans l'extrait de la plante est calculé selon l'équation suivante :

$$X = (A \cdot m_0) / (A_0 \cdot m)$$

X : la quantité des flavonoïdes (mg équivalent acide gallique /g d'extrait plante).

A : l'absorption de l'extrait.

A<sub>0</sub> : l'absorption de la solution acide gallique.

m : masse de l'extrait de plante (mg).

m<sub>0</sub> : masse de l'acide gallique dans la solution.

**Tableau II.1.** Données expérimentales pour le dosage des flavonoïdes

Extraits	A	A <sub>0</sub>	m (mg)	m <sub>0</sub> (mg)
Extrait aqueux racines	0.149	0.044	0.5	0.005
Extrait aqueux P.A	0.263	0.044	0.5	0.005
Extrait méthanolique racines	0.168	0.044	0.5	0.005
Extrait méthanolique P.A	0.395	0.044	0.5	0.005

P.A : partie aérienne

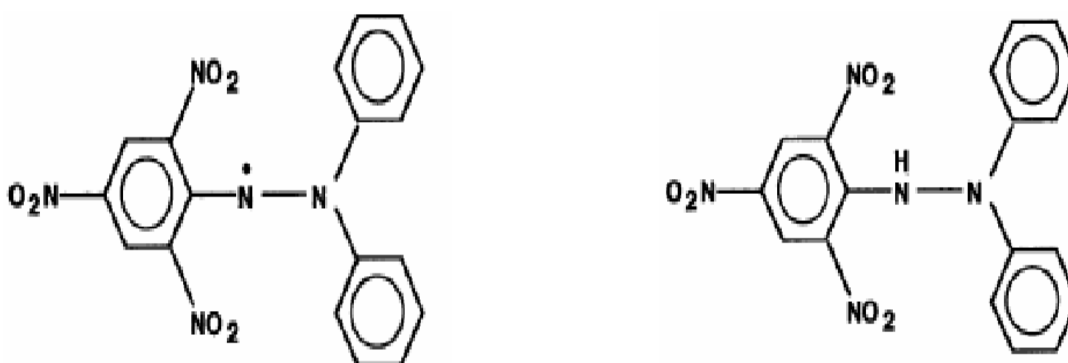
## X. Évaluation de l'activité antioxydante

### X.1. Test DPPH :

Utilisé en tant que réactif, DPPH (2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle hydrate) offre évidemment une méthode pratique et précise pour titrer les groupes oxydables d'origine naturelle ou synthétique antioxydants. 1 mL de 0,006 % solution de DPPH

dans l'éthanol est mélangé avec un volume égal d'extraits d'essai à différentes concentrations et maintenu dans l'obscurité pendant 30 min. l'absorbance a été lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS Spectrophotometer, Optizen POP).

- ✓ Le contrôle négatif est composé de 1 mL de la solution éthanolique au DPPH et de 1 mL d'éthanol.
- ✓ Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé [18].



**Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)      Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)**

**Figure II.4 : Forme libre et réduite du DPPH.**

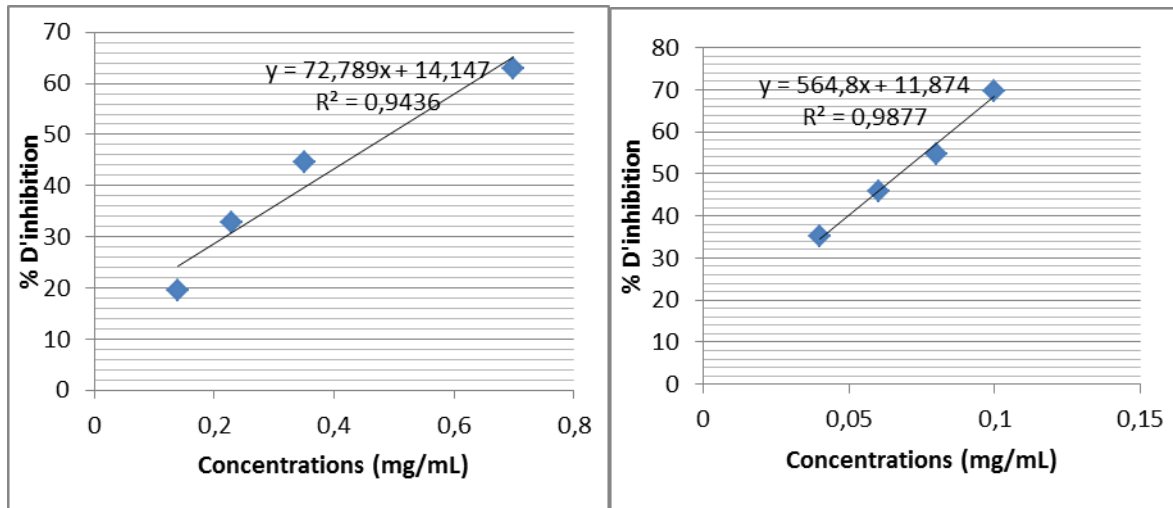
## X.2. Expression des résultats :

- Calcul des pourcentages d'inhibition : Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante:

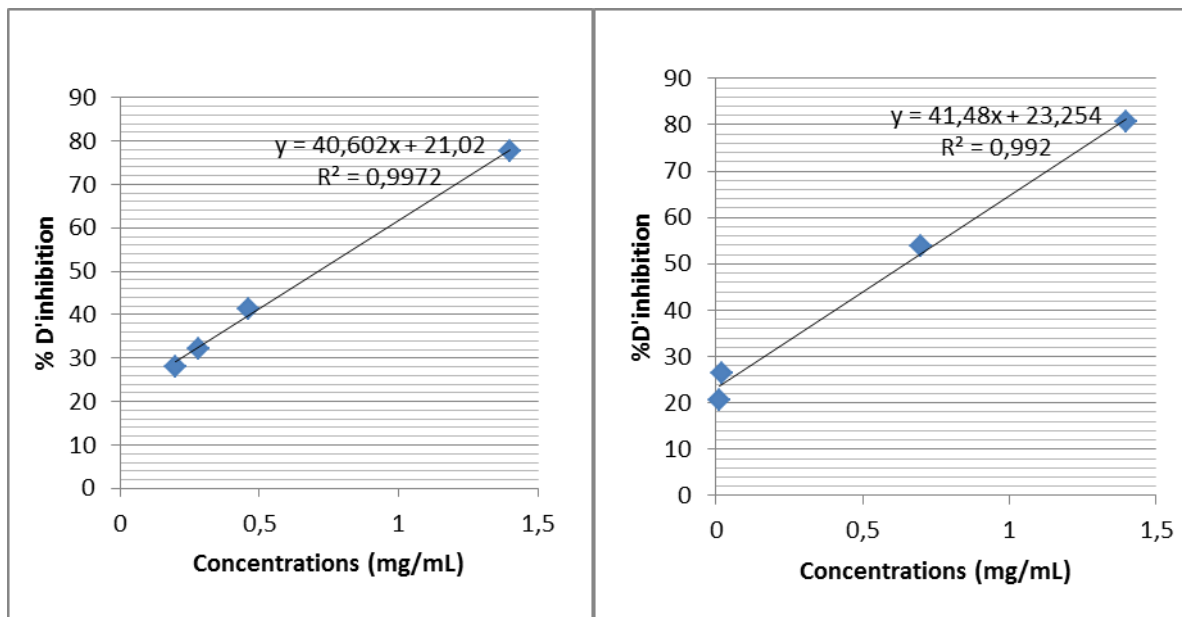
$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100 \text{ [19].}$$

$A_C$  : Absorbance du contrôle ;  $A_T$  : Absorbance du test effectué.

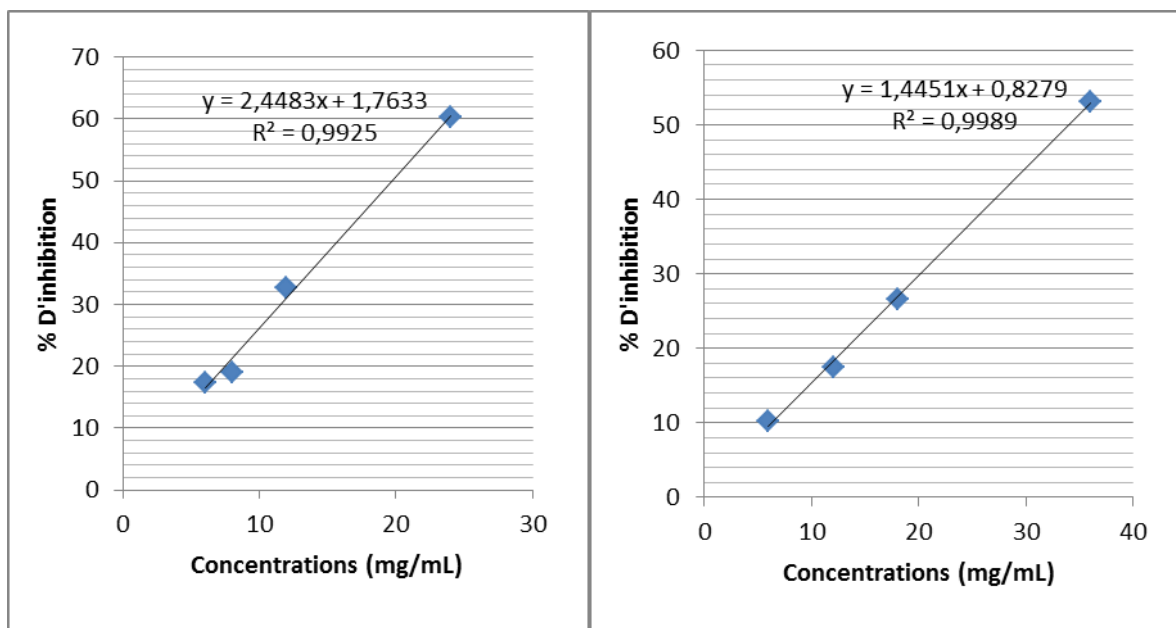
- Calcul des  $IC_{50}$  :  $IC_{50}$  ou concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée  $EC_{50}$  pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH°. Les  $IC_{50}$  sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées [20].



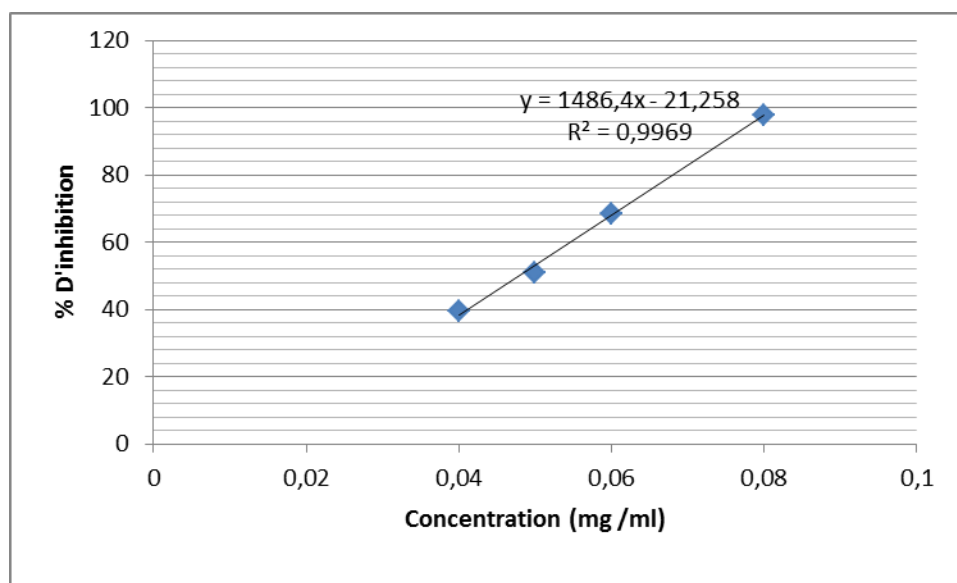
**Figure II.5 :** Capacité antioxydante de l'extrait méthanolique des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*



**Figure II.6 :** Capacité antioxydante de l'extrait aqueux des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.



**Figure II.7:** Capacité antioxydante de l'huile essentielle des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.



**Figure II.8 :** Capacité antioxydante de l'acide ascorbique.

- Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity): L'activité antiradicalaire est déterminée en calculant l'inverse des valeurs des  $IC_{50}$  : [21]

$$A_{AR} = 1 / IC_{50}$$

## **XI. Activité antimicrobienne**

### **XI.1. Les micro-organismes et les conditions de culture**

#### ***D. crinitus* :**

*Bacillus cereus* (ATCC 11778, gram-positif), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925, gram-positif), *Escherichia coli* (ATCC 9847, à Gram négatif) et *Candida albicans* (IPP 444) sont utilisés pour la détermination de l'activité antimicrobienne.

#### ***D. muricatus***

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude, à savoir *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* (Gram positif), *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (Gram négatif) ont été isolées au département médical de réanimation de l'hôpital de Tlemcen. Les levures *Candida albicans* ont été isolées au département de dermatologie de l'hôpital même.

#### ***D. carota ssp. hispanicus***

L'huile essentielle des racines et des parties aériennes du *D. carota ssp. hispanicus* était testée contre huit micro-organismes, y compris Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, et Gram négatif: *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 et deux microorganismes fongiques, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus flavus* MNHN 994294.

### **XI.2 Milieux de culture et conservation des souches**

Les souches bactériennes conservées dans de la gélose nutritive à 4 °C, étaient revivifiées dans une solution nutritive et incubées à  $37 \pm 1$  °C pendant 18 à 24 h. 0,1 mL de chaque culture était ajouté à 10 mL de BHIB (bouillon infusion, Pronadisa Hispanalab). le *C. albicans* conservé à 4 °C dans la gélose Sabouraud chloramphénicol était revivifié dans une solution nutritive et incubé à  $30 \pm 1$  °C pendant 24 à 48 h. 0,1 mL de chaque culture était ajouté à 10 mL d'eau physiologique stérile. Pour le dosage antimicrobiens, les souches bactériennes étaient cultivées sur gélose Mueller-Hinton

(MHA, Pronadisa Hispanalab), tandis que *C. albicans* était cultivé sur Sabouraud Dextrose Agar + chloramphénicol (SDA, Merck).

### **XI.3. Préparation des pré-cultures**

#### **a-Pré-cultures des bactéries et des levures**

Les préparations des inoculums sont faites selon les méthodes traditionnelles. Pour chaque microorganisme 10mL de milieu de culture (BN pour les bactéries, Sabouraud liquide pour les levures) ont été inoculés avec une colonie prélevée d'une culture de 24h. Incuber durant une nuit puis diluer dans le milieu utilisé pour obtenir la DO voulu. Les concentrations bactériennes des inoculums sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique à 590 nm sur un spectrophotomètre. Une DO de 0.08-0.1 correspond à  $10^8$  UFC/mL. La même technique est utilisée pour *C. albicans*.

#### **b-Pré-cultures des moisissures**

Sur une boîte de pétri, contenant le PDA solide, on dépose un disque au centre de la boîte provenant d'une culture pure préparée au préalable puis on incube 7 jours.

### **XI.4. Activité antibactérienne**

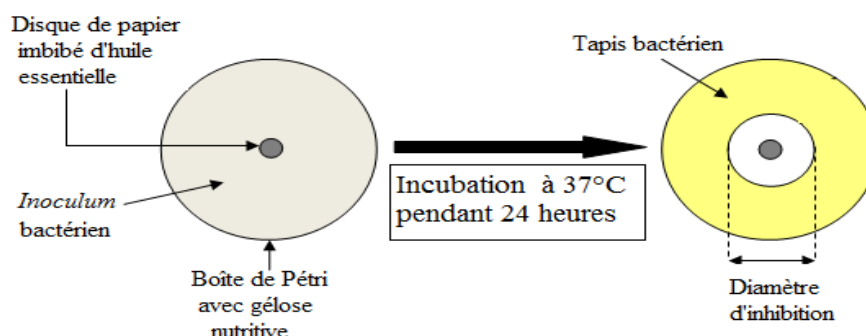
#### **a-Méthode de diffusion des disques sur gélose**

La méthode de diffusion des disques sur gélose standard [22] était utilisée, pour évaluer le spectre d'inhibition de l'huile essentielle contre les micro-organismes analysés. Les inoculums bactériennes étaientensemencés sur gélose Mueller-Hinton solidifiés dans des boîtes de Pétri, de manière à produire une croissance uniforme dans toute la boîte. Une fois que les boîtes étaient préparées, des disques de papier filtre de diamètre 6 mm contenant 5  $\mu$ L de l'huile essentielle non diluée, étaient posés légèrement sur la surface de l'agar.

Après 30 min et à température ambiante, les boîtes étaient incubées dans une étuve bactériologique à  $37 \pm 1$  °C pendant 24 h. Pour les cultures du *C. albicans*, le temps d'incubation est de 48 h à  $27 \pm 1$  °C et le milieu de culture était le Sabouraud dextrose agar.



A la fin de la période de test, le diamètre de la zone d'inhibition formé au cours de la culture d'agar était mesuré en millimètres. Tous les tests étaient effectués en triple exemplaire et les zones d'inhibition formées dans les boîtes étaient comparées à ceux des témoins.



**Figure II.9:** Principe de la méthode de diffusion des disques sur gélose.

### **b-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les tests de CMI étaient réalisés par des méthodes classiques de dilution [23]. La CMI est définie comme la plus faible concentration de produit qui empêche la croissance des bactéries visibles. Tous les tests étaient effectués sur Muller Hinton. 30  $\mu$ L de dilutions était ajouté à 15 mL de gélose en série de 2 fois dans le DMSO (1%) (diméthylsulfoxyde, Sigma-Aldrich) pour obtenir des concentrations allant de 0,1 à 5 mg/mL du produit testé. Les solutions d'agar obtenus étaient mélangées à grande vitesse pendant 15 s, et coulées immédiatement dans des boîtes de Pétri stériles, puis on laisse reposer 30 mn. Les plaques sont ensuite repérées, inoculées par pipetage de 105 CFU de la souche souhaitée. Un contrôle négatif était préparé sans l'huile essentielle, en utilisant uniquement DMSO.

Gentamycine et amphotéricine B (Sigma-Aldrich) étaient utilisés comme contrôles positifs. Les plaques inoculées étaient incubées à 37 °C pendant 24 h. Après la période d'incubation, les plaques étaient observées et enregistrées pour la présence ou l'absence de croissance. Chaque test était répété au moins 3 fois.

### **XI.5. Activité antifongique : Méthode directe**

Le dosage antifongique était effectué par l'essai du milieu gélosé [24]. La levure saccharose extraite du milieu (SEJ) avec différentes concentrations d'huile essentielle (1,0, 2,0 et 4,0 uL/mL) étaient préparées, en ajoutant la quantité appropriée d'huiles essentielles et de Tween 80, du milieu fondu, suivie par la rotation manuelle de Erlenmeyer pour disperser l'huile l'essentiel, dans le milieu. Environ 20 mL du milieu étaient versés dans des boîtes de Pétri en verre (9 cm). Chaque boîte de Pétri était inoculée au centre d'un disque de mycélium (6 mm de diamètre) pris à la périphérie des colonies *A. flavus* cultivées sur PDA pendant 48 h. Les plaques témoins (sans huile essentielle) étaient inoculées suivant la même procédure. Les plaques étaient incubées à 25 °C pendant 7 jours et les diamètres des colonies étaient enregistrés chaque jour. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration d'huile essentielle dans laquelle aucune croissance ne s'est produite. Les disques fongiques qui inhibent les ensembles des huiles traités, étaient ré-inoculées dans le milieu frais et la relance de la croissance était observée.

La Concentration Minimal fongicide (CMF) est la plus faible concentration à laquelle aucune croissance ne s'est produite dans les boîtes. Les diamètres des colonies fongiques des ensembles de traitement et de contrôle étaient mesurés, et le pourcentage d'inhibition (PI) de la croissance fongique était calculé selon la formule suivante [25] :

$$PI = 1 - \frac{Dt}{Dc} \times 100$$

Dt: le diamètre de la zone de croissance des tests dans la plaque ;

Dc: le diamètre de la zone de croissance des contrôles dans la plaque.

## Références bibliographiques

- [1] Garnero J. Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur 1996, 1-45 pp.
- [2] Pharmacopée Européenne, Conseil de l'Europe, Strasbourg, 5 Ed, 2004, Supplément 5.8.
- [3] Burgot G, Pellerin F. *Microextraction en phase solide (SPME)*, Techniques de l'Ingénieur, 2003, 1430 pp.
- [4] Jackobsen HB. The Preisolation phase of in Situ headspace analysis: Methods and Perspectives, Plant volatile analysis. *Modern methods of plant analysis*, 1997, 19: 1-22pp.
- [5] Bicchi C, Drigo S, Rubiolo P. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants, *J. Chromatog A.*, 2000, 892: 469-485.
- [6] Flamini G, Cioni PL, Morelli I. Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*, *Food Chem.*, 2005, 91: 63-68.
- [7] Joulain D, König WA. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Hambourg, Ed. E.B. Verlag, 1998.
- [8] König WA, Hochmuth DH, Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils, Library of MassFinder 2.1, Institute of organic chemistry, Hambourg, Germany, 2001.
- [9] McLafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 4 Ed. Wiley-Interscience, New York, 1988.
- [10] McLafferty FW, Stauffer DB, Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6 Ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, version 3.10., Newfield, 1994.
- [11] Adams RP. Identification of essential oil components by gaz chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, 2001.
- [12] National Institute of Standards and Technology. PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library. Perkin-Elmer Corp: Norwalk, CT, 1999.
- [13] Jennings W, Shibamoto T. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, Ed. Jovanovitch H.B., Academic Press, New-York, 1980.

- [14] Harborne JB. *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman & Hall, London, 1998.
- [15] Kessemi N .Relation entre un insecte phytophage et sa principale plante hôte : cas de la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus*, *Coleoptera Bruchidae*. Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, 2006.
- [16] Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food Chem.*, 2004, 85: 231,237.
- [17] Kumaran A, karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.*, 2005, 97: 109-114.
- [18] Molyneux P, The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 2004, 2: 211-219.
- [19] Sanchez-Moreno C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.*, 2002, 8: 121-137.
- [20] Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.*, 2009, 112: 654-658.
- [21] Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG, Coimbra ES.. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, *Bioresour Technol.*, 2009, 100: 428-433.
- [22] Rota C, Carramiñana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J. Food Protect.*, 2004, 67: 1252-1256.
- [23] Aarestrup FM, Nielsen EM , Madsen M, Engberg J. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, 41: 2244-2250.
- [24] Kumar R, Mishra AK, Dubey NK, Tripathi YB. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity, *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 115: 159-164.
- [25] Yin MC, Tsao SM. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species, *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, 49: 49-56.

*CHAPITRE III*  
*EXTRACTION ET*  
*CARACTÉRISATION DES*  
*HUILES ESSENTIELLES*

## I. Introduction

Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans le domaine de la chimie analytique, la caractérisation des huiles essentielles demeure un challenge. L'analyse des huiles essentielles se déroule en trois étapes : extraction des composés volatiles de la plante étudiée, l'analyse de l'extrait et le traitement des résultats pour identifier et/ou quantifier les huiles essentielles.

Notre démarche a consisté, tout d'abord, en un échantillonnage de la plante ; nous avons ensuite procédé à des extractions par la méthode de l'hydrodistillation ; après avoir prélevé l'huile essentielle, celles-ci ont été séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, puis conservées dans un réfrigérateur à 4°C. Finalement, une analyse des huiles essentielles obtenues a été réalisée par CPG-Ir et CPG/SM.

## II. Huiles essentielles du *D. crinitus*

L'étude bibliographique minutieuse menée sur les espèces de *Daucus*, révèle que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude sur les huiles essentielles. Ceci nous a incité à nous intéresser de près à l'étude de la composition chimique de son huile essentielle, de la fraction volatile et des acides gras, et par la même occasion de la valoriser pour une utilisation future. En effet, cette plante constitue pour nous un champ d'investigation vierge qui peut être à l'origine de nouvelles molécules dotées d'activités thérapeutiques nouvelles.

### II.1. Provenance du matériel végétal et identification

Pour déterminer la composition de l'huile et l'étude de l'influence du lieu de récolte, les échantillons de chaque organe (racines, tiges, feuilles, fleurs et ombelles) de *D. crinitus* ont été collectés au mois de novembre 2008 dans 4 stations différentes (**Chapitre II**). L'identification de la plante a été faite par le professeur **M. Bouazza** du laboratoire de botanique de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.

### II.2. Extraction des huiles essentielles et de la fraction volatile

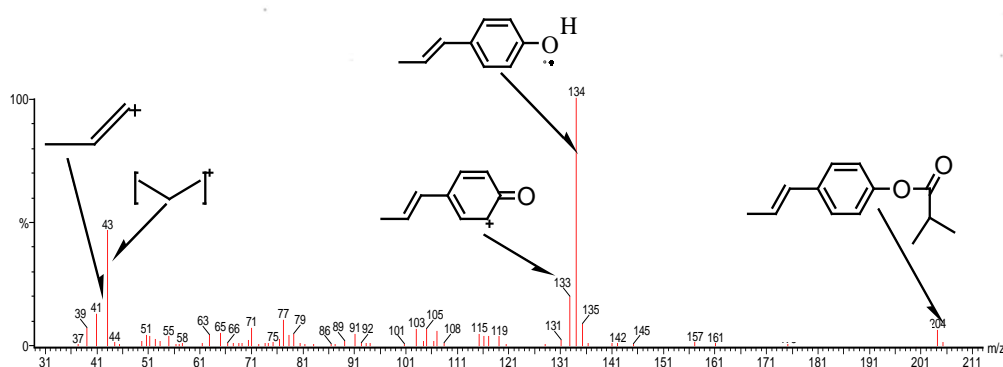
Les huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger [1] et une autre technique de caractérisation la microextraction sur phase solide (SPME, *Solid phase microextraction*).

### II.3. Composition chimique de l'huile essentielle du *D. crinitus*

Après l'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes par hydrodistillation, la composition de l'huile essentielle a été analysée par CPG et CPG-SM. Le mode opératoire est détaillé dans la partie : **matériels et méthodes**. Les résultats sont regroupés dans les **tableaux III.1 et III.2**.

L'analyse des huiles essentielles des racines, tiges, feuilles, fleurs et ombelles du *D. crinitus* récoltées dans les quatre stations (Bensekrane (A), Sid Abdelli (B), Terni (C) et Beni Snous (D) nous a permis l'identification de 72 composés avec des pourcentages variant de 90,9 à 98,3 % de la composition chimique globale. Leurs indices de rétention et de leur pourcentage relatif sont présentés dans les **tableaux III.1 et III.2**.

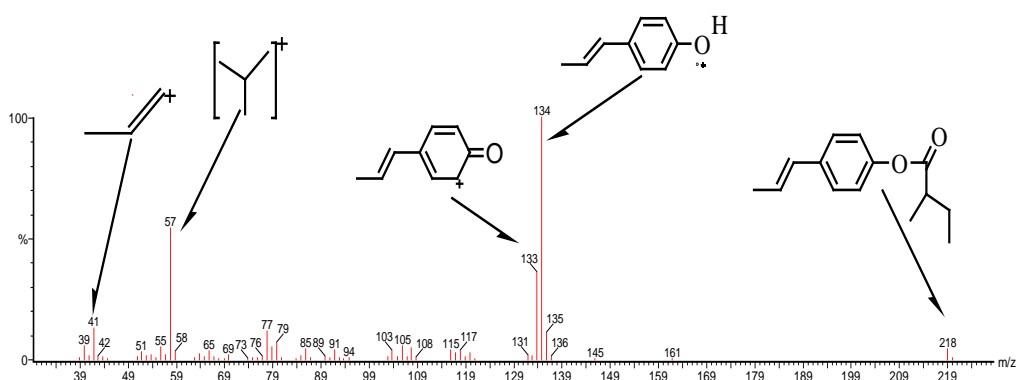
Parmi ces derniers, 22 composés non terpéniques, 12 monoterpènes, 9 sesquiterpènes et 4 diterpènes ont été identifiés. L'identification des 33 composés est réalisée en comparant leur spectre de masse (SM) et leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque « aromes » propre au laboratoire de Corse (France). 13 composés sont identifiés en comparant leurs SM et leurs indices de rétention polaires avec la bibliothèque commerciale. Cependant le principal composé de la partie aérienne du *D. crinitus* (40.1-84.1 %) était resté inconnu et son identification a été réalisée grâce à la combinaison de la spectrométrie de masse et de la RMN  $^{13}\text{C}$ .



**Figure III.1** : Spectre de masse de l'isobutyrate d'isochavicol.

Les données SM du composé inconnu **53** étaient proches de celles de l'isochavicol 2-méthylbutyrate (4-(prop-(1E)-ényl) phényle 2-méthylbutyrate) **60** présent dans la banque de données, à l'exception de l'ion moléculaire  $m/z = 204$  qui indique la présence d'un composé dérivé de l'isochavicol qui a perdu un fragment de 14 uma de la partie acyle.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  réalisé sur l'huile essentielle des tiges à partir d'un échantillon de Bensekrane (53-84,1 %) a présenté 10 signaux, dont trois avaient le double de l'intensité, attribué à partir des spectres DEPT des trois atomes de carbone quaternaires (175,60, 149,65 et 135,59 ppm), et deux atomes de carbone de méthine aromatiques (121,46 et 126,65 ppm), deux atomes de carbone méthine insaturés (130,15 et 125,78 ppm) et deux atomes de carbone de méthyle (18,43 et 18,93 ppm). Ces signaux confirment la présence de composés phénylpropanoïdes, et la formule brute  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_2$  a été déduite à partir des spectres DEPT.



**Figure III.2 :** Spectre de masse de 2-méthyl butyrate d'isochavicol.

L'identification de l'isochavicol isobutyrate a été clairement établie à partir d'une comparaison de ses données spectrales RMN  $^{13}\text{C}$  avec celles rapportées dans la littérature [2,3].

En ce qui concerne la chimie de la plante, deux types d'huiles essentielles étaient produites par le *D. crinitus*.



**Tableau III.1** : Composition chimique des huiles essentielles des racines et des feuilles de *D. crinitus*

No. <sup>a</sup>	Composés <sup>g</sup>	/RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Racines <sup>e</sup>				Feuilles <sup>e</sup>			
					A	B	C	D	A	B	C	D
1	Nonane	906	902	907	0.9	0.8	-	-	0.6	0.5	0.5	0.6
2	$\alpha$ - Pinène	936	931	1015	-	-	-	-	0.5	0.4	0.1	-
3	Sabinène	973	966	1107	-	-	-	-	0.6	0.5	0.6	-
4	$\beta$ -Pinène	978	971	1124	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	-
5	Myrcène	987	981	1141	-	-	-	-	0.6	0.3	0.5	-
6	Décane	993	998	999	0.1	0.1	-	-	tr	tr	tr	tr
7	p-Cymène	1015	1012	1247	-	-	-	-	0.2	0.1	-	-
8	1,8-Cinéole	1024	1020	1199	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	tr
9	Limonène	1025	1026	1190	-	-	-	-	0.9	0.6	0.3	-
10	(E)- $\beta$ -Ocimène	1041	1037	1224	-	-	-	-	0.6	0.3	0.2	-
11	$\gamma$ -Terpinène	1051	1049	1228	-	-	-	-	1.6	0.8	0.1	-
12	1-octanol	1061	1056	1390	-	-	-	-	tr	-	tr	tr
13	2- méthyl-Décane	1068	1065	1146	0.1	0.4	-	-	tr	tr	0.1	0.3
14	Nonanal	1076	1074	1403	-	-	-	-	-	0.2	tr	-
15	$\alpha$ -Terpinolène	1082	1079	1274	-	-	-	-	0.4	0.2	0.1	-
16	Linalool	1086	1086	1528	-	-	-	-	0.2	0.1	tr	-
17	Undécane	1100	1098	1101	34.1	30.9	14.4	15.3	4.1	5.1	4.5	14.2
18	Acétate de 2-Éthyle hétéyle	1144	1149	1420	-	-	-	-	tr	tr	0.1	tr
19	Terpinène 4-ol	1164	1161	1586	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	-
20	Acétate d'octyle	1188	1187	1460	-	-	-	-	2.3	3.0	2.8	1
21	Décanal	1188	1187	1483	0.3	0.2	-	-	1.4	1.0	1.4	0.1
22	Dodecane	1200	1198	1209	0.1	0.2	tr	0.1	tr	tr	-	-
23	Décanol	1263	1259	1729	-	-	tr	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1
24	Acide nonanoïque	1263	1263	2119	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Undécanal	1290	1280	1610	tr	0.1	0.1	-	tr	tr	tr	0.1
26	Tridécane	1300	1292	1305	0.7	0.5	0.9	0.4	0.1	tr	0.1	0.6
27	n-Octyle Isobutyrate	1329	1325	1535	-	-	-	-	tr	0.1	0.1	0.1
28	Acetate de Nerly	1342	1336	1730	-	-	-	tr	-	-	tr	-
29	Acide décanoïque	1347	1348	2080	tr	0.1	tr	tr	-	-	-	-
30	2-méthyl butyrate de benzyl	1360	1352	1770	-	0.2	-	tr	tr	-	-	-
31	Acetate de Geranyle	1362	1359	1759	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Undécanol	1363	1367	1816	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.1
33	$\alpha$ -Copaène	1379	1372	1470	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr
34	$\beta$ - bourbonène	1386	1376	1520	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Dodécanal	1389	1390	1695	16.7	24.6	25.1	26.3	3.1	2.1	2.1	6.7
36	Tétradécane	1400	1403	1408	-	-	-	-	tr	0.1	0.1	0.1
37	Longifolène	1411	1409	1575	-	-	-	-	tr	tr	0.1	tr
38	$\alpha$ - Santalène	1422	1415	1569	-	-	-	-	-	-	-	-
39	$\beta$ -Caryophyllène	1420	1424	1555	-	-	-	-	0.6	0.4	0.2	0.2
40	Dauca -3,8-diène	1428	1426	1680	-	-	-	-	tr	tr	tr	0.1
41	<i>Trans</i> - $\alpha$ - Bergamotène	1432	1432	1575	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	tr
42	(E)- $\beta$ -Farnesène	1446	1443	1660	-	-	-	-	tr	tr	tr	0.1
43	$\alpha$ - Humulène	1455	1451	1648	-	-	-	-	0.7	1.0	1.1	0.2
44	Zizaène	1456	1463	1860	1.2	1.3	2.9	2.7	tr	tr	tr	1.4
45	Dodécanol	1472	1470	1754	0.2	0.2	-	-	tr	tr	0.1	tr
46	$\alpha$ -curcumène	1473	1474	1769	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Germacrène-D	1479	1478	1710	-	-	-	-	tr	tr	0.1	0.1
48	$\beta$ -Selinène	1486	1480	1685	-	-	-	-	tr	tr	0.2	0.2
49	Zingibérène	1489	1483	1717	-	-	-	-	-	-	-	-
50	Pentadécane	1500	1497	1502	-	-	-	-	5.1	3.5	4.1	2.2
51	$\delta$ -Cadinène	1520	1514	1736	-	-	-	-	tr	tr	0.3	0.1
52	Geranyl butyrate	1534	1530	1877	-	0.1	tr	0.1	-	-	-	-
53	<b>Isobutyrate d'isochavicol</b>	1546	1541	2134	-	-	-	-	44.9	35.2	35.6	25.2
54	(Z)-3-hexenyl benzoate	1545	1557	2059	1.9	2.3	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
55	Acide dodécanoïque	1554	1560	2474	1.9	0.8	-	-	1.1	12.3	9.3	5.6
56	Oxyde de caryophyllène	1578	1572	1980	-	-	-	-	-	-	-	-
57	Acétate de dodécyle	1585	1580	1882	31.7	30.3	48.2	42.3	2.5	1.5	7.2	8.9
58	$\alpha$ -Cedrol	1603	1596	2115	-	-	-	-	tr	tr	0.2	0.1
59	Hexadécane	1600	1599	1598	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.2
60	2-méthyle butyrate d' isochavicol	1651	1648	2255	0.2	0.3	1.5	2.3	9.7	8.9	11.3	17.8

61	$\alpha$ - Bisabolol	1673	1667	2202	-	-	-	-	tr	0.1	1.8	0.3
62	Heptadécane	1700	1703	1699	0.2	0.2	-	-	3.4	2.4	6.2	2.1
63	Benzoate de benzyl	1730	1723	2121	0.1	0.1	0.2	tr	0.1	0.2	0.1	0.1
64	Acide tétradécanoïque	1761	1756	2649	0.3	0.2	1.1	2.0	3.1	4.4	0.2	0.8
65	Lactarazulène	1796	1792	2430	0.1	0.4	2.7	0.4	0.7	0.5	0.1	tr
66	Hexadécane	1782	1787	2108	0.3	0.2	0.2	0.3	0.1	0.6	tr	0.2
67	Neophytadiène	1807	1807	1918	-	-	-	-	0.4	0.4	0.5	0.1
68	Phytone	1833	1835	2131	-	-	-	-	tr	0.7	0.3	tr
69	Pentanoate de dodécyle	1843	1840	2834	0.5	0.2	-	-	-	-	-	-
70	Isophytol	1946	1944	2316	-	-	-	-	tr	tr	0.6	1.1
71	Acide hexadécanoïque	1951	1949	2916	0.6	-	-	-	1.1	0.5	0.3	0.1
72	(E)-Phytol	2114	2102	2620	-	-	-	-	1.7	1.9	2.5	0.7
Total					92.2	94.2	97.4	92.4	93.2	90.9	93.8	91.9
Composés hydrocarbonés					37.5	34.8	20.9	18.9	21.4	17.4	20.2	22.8
Composés oxygénés					54.7	59.4	76.5	73.5	71.8	73.5	76.2	69.1
Composés aliphatiques					88.8	89.9	90.1	87.0	28.4	37.9	39.7	44.2
Composés phénylpropanoïdes					2.1	2.6	1.7	2.3	54.7	44.3	47.0	43.1
Composés hydrocarbonés non-terpéniques					36.2	33.1	15.3	15.8	13.4	11.7	15.7	20.3
Monoterpènes hydrocarbonés					-	1.7	-	-	5.5	3.3	2.0	-
Sesquiterpènes hydrocarbonés					1.3	-	5.6	3.1	2.1	2.0	2.0	2.4
Diterpènes hydrocarbonés					-	-	-	-	0.4	0.4	0.5	0.1
Composés oxygénés non-terpéniques					54.7	59.4	76.5	73.5	69.7	70.5	71.0	67.0
Monoterpènes oxygénés					-	-	-	-	0.4	0.3	-	-
Sesquiterpènes oxygénés					-	-	-	-	-	0.1	1.8	0.3
Diterpènes oxygénés					-	-	-	-	1.7	2.6	3.4	1.8

<sup>a</sup> L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) [8-15].

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup> indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp).

<sup>e</sup> Pourcentage est donné sur la colonne apolaire, tr = trace (<0.05%),

les stations: Bensekrane (A), Sid Abdeli (B), Terni (C) and Beni Snous (D)

<sup>e</sup> Composés identifiées de la banque commercial: National Institute of Standards and Technology, 1999 (12, 33, 39, 43, 44); et de la littérature data: Joulain and Konig, 1998 (26, 34, 35, 36, 40, 41, 42, 46).

**Tableau III.2 :** Composition chimique des huiles essentielles des tiges, ombelles et fleurs du *D. crinitus*

Composés <sup>e</sup>	/RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Tiges <sup>e</sup>				Ombelles <sup>e</sup>				Fleurs <sup>e</sup>				
				A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
1	Nonane	906	902	907	Tr	tr	tr	-	0.5	0.4	0.2	0.3	-	-	0.1	tr
2	α-Pinène	936	931	1015	-	tr	tr	-	0.9	0.8	0.6	0.9	0.2	0.1	0.2	0.5
3	Sabinène	973	966	1107	-	-	-	-	0.1	0.3	0.1	tr	0.3	0.4	0.6	0.2
4	β-Pinène	978	971	1124	-	-	-	-	0.6	0.4	0.1	tr	0.1	0.3	1	1.5
5	Mycène	987	981	1141	0.7	0.7	0.9	0.9	0.1	0.2	0.3	0.4	0.2	0.1	tr	tr
6	Décane	993	998	999	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	tr
7	p-Cyméné	1015	1012	1247	0.1	0.1	6	4.2	0.7	0.4	0.3	tr	-	-	-	-
8	1,8-Cinéole	1024	1020	1199	tr	-	0.1	-	0.1	0.1	0.2	tr	0.2	0.4	0.3	0.6
9	Limonène	1025	1026	1190	0.8	0.8	0.9	1.1	1.6	1.2	1.9	2.6	-	-	-	-
10	(E)-β-Ocimène	1041	1037	1224	0.1	tr	1.1	1.6	0.2	0.1	0.1	tr	-	-	-	-
11	γ-Terpinène	1051	1049	1228	0.1	0.1	0.2	0.5	0.3	0.2	0.2	tr	-	-	-	-
12	1-octanol	1061	1056	1390	0.1	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	0.1	tr	tr	-	-
13	2-méthyle-Décane	1068	1065	1146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Nonanal	1076	1074	1403	tr	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-
15	α-Terpinolène	1082	1079	1274	0.3	0.3	0.5	0.4	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.4	0.3
16	Linalool	1086	1086	1528	tr	tr	tr	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	tr	0.1	0.1	0.2
17	Undécane	1100	1098	1101	tr	0.4	0.5	0.4	0.3	0.5	0.4	0.6	0.1	0.3	0.2	0.1
18	Acétate 2-Éthyle hécyle	1144	1149	1420	0.1	tr	0.2	0.1	-	-	tr	0.1	-	0.2	0.2	0.5
19	Terpinène 4-ol	1164	1161	1586	tr	0.1	0.3	0.4	0.3	0.3	0.1	tr	-	-	-	tr
20	Acétate d'octyle	1188	1187	1460	0.2	1.1	1.9	2.6	2.0	1.9	2.2	3.4	-	-	-	-
21	Décanal	1188	1187	1483	tr	0.1	0.3	1	0.6	0.2	1.5	1.2	-	-	-	0.1
22	Dodécane	1200	1198	1209	0.1	0.1	0.2	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Décanol	1263	1259	1729	0.1	0.2	0.1	0.1	-	-	-	-	0.2	0.1	tr	tr
24	Acide nonanoïque	1263	1263	2119	0.1	0.1	0.2	0.1	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1
25	Undécanal	1290	1280	1610	0.2	0.1	0.1	tr	0.2	tr	tr	tr	-	-	-	-
26	Tridécane	1300	1292	1305	0.1	tr	0.1	0.2	0.2	0.5	0.4	0.5	0.1	0.2	0.1	tr
27	Isobutyrate de n-Octyle	1329	1325	1535	-	-	-	-	0.2	0.1	0.2	0.2	-	0.1	0.1	0.1
28	Acetate de Nerly	1342	1336	1730	0.1	0.2	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.1
29	Acide décanoïque	1347	1348	2080	-	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.3	-	-	-	-
30	2-methyl butyrate de benzy	1360	1352	1770	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.2	0.1	0.1
31	Acetate de geranyle	1362	1359	1759	-	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2
32	Undécanol	1363	1367	1816	0.1	0.1	0.3	0.4	0.4	0.2	0.1	tr	0.2	0.4	0.2	0.6
33	α-Copaène	1379	1372	1470	tr	0.1	0.2	0.4	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
34	β-bourbonène	1386	1376	1520	0.1	0.2	0.4	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Dodécanal	1389	1390	1695	0.5	4.0	5.0	6.1	0.1	tr	0.1	tr	-	0.1	0.1	tr
36	Tétradécane	1400	1403	1408	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-
37	Longifolène	1411	1409	1575	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1
38	α-Santalène	1422	1415	1569	tr	0.1	0.1	0.2	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr
39	β-Caryophyllène	1420	1424	1555	tr	0.4	0.3	0.1	5.4	3.2	3.9	5.1	0.2	0.1	tr	0.1
40	Dauca-3,8-diène	1428	1426	1680	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	tr	0.1	tr
41	Trans-α-Bergamotène	1432	1432	1575	0.1	0.3	0.1	tr	-	-	-	tr	0.2	tr	0.1	0.1
42	(E)-β-Farnesene	1446	1443	1660	0.1	0.1	0.2	tr	tr	tr	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	0.2
43	α-Humulène	1455	1451	1648	tr	0.2	0.3	0.2	0.5	0.5	0.6	0.3	tr	0.1	tr	0.2
44	Zizaène	1456	1463	1860	1.2	2.1	1.0	1.0	5.9	5.2	6.0	9.2	6.2	8.1	9.1	8.0
45	Dodécanol	1472	1470	1754	tr	tr	0.1	tr	tr	0.1	0.1	tr	0.2	0.1	0.1	tr
46	α-curcumène	1473	1474	1769	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	tr	tr	tr
47	Germacrène-D	1479	1478	1710	0.1	0.5	tr	tr	0.2	0.2	0.1	tr	0.2	0.1	tr	0.2
48	β-Selinène	1486	1480	1685	-	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.2	tr	tr	0.1	0.2	0.1
49	Zingibèrene	1489	1483	1717	tr	tr	0.1	tr	-	-	-	tr	0.1	tr	tr	0.1
50	Pentadécane	1500	1497	1502	3.0	6.0	12.6	14.5	8.5	9.5	10.5	15.2	4.1	6.2	7.3	10.1
51	δ-Cadinène	1520	1514	1736	0.1	0.3	tr	0.1	0.6	0.4	0.5	0.4	-	0.1	tr	0.1
52	Butyrate de geranyl	1534	1530	1877	tr	0.1	0.2	0.2	-	0.1	tr	0.1	0.2	tr	tr	0.1
53	Isobutyrate d'isochavicol	1546	1541	2134	84.1	57.6	41.2	36.5	51.2	50.2	50.2	40.1	65.3	55.3	58.2	62.3
54	Benzoate de (Z)-3-hexenyl	1545	1557	2059	0.3	0.4	0.2	0.1	0.5	0.6	0.5	0.6	0.1	0.2	0.3	tr
55	Acide dodécanoïque	1554	1560	2474	0.1	tr	0.8	1.2	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.6	0.5
56	Oxyde caryophyllène	1578	1572	1980	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0.1	0.1	-	-	-	-
57	Acétate de Dodécyle	1585	1580	1882	0.3	0.2	1.9	2.3	tr	0.1	tr	0.1	1.5	1.6	1.8	1.0

58	$\alpha$ -Cedrol	1603	1596	2115	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	0.1	tr	tr	tr
59	Hexadécane	1600	1599	1598	0.2	0.1	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	tr	0.1	0.1	tr
60	2-méthyle Butyrate d' Isochavicol	1651	1648	2255	4.2	7.8	9.1	13.2	3.2	6.5	5.5	6.1	9.8	12.5	9.6	4.8
61	$\alpha$ - Bisabolol	1673	1667	2202	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	tr
62	Heptadécane	1700	1703	1699	0.4	6.5	2.5	2.7	5.8	4.8	3.9	4.1	2.5	1.9	2.5	1.1
63	Benzoate de benzyl	1730	1723	2121	0.1	0.2	0.2	0.2	tr	0.1	tr	tr	tr	0.1	tr	tr
64	Acide tétradécanoïque	1761	1756	2649	0.1	0.3	0.7	0.6	0.1	0.5	0.5	0.2	1.3	1.2	2.3	2.0
65	Lactarazulène	1796	1792	2430	tr	0.8	tr	0.1	-	-	-	-	-	-	0.1	tr
66	Hexadécanale	1782	1787	2108	0.1	tr	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	tr	-	0.1	0.3	tr
67	Neophytadiène	1807	1807	1918	tr	tr	0.1	0.3	-	-	-	-	-	0.4	0.8	0.4
68	Phytone	1833	1835	2131	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	Pentanoate de dodécyle	1843	1840	2834	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	Isophytol	1946	1944	2316	tr	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
71	Acide hexadécanoïque	1951	1949	2916	tr	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-
72	(E)-Phytol	2114	2102	2620	0.2	-	-	-	-	-	-	-	2.3	-	-	-
	Total				98.3	92.5	92.4	95.1	92.7	91.4	91.1	92.3	96.9	92.3	97.5	96.6
	Composés hydrocarbonés				7.5	19.7	28.8	29.7	33.4	29.7	30.9	40.1	15.4	19.2	23.0	23.5
	Composés oxygénés				90.8	72.8	63.6	65.4	59.3	61.7	60.2	52.2	81.5	73.1	74.6	73.1
	Composés aliphatiques				6.0	19.8	28.6	33.2	19.1	19.5	18.8	26.0	10.3	13.1	16.7	19.5
	Composés phénylpropanoïdes				88.6	65.8	50.5	49.8	54.9	57.3	56.2	46.8	75.2	68.0	68.1	64.1
	Composés hydrocarbonés non-terpéniques				4.0	13.0	16.0	18.1	15.8	15.8	15.4	20.8	6.8	16.8	10.2	11.3
	Monoterpènes hydrocarbonés				2.1	2.0	9.6	8.7	4.8	3.7	3.8	4.0	0.9	1.1	2.3	2.5
	Sesquiterpènes hydrocarbonés				1.4	4.7	3.1	2.6	12.8	10.2	11.7	15.3	7.7	9.0	9.7	9.3
	Diterpènes hydrocarbonés				-	-	0.1	0.3	-	-	-	-	-	0.4	0.8	0.4
	Composés oxygénés non-terpeniques				90.6	72.6	63.1	64.9	58.7	61.0	59.6	52.0	78.7	72.4	74.1	72.3
	Monoterpènes oxygénés				-	0.1	0.4	0.5	0.5	0.6	0.4	-	0.2	0.5	0.4	0.8
	Sesquiterpènes oxygénés				-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	-
	Diterpènes oxygénés				0.2	-	-	-	-	-	-	-	2.3	-	-	-

<sup>a</sup> L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). <sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa). <sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa). <sup>d</sup> indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp). <sup>e</sup> Pourcentage est donné sur la colonne apolaire, tr = trace (<0.05%), les stations: Bensekrane (A), Sid Abdeli (B), Terni (C) and Beni Snous (D) <sup>f</sup> Composés identifiées de la banque Comenial: National Institute of Standards and Technology, 1999 (12, 33, 39, 43, 44); et de la littérature data: Joulain and Konig, 1998 (26, 34, 35, 36, 40, 41, 42, 46).

Les huiles essentielles des racines étaient composées principalement de composés aliphatiques (87,0 à 90,1 %) tandis que les huiles essentielles de la partie aérienne (feuilles, tiges, fleurs et ombelles) étaient caractérisées par la présence de phénylpropanoïdes (43,1 à 88,6 %).

Les trois principaux composés aliphatiques des huiles essentielles des racines sont : l'acétate dodécyle (30,3 à 48,2 %), l'undécane (14,4 à 34,1 %) et le dodécanal (16,7-26,3 %).

Le rapport pourcentage abondance de ces composés diffère selon la localisation d'échantillonnage; l'undécane (34,1 et 30,9 %) était le composant majoritaire respectivement dans les huiles essentielles de la station de Bensekrane (A) et de Sid Abdeli (B), tandis que, l'acétate de dodécyle (48.2 et 42.3 %) était identifié comme le principal composant aliphatique respectivement dans les huiles essentielles des racines de la station de Terni (C) et de Beni Snous (D).

Cependant, dans les huiles essentielles de la partie aérienne le principal composé était l'isobutyrate d'isochavicol; ces huiles essentielles étaient qualitativement similaires mais différentes par la quantité relative de leur composant majoritaire. Nous avons constaté que l'isobutyrate d'isochavicol était toujours le principal composé (36,5-84,1 %).

Selon l'organe analysé les autres composés identifiés sont : 2-méthylbutyrate d'isochavicol (1,8-17,8 %), le pentadécane (0,4-15,2 %), le zizaène (trace-9,2 %) et l'undécane (trace-14,2 %) à l'exception de l'huile des tiges obtenue à partir de la station de Bensekrane (A).

Enfin, nous avons remarqué que le pourcentage des composés aliphatiques et les phénylpropanoïdes corrélé avec la position de l'organe sur la plante en se déplaçant du bas vers le sommet de la plante (racines, feuilles, tiges, ombelles puis fleurs).

Le pourcentage des composés aliphatique diminue, tandis que, le pourcentage des phénylpropanoïdes augmente. Nous avons constaté aussi que le pourcentage des sesquiterpènes hydrocarbonés était plus élevé dans les ombelles et les fleurs respectivement de 10.2 à 15.3 % et de 7.7 à 9.7 %, par contre dans les autres organes il ne dépasse pas 5.6%.

## **II.4. Analyse des composés volatils par Edt-MEPS**

### **II.4.1. Optimisation des paramètres**

Les composés volatils émis par les racines, feuilles, tiges, ombelles et fleurs récoltés dans les différentes stations étaient étudiés en utilisant Edt-SPME selon des paramètres optimisés.

L'optimisation des paramètres d'échantillonnage de la Edt-MEPS était effectuée à l'aide de plantes fraîches basé sur la somme de l'aire totale des pics obtenu par CPG-FID, le montant maximum de l'aire totale des pics était obtenu à une température de 70 °C, un temps d'équilibre de 60 min et un temps d'extraction de 30 min (Tableau 3).

Les expériences étaient optimisées pour les paramètres d'extraction MEPS ; la température d'extraction est le paramètre le plus important dans notre étude .

Les constantes de distribution de chaque composant sont fonction de la température : l'extraction des monoterpènes hydrocarbonés et des sesquiterpènes oxygénés est améliorée à une température moyenne (50 °C) et à une température élevée (90 °C), respectivement (Tableau III.3). La température optimale utilisée pour l'extraction Edt-SPME était de 70 °C basée sur la quantité maximale de matières volatiles extraites.

#### II.4.2. Analyses de fractions volatiles

L'analyse par CPG-Ir et CPG-SM a permis l'identification de 84 composants dont 45 composés terpéniques, 17 monoterpènes, 21 sesquiterpènes, et 1 diterpène. L'identification des 45 composés a été faite en comparant leur SM et leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque « Aromes » et 18 composés sont identifiés en comparant leurs SM et leurs indices de rétention apolaire connus dans la bibliothèque commerciale ou dans la littérature.

**Tableau III.3:** Influence des paramètres de Edt-MEPS (température d'extraction, temps d'équilibre et d'extraction) dans les composés volatiles du *D. crinitus*

Paramètres Edt-MEPS										
	Temps d'équilibre teq min				Temps d'extraction min		Température d'extraction °C			
	(Text= 70 °C - text = 15min)				(Text= 70 °C - teq = 60min)		(text= 30 min - teq = 60 min)			
Classe des composés	20	40	60	80	30	45	30	50	70	90
Composés hydrocarbonés	37.6	58.8	53.8	49.1	69.3	52.3	85.9	76.3	69.3	62.0
Composés oxygénés	56.8	37.8	44.8	47.6	30.1	38.1	11.3	22.5	30.1	36.1
Composés aliphatiques	74.6	69.3	78.4	72.2	80.2	67.2	74.8	79.3	80.2	76.1
Composés arylpropanoïdes	2.0	3.2	1.2	2.9	0.6	2.5	0.1	0.3	0.6	0.9
Composés hydrocarbonés non-terpéniques	23.5	37.5	39.8	29.9	54.8	33.8	67.4	59.5	54.8	45.1
Monoterpènes hydrocarbonés	11.9	17.2	13.1	17.6	6.7	12.1	19.3	12.6	6.7	4.1
Sesquiterpènes hydrocarbonés	2.2	4.0	0.6	1.5	7.6	6.3	0.8	4.2	7.6	12.5
Diterpènes hydrocarbonés	-	0.1	0.3	0.1	0.2	0.1	-	-	0.2	0.3
Composés oxygénés non-terpéniques	52.9	35.0	39.8	45.2	26.0	35.9	9.1	20.1	26.0	31.9
Monoterpènes oxygénés	3.8	2.8	4.9	2.3	1.0	2.1	2.2	2.2	1.0	0.5
Sesquiterpènes oxygénés	0.1	-	0.1	0.1	3.1	0.1	-	0.2	3.1	3.7
Esters	4.9	5.4	5.4	7.0	9.9	4.5	3.2	8.6	9.9	12.8
Alcools	4.2	2.8	3.9	2.2	4.4	29.0	1.9	3.2	4.4	7.3
Cétones	0.7	0.1	0.6	0.2	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.2
Aldéhydes	43.0	25.4	28.0	35.3	10.2	25.6	3.2	8.5	10.2	11.2
Total d'identification (%)	94.6	96.6	98.6	96.7	99.4	90.4	97.2	98.8	99.4	98.1
Aires total 10 <sup>3</sup> a	223.2	282.8	351.0	303.1	454.1	426.4	96.8	206.4	454.1	451.2

En ce qui concerne la contribution de l’empreinte aromatique des organes de la plante, il convient de noter que les composés volatils étaient plus abondants dans les fleurs que dans les autres parties de la plante.

L’étude a montré que pour les mêmes organes, la composition chimique de l’huile essentielle des fractions obtenues à partir des différentes régions était qualitativement la même, mais différente en abondance des principaux composants. Cependant, une corrélation entre la classe des composés et l’organe étudié a été observée. Les composés aliphatiques oxygénés étaient bien représentés dans les racines, les hydrocarbures aliphatiques étaient présents dans les feuilles et les tiges, et les phénylpropanoïdes étaient présents dans les fleurs et les ombelles.

**Tableau III.4** : Composés volatils extraits par Edt-MEPS des racines du *D. crinitus*

No. <sup>a</sup>	Composés <sup>†</sup>	RIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	Pourcentages <sup>d</sup>			
				Racines			
				A	B	C	D
<b>1a</b>	Heptane	700	702	0.3±0.01	tr	-	-
<b>1b</b>	3-méthyl Butanol	717	710	-	-	-	-
<b>1c</b>	Héxanal	780	767	Tr	tr	tr	-
<b>1d</b>	Hex-5-en-1-ol	820	820	-	-	-	-
<b>1e</b>	Heptan 2-one	871	870	Tr	-	-	-
<b>1</b>	Nonane	906	902	0.3±0.07	5.5±0.21	-	-
<b>2</b>	$\alpha$ -Pinène	936	931	-	-	-	-
<b>2a</b>	Camphène	950	943	-	-	-	-
<b>3</b>	Sabinène	973	966	-	0.1±0.01	-	-
<b>3a</b>	2-pentyl Furan	981	978	0.3±0.01	-	-	-
<b>5</b>	Myrcène	987	981	-	-	-	-
<b>5a</b>	$\alpha$ -Phellandrène	1002	991	-	-	-	-
<b>5b</b>	Isobutyrate de 3-méthyle butyl	994	997	-	-	-	-
<b>6</b>	Décane	993	998	0.2±0.01	1.2±0.14	0.1±0.01	-
<b>6a</b>	Isobutyrate de 2- methyl butyl	1004	999	-	-	-	-
<b>7</b>	p-Cymène	1015	1012	-	-	-	-
<b>9</b>	Limonène	1025	1026	-	0.1±0.01	-	-
<b>10</b>	(E)- $\beta$ -Ocimène	1041	1037	-	-	-	-
<b>11</b>	$\gamma$ -Terpinène	1051	1049	-	-	-	-
<b>12</b>	1-Octanol	1061	1056	-	-	-	-
<b>13</b>	2-méthyl Décane	1068	1065	0.4±0.07	6.7±0.71	0.3±0.07	-
<b>14</b>	Nonanal	1076	1074	-	-	-	-
<b>15</b>	$\alpha$ -Terpinolène	1082	1079	-	-	-	-
<b>15a</b>	2-Nonanol	1085	1080	-	-	-	0.1±0.01
<b>17</b>	Undécane	1100	1098	43.5±0.85	5.0±0.35	26.2±0.92	2.3±0.21
<b>17a</b>	Limonène 1-2-époxyde	1117	1113	-	-	-	-
<b>17b</b>	Camphore	1123	1120	-	-	-	-

17c	Isobutyrate de n-hexyl	1127	1126	-	-	-	-
17d	Cryptone	1160	1158	-	-	-	-
19	Térpinèn-4-ol	1164	1161	-	-	-	-
19a	3-méthyle Undécane	1170	1165	0.1±0.01	0.5±0.07	tr	-
19b	Estragole	1175	1169	-	-	-	-
21	Décanal	1188	1187	-	0.1±0.01	-	-
22	Dodécane	1200	1198	0.3±0.07	0.3±0.01	tr	-
22a	γ-Octanolide	1208	1208	-	-	-	-
22b	Chavicol	1219	1214	-	0.1±0.01	-	-
22c	Acétate de 2-Nonanyl	1224	1220	-	0.7±0.01	-	-
23	Décanol	1263	1259	-	0.1±0.01	-	0.4±0.07
23a	Trans-Anéthol	1262	1260	-	-	-	-
24	Acide nonanoïque	1263	1263	-	0.1±0.01	-	-
24a	Isobutyrate de Benzyl	1269	1266	-	-	-	-
24b	Undécan-2-one	1273	1268	0.1±0.01	tr	-	1.1±0.14
25	Undécanal	1290	1280	-	0.7±0.21	0.2±0.01	-
26	Tridécane	1300	1292	3.7±0.21	7.7±0.85	4.0±0.35	0.7±0.07
26a	Isochavicol	1313	1315	-	-	-	-
27	Isobutyrate de n-Octyl	1329	1325	-	-	-	-
28	Acétate de Neryl	1342	1336	-	-	-	0.6±0.01
29	Acide décannoïque	1347	1348	0.2±0.01	0.4±0.01	0.4±0.01	-
30	2-méthyle Butyrate de benzyl	1360	1352	-	0.6±0.07	-	-
31	Acétate de géranyl	1362	1359	-	-	-	-
33	α-Copaène	1379	1372	-	-	-	-
34	β-Bourbonène	1386	1376	-	-	-	-
35	Dodécanal	1389	1390	29.3±1.2	20.6±1.84	45.1±1.27	55.4±0.99
36	Tetradécane	1400	1403	-	-	-	-
37	Longifolène	1411	1409	-	0.1±0.01	tr	-
38	α-Santalène	1422	1415	-	-	tr	-
39	β-Caryophyllène	1421	1424	-	-	-	-
40	Dauca-3,8-diène	1428	1426	-	-	-	-
41	Trans-α-bergamotène	1432	1432	-	-	-	-
42	(E)-β-Farnesène	1446	1443	-	-	-	-
43	α-Humulène	1455	1451	-	-	-	-
45	Dodécanol	1472	1470	2.7±0.01	8.8±0.42	1.7±0.28	4.4±0.35
46	α-Curcumène	1473	1474	-	-	-	-
47	Germacrène-D	1479	1478	0.2±0.01	-	-	-
49	Zingiberène	1489	1483	0.2±0.01	0.7±0.14	0.4±0.07	0.6±0.01
50	Pentadécane	1500	1497	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
51	γ-cadinène	1507	1501	-	-	-	-
52	Butyrate de géranyl	1534	1530	Tr	0.1±0.01	-	0.2±0.01
53	Isobutyrate d'isochavicol	1546	1541	-	0.4±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
56	Caryophyllène oxyde	1578	1572	-	-	-	-
57	Acétate de dodecyl	1585	1580	14.2±0.49	32.4±1.70	16.4±1.06	21.7±0.85
58	α-Cédrol	1603	1596	-	-	-	-
59	Hexadécane	1600	1599	-	-	-	-
60	2-méthyle butyrate d'isochavicol	1651	1648	-	-	-	0.4±0.01
60a	Bisabolol oxide B	1654	1650	-	-	-	-
62	Heptadécane	1700	1703	0.1±0.01	0.2±0.01	tr	0.2±0.01
63	Benzoate de benzyl	1730	1717	0.1±0.01	0.7±0.01	tr	2.7±0.14
66	Hexadécanal	1782	1787	0.5±0.01	0.5±0.01	0.5±0.07	0.7±0.01



<b>67</b>	Neophytadiène	1807	1807	Tr	0.8±0.01	tr	3.2±0.21
	<b>% d'identification</b>				96.8±0.57	95.4±0.21	95.7±0.28
	<b>Total aaires10<sup>5</sup>e</b>				486.4	451.3	445.5
	<b>Composés hydrocarbonés</b>				49.4	28.4	31.2
	<b>Composés oxygénés</b>				47.4	67.0	64.5
	<b>Composés aliphatiques</b>				96.3	91.8	95.1
	<b>Composés phénylpropanoïdes</b>				0.1	1.8	0.2
	<b>Composés hydrocarbonés non-terpéniques</b>				49,0	27,4	30,8
	<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>				-	0.2	-
	<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>				0.4	0.8	0.4
	<b>Diterpènes hydrocarbonés</b>				-	-	-
	<b>Composés oxygénés non-terpéniques</b>				47,4	66,2	64,5
	<b>Monoterpènes oxygénés</b>				-	-	-
	<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>				-	0.8	-

<sup>a</sup> L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) .

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup> Pourcentage (moyenne de trois analyses) obtenue par GC-FID (on RTX-1: apolaire colonne) avec normalisation des aires des pics sous optimisation des paramètres HS-SPME : température: 70°C; temps d'équilibre : 60 min; temps d'extraction : 30 min.

<sup>e</sup> composés identifiés a partir des données de la bibliothèque commercial: National Institute of Standards and Technology, 1999 (**1b, 12, 15c, 17a, 19d, 20b**); et des données de la littérature : Joulain and Konig, 1998 (**3a, 13a, 19b, 19c, 24a, 32b, 35, 36, 36a, 38a, 41, 42**).

Les principaux composés volatils des racines étaient les composés aliphatiques (88.1-96.3 %), comme le dodécanal (20,6-55,4 %), l'undécane (2,3-43,5 %), l'acétate de dodécyle (14,2-32,4 %) et le dodécanol (1,7-8,8 %). Concernant les parties aériennes, les fractions volatiles des feuilles et des tiges était dominées par des composés aliphatiques hydrocarbonés (22,2-87,9 % et 27,6-37,9 %) respectivement, en particulier les alcanes tels que le pentadécane (11,9-16,0 % et 19,9-51,6 %) et l'heptadécane (9,0-20,7 % et 4,1-20,7 %).

En outre, les monoterpènes hydrocarbonés étaient identifiés dans les tiges (28,0-29,4 %), par exemple le limonène (7,5-11,7 %) et le myrcène (7,4-10,6 %), par contre, l'isochavicol isobutyrate (0,2-19,0 %) a été identifié comme composé volatil émis par les feuilles. L'apparition des phénylpropanoïdes était établie à la fois dans les fractions volatils émises par les ombelles et les fleurs (43,1-88.6 %), par exemple l'isochavicol isobutyrate (26,7-51,8 % et 14,3-19,7 %, respectivement) et l'isochavicol (7,1-15,2 % et 29,6-34,7 %, respectivement).

De plus, les composés aliphatiques hydrocarbonés, en particulier, le pentadécane et l'heptadécane étaient identifiés et leur abondance était plus élevée dans la fraction volatile extraite des fleurs (la somme était proche de 20 %) que des ombelles (la somme était proche de 10 %).

Tableau III.5 : Composés volatils extraits par Edt-MEPS des feuilles et des tiges du *D. crinitus*

No. <sup>a</sup>	Composés <sup>z</sup>	Pourcentages <sup>d</sup>									
		/RIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	Feuilles				Tiges			
				A	B	C	D	A	B	C	D
1a	Heptane	700	702	0.1±0.01	Tr	tr	tr	0.3±0.07	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
1b	3-méthyle 1-Butanol	717	710	tr	-	-	-	0.3±0.01	0.1±0.01	0.3±0.01	0.5±0.07
1c	Héxanal	780	767	tr	0.1±0.01	tr	0.6±0.07	0.7±0.07	0.2±0.01	0.8±0.07	1.0±0.14
1d	Hex-5-en-1-ol	820	820	0.3±0.07	0.5±0.07	0.2±0.01	0.9±0.07	tr	tr	0.1±0.01	0.1±0.01
1e	2-Heptanone	871	870	tr	0.3±0.01	-	0.3±0.01	tr	-	-	-
1	Nonane	906	902	3.7±0.14	2.1±0.14	1.2±0.14	0.8±0.14	1.4±0.14	0.5±0.07	1.4±0.21	1.7±0.28
2	α-Pinène	936	931	0.2±0.01	2.8±0.21	0.2±0.01	0.6±0.01	6.1±0.21	1.8±0.21	6.1±0.01	2.6±0.14
2a	Camphène	950	943	0.1±0.01	-	-	-	0.2±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
3	Sabinène	973	966	0.3±0.01	0.3±0.01	-	tr	0.6±0.07	0.2±0.01	0.4±0.01	0.3±0.01
3a	2-pentyl Furan	981	978	tr	-	-	-	0.2±0.01	tr	0.2±0.01	0.1±0.01
5	Myrcène	987	981	0.1±0.01	0.6±0.14	-	0.2±0.07	10.6±0.64	10.0±0.64	7.4±0.54	7.5±0.35
5a	α-Phellandrène	1002	991	tr	0.2±0.01	-	-	0.3±0.01	0.4±0.07	0.4±0.01	0.4±0.07
5b	Isobutyrate de 3-méthyl butyl	994	997	0.2±0.01	Tr	0.1±0.01	-	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
6	Décane	993	998	tr	Tr	-	-	0.1±0.01	0.3±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
6a	Isobutyrate 2- methyl butyl	1004	999	0.1±0.01	Tr	0.2±0.01	-	0.1±0.01	-	-	tr
7	p-Cymène	1015	1012	-	3.5±0.21	-	0.1±0.01	2.2±0.14	0.2±0.01	2.7±0.21	3.3±0.21
9	Limonène	1025	1026	0.2±0.01	2.0±0.35	0.2±0.01	0.3±0.07	7.5±0.49	11.7±0.64	9.9±0.49	11.1±0.92
10	(E)-β-Ocimène	1041	1037	tr	0.7±0.07	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.5±0.01	0.4±0.01	0.7±0.01
11	γ-Terpinène	1051	1049	0.2±0.01	7.4±0.01	-	-	1.6±0.28	2.7±0.21	1.6±0.01	2.3±0.28
12	1-Octanol	1061	1056	0.1±0.01	Tr	-	tr	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.07
13	2-méthyle Décane	1068	1065	0.6±0.07	-	-	-	tr	-	tr	tr
14	Nonanal	1076	1074	tr	0.4±0.01	-	-	-	0.3±0.01	0.5±0.01	0.8±0.07
15	α-Terpinolène	1082	1079	0.2±0.01	9.4±0.42	-	-	0.2±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.5±0.07
15a	2-Nonanol	1085	1080	-	-	-	-	0.1±0.01	0.4±0.01	0.4±0.01	0.5±0.01
17	Undécane	1100	1098	11.1±0.57	2.9±0.35	1.2±0.07	8.9±0.28	2.7±0.78	2.8±0.14	2.1±0.35	2.6±0.14
17a	Limonène 1-2-époxyde	1117	1113	tr	0.1±0.01	-	-	-	-	-	-
17b	Camphor	1123	1120	tr	0.5±0.07	0.3±0.01	0.5±0.07	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
17c	Isobutyrate de n-hexyl	1127	1126	0.1±0.01	0.1±0.01	-	0.1±0.01	-	0.2±0.01	0.1±0.01	tr
17d	Cryptone	1160	1158	tr	0.1±0.01	-	-	0.4±0.07	0.3±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01
19	Térpinèn-4-ol	1164	1161	-	-	-	-	0.3±0.01	0.6±0.07	0.3±0.01	0.4±0.01
19a	3-méthyle Undécane	1170	1165	-	-	-	-	-	-	-	-
19b	Estragole	1175	1169	0.2±0.01	-	-	-	tr	0.9±0.01	0.8±0.14	1.0±0.14
21	Décanal	1188	1187	1.5±0.02	14.8±0.01	7.8±0.57	2.5±0.14	1.1±0.01	1.8±0.21	2.1±0.14	2.5±0.01
22	Dodécane	1200	1198	0.1±0.01	Tr	-	-	tr	0.3±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
22a	γ-Octanolide	1208	1208	0.1±0.01	0.1±0.01	0.5±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.4±0.01	0.3±0.01	0.4±0.07
22b	Chavicol	1219	1214	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.3±0.01
22c	Acétate de 2-Nonanyl	1224	1220	-	-	-	-	tr	0.2±0.01	tr	tr

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

23	Décanol	1263	1259	0.2±0.01	0.8±0.01	1.8±0.21	-	1.8±0.14	2.2±0.14	1.4±0.14	1.5±0.21
23a	Trans-Anéthol	1262	1260	tr	-	-	-	tr	0.1±0.01	tr	tr
24	Acide nonanoïque	1263	1263	-	-	-	-	0.3±0.07	0.4±0.07	0.4±0.01	0.4±0.01
24a	Isobutyrate de benzyl	1269	1266	-	-	-	-	-	-	-	-
24b	Undécan-2-one	1273	1268	0.1±0.01	-	-	-	0.2±0.01	0.6±0.07	0.5±0.01	0.5±0.01
25	Undécanal	1290	1280	-	Tr	0.2±0.01	-	tr	0.3±0.01	0.2±0.01	0.3±0.01
26	Tridécane	1300	1292	0.2±0.01	0.1±0.01	0.4±0.01	0.3±0.07	0.2±0.01	0.4±0.01	0.3±0.01	0.4±0.01
26a	Isochavicol	1313	1315	0.1±0.01	0.1±0.01	0.7±0.01	-	0.4±0.07	0.1±0.01	0.1±0.01	tr
27	Isobutyrate de n-Octyl	1329	1325	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	-	-	-	-	-
28	Acétate de Neryl	1342	1336	-	-	0.1±0.01	-	0.2±0.01	1.1±0.21	1.1±0.01	1.0±0.14
29	Acide décanoïque	1347	1348	-	-	tr	-	tr	0.2±0.01	0.1±0.01	tr
30	2-méthyle butyrate de benzyl	1360	1352	tr	-	tr	-	-	-	-	-
31	Acétate de géranyl	1362	1359	-	-	0.1±0.01	-	tr	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01
33	$\alpha$ -Copaène	1379	1372	-	-	-	-	1.6±0.14	2.1±0.14	4.1±0.01	2.6±0.14
34	$\beta$ -Bourbonène	1386	1376	-	-	-	-	4.0±0.42	3.6±0.21	3.7±0.01	3.2±0.28
35	Dodécanal	1389	1390	0.4±0.14	1.5±0.21	4.4±0.14	2.1±0.01	2.7±0.28	1.3±0.21	1.2±0.01	1.4±0.07
36	Tétradécane	1400	1403	0.1±0.07	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
37	Longifolène	1411	1409	tr	0.2±0.01	-	2.3±0.21	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
38	$\alpha$ -Santalène	1422	1415	-	-	-	tr	0.1±0.01	tr	tr	tr
39	$\beta$ -Caryophyllène	1421	1424	0.8±0.14	0.1±0.01	-	-	0.7±0.14	1.2±0.07	0.4±0.01	0.8±0.07
40	Dauca-3,8-diène	1428	1426	0.1±0.01	-	-	-	-	-	-	-
41	Trans- $\alpha$ -bergamotène	1432	1432	0.4±0.01	0.2±0.01	-	-	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
42	(E)- $\beta$ -Farnesène	1446	1443	0.1±0.01	0.1±0.01	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
43	$\alpha$ -Humulène	1455	1451	0.3±0.01	0.2±0.01	0.6±0.01	0.3±0.01	0.8±0.01	0.2±0.01	0.3±0.07	0.3±0.01
45	Dodécanol	1472	1470	0.2±0.01	-	-	-	0.5±0.01	0.8±0.21	0.9±0.01	0.5±0.07
46	$\alpha$ -Curcumène	1473	1474	-	-	-	-	0.8±0.14	0.6±0.01	0.9±0.01	0.4±0.01
47	Germacrène-D	1479	1478	-	-	-	-	0.5±0.01	1.7±0.28	3.2±0.01	1.6±0.07
49	Zingiberène	1489	1483	-	-	-	-	tr	0.2±0.01	tr	0.1±0.01
50	Pentadécane	1500	1497	51.6±1.77	12.8±0.49	41.2±1.34	40.8±0.57	11.9±1.06	13.1±0.78	14.0±0.28	16.0±0.42
51	$\gamma$ -cadinène	1507	1501	tr	Tr	-	-	0.3±0.01	0.4±0.01	0.1±0.01	0.5±0.01
52	Butyrate de géranyl	1534	1530	-	0.6±0.01	-	-	0.3±0.01	2.0±0.01	1.7±0.01	1.6±0.21
53	Isobutyrate d'isochavicol	1546	1541	0.2±0.01	19.9±0.85	10.4±1.13	19.0±0.85	0.2±0.01	0.7±0.14	0.4±0.01	0.2±0.01
56	Caryophyllène oxyde	1578	1572	-	-	-	-	0.1±0.01	tr	tr	tr
57	Acétate de dodecyl	1585	1580	0.2±0.01	0.3±0.01	3.6±0.21	5.0±0.21	2.3±0.28	2.0±0.01	2.3±0.21	2.6±0.07
58	$\alpha$ -Cédrol	1603	1596	-	0.1±0.01	-	-	1.4±0.21	1.0±0.01	0.9±0.01	0.9±0.07
59	Hexadécane	1600	1599	0.3±0.01	0.1±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.5±0.01	0.4±0.01	0.2±0.01	0.3±0.01
60	2-méthyle butyrate d'isochavicol	1651	1648	0.1±0.01	2.7±0.01	2.9±0.01	2.1±0.14	0.1±0.01	0.4±0.01	0.3±0.01	0.1±0.01
60a	Bisabolol oxyde B	1654	1650	0.2±0.01	-	tr	0.1±0.01	3.9±0.01	2.7±0.01	2.1±0.01	1.1±0.14
62	Heptadécane	1700	1703	20.7±1.56	4.1±0.21	11.9±0.35	6.4±0.57	20.7±0.57	13.2±0.42	9.0±0.35	11.2±0.49
63	Benzoate de benzyl	1730	1717	-	-	0.3±0.01	0.7±0.01	0.5±0.07	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01
66	Hexadécanal	1782	1787	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	tr	0.1±0.01	tr	tr	0.2±0.01
67	Neophytadiène	1807	1807	0.6±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.4±0.01	0.3±0.01	tr	0.1±0.01	0.2±0.01
<b>% d'identification</b>				97.3±0.21	93.6±0.64	93.1±0.21	96.3±0.28	95.7±0.35	92.1±0.07	90.9±0.28	92.9±0.49

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

<b>Total aaires10<sup>5</sup>e</b>	391.8	351.9	378.3	345.6	312.5	336.1	333.8	342.8
<b>Composés hydrocarbonés</b>	92.8	65.1	66.9	65.4	82.8	72.9	73.9	76.4
<b>Composés oxygénés</b>	4.5	28.5	26.2	30.9	12.9	19.2	17.0	16.5
<b>Composés aliphatiques</b>	90.8	42.0	75.7	69.3	49.4	46.1	42.6	49.1
<b>Composés phénylpropanoïdes</b>	0.7	22.8	14.4	21.8	1.3	2.5	1.9	1.8
<b>Composés hydrocarbonés non-terpéniques</b>	88.7	37.1	64.2	60.8	43.8	34.2	31.3	37.3
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>	1.3	26.9	0.5	1.2	29.4	28.0	29.4	28.9
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>	2.2	0.9	2.1	3.0	9.3	10.7	13.1	10.0
<b>Diterpènes hydrocarbonés</b>	0.6	0.2	0.1	0.4	0.3	-	0.1	0.2
<b>Composés oxygénés non-terpéniques</b>	4.3	27.7	25.9	30.3	6.9	14.4	13.2	13.6
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	-	0.7	0.3	0.5	0.8	1.1	0.8	0.9
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>	0.2	0.1	-	0.1	5.2	3.7	3.0	2.0

<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) .

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup> Pourcentage (moyenne de trois analyses) obtenue par CPG-FID (on RTX-1: apolaire colonne) avec normalisation des aires des pics sous optimisation des paramètres HS-SPME : température: 70°C; temps d'équilibre : 60 min; temps d'extraction : 30 min.

<sup>e</sup> composés identifiés a partir des données de la bibliothèque commercial: National Institute of Standards and Technology, 1999 (**1b, 12, 15c, 17a, 19d, 20b**); et des données de la littérature : Joulain and Konig, 1998 (**3a, 13a, 19b, 19c, 24a, 32b, 35, 36, 36a, 38a, 41, 42**).

**Tableau III.6:** Composés volatils extraits par HS-SPME des ombelles et des fleurs du *D. crinitus*

No. <sup>a</sup>	Composés <sup>‡</sup>	/RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	Pourcentages <sup>d</sup>							
				Ombelles				Fleurs			
				A	B	C	D	A	B	C	D
<b>1a</b>	Heptane	700	702	tr	tr	0.1±0.01	Tr	tr	0.1±0.01	tr	Tr
<b>1b</b>	3-méthyle 1-Butanol	717	710	tr	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	-	-	-	-
<b>1c</b>	Hexanal	780	767	0.1±0.01	0.1±0.01	Tr	Tr	0.2±0.01	0.3±0.07	0.6±0.01	0.8±0.01
<b>1d</b>	Hex-5-en-1-ol	820	820	tr	tr	tr	0.1±0.01	-	-	-	-
<b>1e</b>	2-Heptanone	871	870	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>1</b>	Nonane	906	902	0.2±0.07	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.5±0.07	0.4±0.07
<b>2</b>	α-Pinène	936	931	0.2±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.7±0.07	0.5±0.14	0.7±0.01	0.8±0.01
<b>2a</b>	Camphène	950	943	0.1±0.01	-	-	-	-	-	-	-
<b>3</b>	Sabinène	973	966	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3a</b>	2-pentyl Furan	981	978	0.1±0.01	-	-	-	-	-	-	-
<b>5</b>	Myrcène	987	981	0.6±0.01	0.2±0.01	0.6±0.07	0.2±0.01	0.6±0.01	0.5±0.07	2.2±0.14	2.1±0.07
<b>5a</b>	α-Phellandrène	1002	991	1.1±0.01	-	-	-	-	-	-	-
<b>5b</b>	Isobutyrate de 3-méthyle butyl	994	997	0.5±0.07	0.3±0.01	0.6±0.07	0.7±0.07	0.4±0.01	0.3±0.01	0.4±0.07	0.3±0.01
<b>6</b>	Décane	993	998	tr	tr	0.1±0.01	tr	-	-	-	-
<b>6a</b>	Isobutyrate de 2- méthyle butyl	1004	999	-	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>7</b>	p-Cymène	1015	1012	0.8±0.07	9.7±0.14	0.6±0.01	0.6±0.07	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01
<b>9</b>	Limonène	1025	1026	1.8±0.21	1.6±0.07	1.8±0.14	2.3±0.28	0.7±0.14	0.7±0.07	1.1±0.14	2.2±0.28
<b>10</b>	(E)-β-Ocimène	1041	1037	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>11</b>	γ-Terpinène	1051	1049	0.4±0.07	0.7±0.14	0.5±0.01	0.4±0.01	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>12</b>	1-Octanol	1061	1056	0.2±0.01	0.6±0.07	0.5±0.01	0.6±0.07	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01
<b>13</b>	2-méthyle Decane	1068	1065	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>14</b>	Nonanal	1076	1074	0.3±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.07	-	-	-	-
<b>15</b>	α-Terpinolène	1082	1079	0.3±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	-	-	-	-
<b>15a</b>	2-Nonanol	1085	1080	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	Tr	-	-	-	-
<b>17</b>	Undécane	1100	1098	0.3±0.07	0.3±0.01	0.3±0.01	0.2±0.07	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>17a</b>	Limonène 1-2-epoxide	1117	1113	tr	tr	-	tr	tr	0.2±0.01	0.1±0.01	tr
<b>17b</b>	Camphor	1123	1120	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	-	tr
<b>17c</b>	Isobutyrate de n-hexyl	1127	1126	0.5±0.07	0.5±0.01	0.5±0.01	0.6±0.14	-	-	-	-
<b>17d</b>	Cryptone	1160	1158	tr	tr	0.1±0.01	tr	tr	tr	0.1±0.01	0.1±0.01

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

<b>19</b>	Terpinèn-4-ol	1164	1161	tr	tr	-	0.1±0.01	tr	0.2±0.01	0.3±0.01	0.1±0.01
<b>19a</b>	3-méthyle Undécane	1170	1165	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>19b</b>	Estragole	1175	1169	0.1±0.01	0.4±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	-	-	-	-
<b>21</b>	Décanal	1188	1187	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	-	-	-	-
<b>22</b>	Dodécane	1200	1198	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>22a</b>	γ-Octanolide	1208	1208	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.4±0.07
<b>22b</b>	Chavicol	1219	1214	2.3±0.28	1.7±0.01	2.0±0.14	1.7±0.28	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	tr
<b>22c</b>	Acétate 2-Nonanyl	1224	1220	tr	tr	-	0.1±0.01	0.7±0.14	0.9±0.01	0.7±0.01	0.8±0.14
<b>23</b>	Décanol	1263	1259	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.07	0.5±0.07	0.2±0.01	0.4±0.01	0.4±0.07
<b>23a</b>	Trans-Anéthol	1262	1260	0.5±0.01	tr	0.1±0.01	0.5±0.07	0.4±0.01	0.3±0.07	0.6±0.01	0.5±0.01
<b>24</b>	Acide nonanoïque	1263	1263	2.3±0.21	0.2±0.07	-	-	0.5±0.14	0.5±0.07	0.7±0.07	0.4±0.01
<b>24a</b>	Isobutyrate de benzyl	1269	1266	-	-	-	-	0.3±0.01	0.5±0.01	0.5±0.01	0.5±0.01
<b>24b</b>	Undécan-2-one	1273	1268	0.2±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.2±0.01	0.4±0.01	0.2±0.01
<b>25</b>	Undécanal	1290	1280	0.3±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.4±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.4±0.01
<b>26</b>	Tridécane	1300	1292	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.0	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
<b>26a</b>	Isochavicol	1313	1315	15.2±1.34	9.1±0.57	15.5±0.42	7.1±0.49	31.8±1.34	34.7±1.27	29.6±0.99	32.9±1.13
<b>27</b>	Isobutyrate n-Octyl	1329	1325	0.4±0.07	0.2±0.01	0.3±0.01	0.2±0.01	0.8±0.07	0.7±0.01	0.4±0.01	0.5±0.01
<b>28</b>	Acétate de neryl	1342	1336	0.2±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.3±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>29</b>	Acide décannoïque	1347	1348	0.2±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	-	-	-	-
<b>30</b>	2-méthyle Butyrate de benzyl	1360	1352	tr	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.3±0.01	0.1±0.01	0.5±0.01	0.3±0.01
<b>31</b>	Acétate de géranyl	1362	1359	0.7±0.14	0.7±0.07	0.7±0.07	0.7±0.07	0.6±0.07	0.3±0.01	0.2±0.01	0.7±0.01
<b>33</b>	α-Copaène	1379	1372	0.3±0.14	0.4±0.01	0.5±0.01	0.4±0.01	0.6±0.14	0.4±0.01	0.6±0.01	0.6±0.07
<b>34</b>	β-Bourbonène	1386	1376	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01
<b>35</b>	Dodécanal	1389	1390	0.4±0.07	0.6±0.01	0.6±0.01	0.5±0.07	0.5±0.14	0.5±0.01	0.8±0.14	0.4±0.01
<b>36</b>	Tetradécane	1400	1403	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>37</b>	Longifolène	1411	1409	tr	tr	tr	tr	0.5±0.01	0.3±0.01	0.5±0.01	0.2±0.07
<b>38</b>	α-Santalène	1422	1415	-	-	-	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>39</b>	β-Caryophyllène	1421	1424	5.1±0.28	5.8±0.01	4.2±0.14	5.4±0.42	0.1±0.01	tr	0.2±0.01	tr
<b>40</b>	Dauca-3,8-diène	1428	1426	tr	tr	tr	tr	0.2±0.01	0.1±0.10	0.3±0.07	0.5±0.07
<b>41</b>	Trans-α-bergamotène	1432	1432	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.7±0.07	0.4±0.07	0.6±0.07	0.5±0.07
<b>42</b>	(E)-β-Farnesène	1446	1443	0.3±0.01	tr	0.2±0.01	0.1±0.01	0.7±0.07	0.5±0.07	1.1±0.01	0.5±0.01
<b>43</b>	α-Humulène	1455	1451	tr	0.3±0.01	0.1±0.01	0.2±0.07	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
<b>45</b>	Dodécanol	1472	1470	6.0±0.14	6.8±0.49	7.1±0.35	7.6±0.42	1.9±0.28	3.6±0.14	2.6±0.07	2.0±0.14
<b>46</b>	α-Curcumène	1473	1474	0.8±0.21	tr	0.5±0.01	0.3±0.01	0.5±0.05	0.4±0.01	0.7±0.07	0.3±0.01

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

47	Germacrène-D	1479	1478	0.2±0.01	1.0±0.01	0.9±0.01	0.7±0.07	0.5±0.01	0.2±0.01	0.5±0.01	0.5±0.01
49	Zingiberène	1489	1483	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.5±0.01	0.3±0.01	0.8±0.07	0.4±0.01
50	Pentadécane	1500	1497	8.9±0.57	5.9±0.20	4.1±0.28	3.6±0.21	14.2±0.49	12.5±0.35	14.0±0.64	12.9±0.49
51	γ-cadinène	1507	1501	0.2±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01
52	Butyrate de géranyl	1534	1530	tr	0.4±0.01	0.5±0.01	0.4±0.07	tr	0.1±0.01	tr	0.1±0.01
53	Isobutyrate d'isochavicol	1546	1541	26.7±1.20	49.4±0.99	40.3±1.70	51.8±0.64	14.3±0.01	15.4±0.64	18.2±0.49	19.7±0.57
56	Caryophyllène oxyde	1578	1572	0.5±0.01	0.2±0.01	0.5±0.01	0.5±0.01	-	-	-	-
57	Acétate de dodécyl	1585	1580	0.7±0.14	0.6±0.01	0.6±0.07	0.7±0.07	0.4±0.01	0.5±0.01	0.3±0.01	0.2±0.01
58	α-Cédrol	1603	1596	0.6±0.07	0.3±0.01	0.4±0.01	0.6±0.01	1.7±0.35	1.2±0.01	1.0±0.14	1.2±0.14
59	Hexadécane	1600	1599	0.1±0.01	0.6±0.01	0.3±0.07	0.3±0.01	0.7±0.01	0.5±0.01	0.5±0.01	0.4±0.01
60	2-méthyle butyrate d'isochavicol	1651	1648	3.1±0.21	3.6±0.01	3.4±0.14	2.3±0.21	2.3±0.14	2.3±0.01	2.0±0.07	2.6±0.28
60a	Bisabolol oxide B	1654	1650	0.6±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	1.7±0.01	2.5±0.01	1.3±0.01	2.4±0.21
62	Heptadécane	1700	1703	6.0±0.28	1.9±0.28	1.6±0.14	1.7±0.07	7.1±0.35	5.0±0.42	5.1±0.49	4.5±0.57
63	Benzoate de benzyl	1730	1717	0.2±0.01	tr	0.1±0.01	0.2±0.07	0.6±0.07	0.5±0.01	0.3±0.01	0.5±0.07
66	Hexadécanal	1782	1787	0.1±0.01	tr	Tr	Tr	0.1±0.01	tr	tr	tr
67	Neophytadiène	1807	1807	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	Tr	tr	tr	tr	tr
<b>% d'identification</b>				92,8±0.35	98,8±0.78	94,8±0.64	98±0.64	91,6±0.64	91,2±0.49	94,2±0.85	97,5±0.35
<b>Total aires 10<sup>5</sup>e</b>				280,1	247,7	267,9	260,4	524,5	535,7	549,3	558,2
<b>Composés hydrocarbonés</b>				29,7	21,5	18,8	19,0	30,9	24,7	32,5	29,9
<b>Composés oxygénés</b>				63,1	77,3	76,0	79,0	60,7	66,5	61,7	67,6
<b>Composés aliphatiques</b>				29,0	21,5	20,0	20,2	31,5	27,8	29,2	27,0
<b>Composés phénylpropanoïdes</b>				48,1	64,4	61,6	63,8	48,7	53,4	51,3	56,5
<b>Composés hydrocarbonés non-terpéniques</b>				16,3	9,7	7,2	6,8	23,1	19,1	21,7	19,9
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>				5,4	3,9	4,1	3,9	2,4	2,0	4,3	5,5
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>				7,9	7,9	7,4	8,3	5,4	3,6	6,5	4,5
<b>Diterpènes hydrocarbonés</b>				0,1	-	0,1	-	-	-	-	-
<b>Composés oxygénés non-terpéniques</b>				60,8	76,2	74,4	77,2	57,1	62,1	58,8	63,6
<b>Monoterpènes oxygénés</b>				0,1	0,1	0,2	0,2	-	0,5	0,5	0,2
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>				2,2	1,0	1,4	1,6	3,6	3,9	2,4	3,8

<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

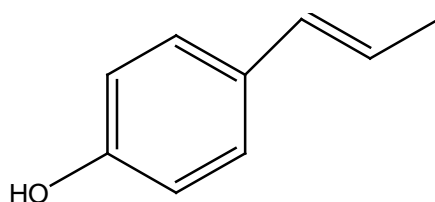
<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRIa).

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup> Pourcentage (moyenne de trois analyses) obtenue par CPG-FID (on RTX-1: apolaire colonne) avec normalisation des aires des pics sous optimisation des paramètres HS-SPME : température: 70°C; temps d'équilibre : 60 min; temps d'extraction : 30 min.

<sup>e</sup> composés identifiés à partir des données de la bibliothèque commercial: National Institute of Standards and Technology, 1999 (1b, 12, 15c, 17a, 19d, 20b); et des données de la littérature : Joulain and Konig, 1998 (3a, 13a, 19b, 19c, 24a, 32b, 35, 36, 36a, 38a, 41, 42).

L'identification de l'isochavicol, un composé non présent dans les bibliothèques, était réalisée à partir d'une comparaison des indices de rétention et les données EI-MS avec ceux des composés synthétisés en laboratoires, obtenu à partir de la réduction LiAH de l'isochavicol isobutyrate, et il était confirmé par une comparaison avec les données RMN  $^{13}\text{C}$  rapportées dans la littérature [2]. L'isochavicol présente une activité antispasmodique intéressante, en plus ce phénylpropanoïde rare n'a pas été identifiée avant dans l'huile essentielle de *D. crinitus* [2].



**Isochavicol**

#### II.4.3. Comparaison entre les deux méthodes

Les différences chimiques observées entre les deux huiles essentielles et les fractions volatiles extraites respectivement par hydrodistillation et MEPS, peuvent être expliquées par le fait que la première technique (hydrodistillation) est basée sur l'extraction quasi-totale de la matière volatile de la plante et la deuxième technique (MEPS) était contrôlée par deux équilibres : l'équilibre solide/gaz et l'équilibre gaz/fibre.

Au cours de l'hydrodistillation, les composés les plus volatils et les composés solubles dans l'eau sont perdus respectivement, dans la phase gazeuse et dans l'hydrolat, alors qu'avec l'extraction MEPS, c'est l'affinité des fibres de chaque composé qui surveille le prélèvement des matières volatiles.

En conséquence, il convient de noter que les 13 composés aliphatiques (1a-1e, 3a, 5b, 6a, 15a, 17c, 19a, 22c, 24b,24b, 26a et 60b) avec une masse moléculaire et à point d'ébullition bas n'ont été identifiés que dans les fractions volatiles extraites en utilisant Edt-MEPS. De la même manière, isochavicol (26a) était absent dans l'huile essentielle de *D. crinitus*, mais sa présence dans les fractions des feuilles en tant que composant principal (de 7,1% -34,7 %) peut s'expliquer par sa solubilité dans l'eau.



Seulement vingt-cinq composés (identifiés par un numéro suivi d'une lettre dans les **Tableau III.6** au total ont été identifiés dans les fractions volatiles extraites en utilisant Edt-MEPS, et 18 composés (identifiés par un astérisque dans le tableau **III.6**) ont été identifiés dans les huiles essentielles.

De la même manière, la quantité de la matière végétal utilisée pour l'analyse MEPS était plus faible (1g), tandis que la production de l'huile essentielle du *D. crinitus* à l'aide de l'hydrodistillation nécessite 200 à 300g de matière végétale.

En ce qui concerne la comparaison des deux techniques en terme de temps d'isolement, Edt-MEPS a été nettement plus rapide (70 min), tandis que 300 minutes ont été nécessaires pour l'hydrodistillation.

#### **II.4.4. Conclusion**

Plusieurs conclusions peuvent être tirées concernant la chimie du *D. crinitus* :

\* Deux types d'huiles essentielles étaient produits: l'huile de la racine qui été principalement constituée par des composés aliphatiques (de 87,0 à 90,1 %) tandis que l'huile de la partie aérienne était principalement composée par des phénylpropanoïdes (43,1-88,6 %).

\* L'analyse Edt-MEPS a montré une distribution plus précise des composés volatiles dans les organes étudiés: les composés aliphatiques oxygénés sont bien représentés dans les racines (44,3-84,0 %), les composés aliphatiques hydrocarbonés dans les feuilles et les tiges (31,3-88,7 %) et les phénylpropanoïdes dans les fleurs et les ombelles (47,9-64,2 %).

\* Enfin, cette étude a démontré que l'extraction Edt-MEPS peut être considérée comme une technique alternative pour isoler les substances volatiles des plantes aromatiques.

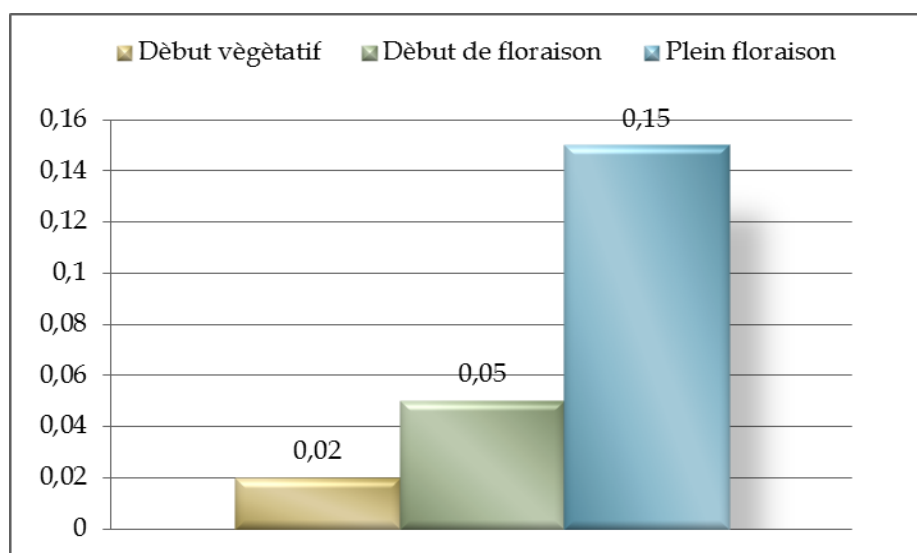
## II.5. Etude de l'Huile Essentielle du *D. crinitus* durant les trois stades végétatifs de la plante

La variation de la composition chimique des huiles essentielles peut être due à de nombreux facteurs, tels que les facteurs génétiques, les stades phénologiques, les conditions environnementales et les conditions pédoclimatiques. En effet, au cours de l'ontogénèse un certain nombre de transformations se produisent, révélées par les changements et la variabilité des processus physiologiques [4] et morphologiques.

Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude pour évaluer la variation de la composition chimique de l'huile essentielle en fonction du cycle végétatif; l'étude a été réalisée sur la station de Chelaida à environ 8 km au Nord Est de Tlemcen, nous avons suivi la composition chimique de l'huile essentielle en fonction de l'évolution végétative de la plante, du repos hivernale de la plante jusqu'à la floraison: stade végétatif (fin Mars), stade de floraison (mi-Mai) et stade pleine floraison (à la fin du mois de Juillet).

### II.5.1. Caractérisation chimique

La variation du rendement en huile essentielle des parties aériennes de *D. crinitus* avec les trois stades de croissance est présentée dans la Figure ci-dessous.



**Figure III.3:** Variation du rendement en huile essentielle des parties aériennes de *D. crinitus* avec les trois stades de croissance

Un changement important dans le rendement en huile essentielle était observé au cours des différents stades de croissance.

Pendant le début du cycle végétatif, le rendement en huile essentielle était de 0,02 %. Au début du stade de la floraison, le rendement a augmenté et atteint 0,05%. Au stade de la pleine floraison, il a considérablement augmenté pour atteindre 0,15 % (Figure III.3).

La variation du rendement en huile peut être attribuée à de nombreux facteurs, tels que les facteurs génétiques, le stade de développement, la méthode d'extraction et les conditions pédoclimatiques [5, 6].

Il semble que le rendement en huile au cours de la croissance de la plante est particulièrement sensible aux conditions environnementales (la lumière, la disponibilité des nutriments, et la longueur du jour) [7, 8].

### II.5.2. Compositions chimiques des trois huiles essentielles

Les trois huiles ont été analysées par CPG et CPG-SM et leurs compositions chimiques sont présentées dans le tableau III.7.

L'analyse des huiles essentielles des parties aériennes de *D. crinitus* durant les trois stades végétatifs nous a permis l'identification de 71 composés. Parmi ces derniers, 27 composés aliphatiques, 18 sesquiterpènes hydrocarbonés, 9 monoterpènes hydrocarbonés, 5 monoterpènes oxygénés, 5 composés phénoliques, 4 sesquiterpènes oxygénés, 2 diterpènes oxygénés, et 01 diterpène hydrocarboné.

**Tableau III.7** : Compositions chimiques des huiles essentielles de *D. crinitus* au cours des trois stades de développement.

N <sup>o</sup> a	Composés <sup>b</sup>	I <sub>1</sub> <sup>c</sup>	I <sub>a</sub> <sup>d</sup>	I	II	III
1	Nonane	900	900	tr	-	-
2	α- pinène	936	931	-	0,6	0,5
3	Sabinène	973	966	-	0,1	tr
4	β-pinène	978	971	-	0,1	tr
5	Myrcène	987	981	-	1,4	1,9

6	Décane	1000	1000	tr	0,1	0,1
7	p-cymène	1015	1012	-	0,1	0,1
8	1,8 Cineole	1024	1020	-	0,6	0,5
9	Limonène	1025	1026	-	0,6	1,5
10	(E)- $\beta$ -ocimène	1041	1037	-	0,1	0,1
11	$\gamma$ -terpinène	1051	1049	tr	0,1	0,1
12	1-Octanol	1061	1056	0.1	tr	tr
13	2- Methyl-Décane	1068	1065	-	tr	0,1
14	Nonanal	1076	1074	0.2	0.1	tr
15	$\alpha$ -Terpinolène	1082	1079	0,2	tr	0,1
16	Linalool	1086	1086	0,2	tr	0,1
17	Undécane	1100	1100	4.0	0,1	tr
18	Acétate de 2-Ethyl- hexyl	1144	1149	0,2	0,4	0,1
19	Terpinén-4-ol	1164	1161	0,1	0,1	0,1
20	Décanal	1188	1187	2,7	0,5	0,2
21	Dodécane	1200	1198	0.2	tr	tr
22	Décanol	1263	1259	10.4	2.1	0.7
23	Acide Nonanoïque	1263	1263	0.1	tr	tr
24	Acétate de bornyl	1270	1269	0.1	2.1	0.7
25	Undécanal	1290	1280	0.4	0.2	tr
26	Tridécane	1300	1300	0,4	tr	tr
27	Isobutyrate de n-Octyl	1329	1325	tr	tr	0.2
28	Acétate de Neryl	1342	1336	-	0.1	tr
29	Acide Décanoïque	1347	1348	0.6	0.2	tr
30	2-methyl Butyrate de benzyl	1360	1352	0.6	0.2	tr
31	Undécanol	1367	1367	0.8	0.4	0.1
32	$\alpha$ -copaène	1379	1386	0.1	0.1	tr
33	$\beta$ -Bourbonène	1386	1376	-	0.1	0.1
34	Dodécanal	1389	1390	6.3	7.3	0.2
35	Tétradécane	1400	1403	0.3	tr	tr
36	Longifolène	1411	1409	0.1	0.1	tr
37	$\alpha$ -Santalène	1422	1415	0.1	0.4	0.4
38	$\beta$ -Caryophyllène	1420	1424	0.1	tr	tr
39	Dauca-3,8-diène	1428	1426	0.1	tr	tr
40	trans- $\alpha$ -Bergamotène	1432	1431	0.2	tr	tr
41	(E)- $\beta$ -Farnesène	1448	1449	-	tr	tr
42	$\alpha$ -Humulène	1456	1451	1.9	0.5	tr
43	Zizaène	1456	1463	-	2.3	3.1
44	Dodécanol	1472	1470	2.7	0.5	0.4

45	$\alpha$ -Curcumène	1473	1474	0.1	0.4	0.4
46	Germacrène-D	1479	1478	0.2	tr	tr
47	$\beta$ -Selinène	1486	1480	0.1	tr	tr
48	Zingiberène	1489	1483	tr	tr	0.1
49	Pentadécane	1500	1500	5.4	1.1	0.1
50	$\gamma$ -Cadinène	1516	1513	0.1	0.1	tr
51	Butyrate de geranyl	1534	1530	1.2	2.1	0.5
52	Isobutyrate d'isochavicol	1546	1541	26.4	41.4	76.1
53	Benzoate (Z)-3-hexenyl	1545	1557	0.8	0.3	tr
54	Acide Dodécanoïque	1554	1560	0.6	0.4	tr
55	Caryophyllène oxyde	1576	1572	0.6	2.1	0.1
56	Acétate de dodecyl	1585	1580	-	0.4	0.1
57	Hexadécane	1600	1599	1.8	1.9	0.2
58	$\alpha$ -Cédrool	1603	1596	1.2	5.0	0.1
59	2-méthyl Butyrate d'isochavicol	1651	1648	7.9	11.3	5.4
60	$\alpha$ -Bisabolol	1672	1667	0.1	0.9	0.2
61	Heptadécane	1700	1700	9.8	2.9	0.1
62	Benzoate de benzyl	1730	1723	0.7	0.8	0.6
63	Acide Tétradécanoïque	1761	1756	0.1	0.3	0.1
64	Hexadécanal	1782	1787	1.1	0.5	0.1
65	Lactarazulène	1796	1792	tr	0,5	0,1
66	Neophytadiène	1807	1807	0.1	0.5	0.1
67	Phytone	1833	1835	0.2	0.1	0.2
68	Dodecyl pentanoate	1843	1840	0.2	0.1	1.3
69	Isophytol	1946	1944	-	tr	0,1
70	Acide Hexadécanoïque	1951	1949	1.5	0.1	tr
71	(E) Phytol	2114	2102	0.4	0.5	tr
<b>Total</b>				<b>93,8</b>	<b>95,3</b>	<b>97,4</b>
Composés aliphatiques				49,9	19,6	3,7
Composés phénoliques				36,4	54	82,1
Monoterpènes hydrocarbonés				0,2	3,1	4,3
Monoterpènes oxygénés				0,4	2,9	1,4
Sesquiterpène hydrocarbonés				4,3	6,6	5,1
Sesquiterpènes oxygénés				2,1	8,1	0,6
Diterpène hydrocarboné				0,1	0,5	0,1
Diterpènes oxygénés				0,4	0,5	0,1
<sup>a</sup> L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). <sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa). <sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa). tr = trace, (< 0.05%). Cycles végétatifs : I, début végétatif ; II, début de floraison ; III, plein floraison						

Cependant, au **début du cycle végétatif**, 56 composants étaient identifiés pour 93,8 % de la composition totale. Les groupes chimiques les plus abondants de cette huile étaient les composés aliphatiques (49,9 %), les composés phénoliques (36,4 %), les sesquiterpènes hydrocarbonés (4,3 %), et les sesquiterpènes oxygénés (2,1 %). Les principaux composés aliphatiques sont : le décanol (10,4 %), heptadécane (9,8 %), le dodécanol (6,3 %), pentadécane (5,4 %), l'undécane (4,0 %), suivi par le décanol (2,7 %), l'hexadécane (1,8), l'acide hexadécanoïque (1,5 %), et hexadécanol (1,1 %).

Cependant, l'isochavicol isobutyrate (26,4 %) et l'isochavicol 2 - butyrate de méthyle (7,9 %) étaient les principaux composés phénoliques. Les composés terpéniques étaient représentés uniquement par  $\alpha$ -humulène (1,9 %), geranyl butyrate (1,2 %), et  $\alpha$ -cédrol (1,2 %) (Tableau III.7).

En ce qui concerne le **début du stade de la floraison**, la composition de l'huile essentielle est similaire d'un point de vue qualitatif à celle observée dans le stade végétatif, caractérisée par un pourcentage élevé de composés phénoliques (54,0%) mais avec une légère différence dans la composition d'huile. Nous avons noté la présence de zizaène (2,3 %), l'oxyde de caryophyllène (2,1 %), l'acétate de bornyle (2,1 %), et le myrcène (1,4 %).

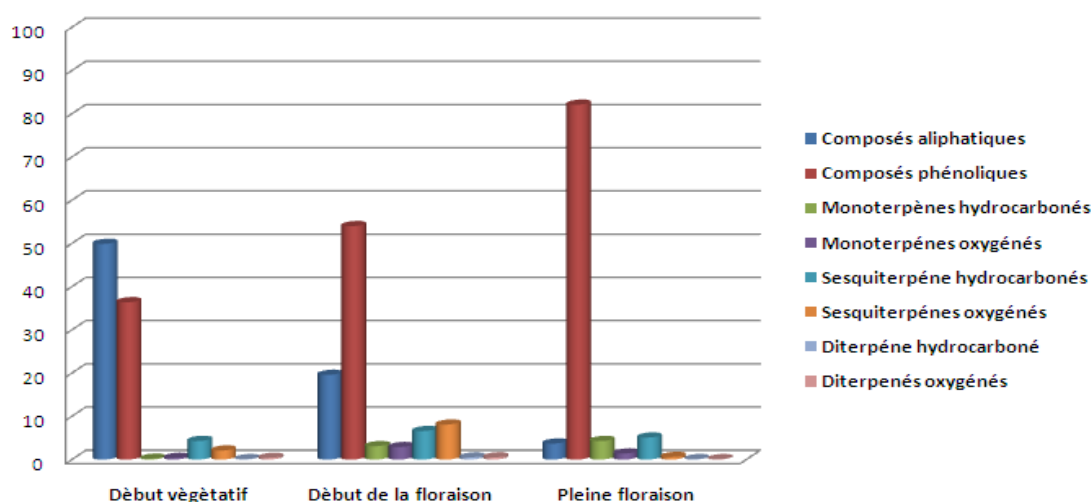
D'autre part, l'huile produite au **stade de la pleine floraison** était caractérisée par l'isochavicol isobutyrate (76,1 %), l'isochavicol 2-butyrate de méthyle (5,4 %), myrcène (1,9 %), zizaène (3,1 %), le limonène (1,5 %), et dodécyl pentanoate (1,3 %) (Tableau III.7).

La comparaison des compositions chimiques des huiles essentielles de *D. crinitus* obtenues à partir des trois stades de développement, montre des différences significatives :

Les composés phénoliques sont les éléments les plus abondants identifiés dans les parties aériennes de *D. crinitus*. Le taux de l'isochavicol isobutyrate augmente de manière significative aux stades de début floraison et de la pleine floraison (41,4 % et 76,1 %, respectivement).

Dans le stade de la pleine floraison et le début de la floraison, la fraction des terpènes hydrocarbonés a augmenté, principalement en raison d'une augmentation des pourcentages de zizaène, myrcène et limonène par rapport au début du stade végétatif. Toutefois, la fraction des composés aliphatiques était plus élevée au début du stade végétatif (49,9 % de l'huile totale), Tandis que son niveau diminue à 19,6 % à l'étape de début de la floraison, puis de 3,6 % à l'étape de la pleine floraison.

Selon nos résultats, il semble que la composition chimique de l'huile essentielle de *D. crinitus* varie de manière significative avec les stades physiologiques de la plante. Tout au long de la vie végétative, le *D. crinitus* produit trois huiles essentielles qui diffèrent en fonction du pourcentage de leurs classes de composés (Figure III.4).



**Figure III.4:** Pourcentage de la variation des principales classes de composés de *D. crinitus* à travers la végétation

## II.6. Extraction des acides gras et des insaponifiables

L'idée consiste à extraire et à établir le profil chimique des acides gras et des insaponifiables présents dans la plante et qui sont connus pour leur pouvoir biologique.

A cet effet, l'analyse de la composition des extraits a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

L'extraction a été réalisée en trois fois, et les rendements (la moyenne des trois extractions) dans le méthanol étaient : de 2,5 % pour les tiges, 6,1 % pour les feuilles et de 1,8 % pour les racines et dans l'éther de pétrole étaient : de 1,2 % pour les tiges,

5,8 % pour les feuilles et 1,5 % pour les racines. Les extraits aqueux, étaient extraits par 5 g de chaque organe avec 100 ml d'eau puis lyophilisés.

**Tableau III.8 :** Rendement des extraits (Tiges, feuilles et racines) du *D. crinitus*.

Organes	Rendement (%)			
	Extrait méthanolique	Extrait de l'éther de pétrole	Acides gras	Insaponifiables
Tiges	2,5	1,2	69.1	29.4
Feuilles	6,1	5.8	54.1	21.2
Racines	1,8	1,5	55.3	11.4

Les fractions insaponifiables des feuilles, des tiges et des racines représentent respectivement : 54,1 %, 69,1 % et 55,3 % (p / p) de l'extrait de l'éther de pétrole. Les fractions d'acides gras des feuilles, des tiges et des racines représentent respectivement : 21,2 %, 29,4 % et 11,4 % (p/p) de l'extrait de l'éther diéthylique (Tableau III.8).

#### **II.6.1. Les acides gras des feuilles, des tiges et des racines du *D. crinitus***

Les acides gras des feuilles, des tiges et des racines, ainsi que leurs indices de rétention et leur abondance relative sont données dans le tableau 9. L'analyse de la composition des extraits d'acides gras des feuilles, des tiges et des racines du *D. crinitus* révèle la présence de 25 constituants avec des pourcentages, respectivement, de : 84,1 %, 85,7 % et 86,6 % de la fraction totale en acide. Les trois fractions étaient qualitativement similaires. Cependant, l'acide propionique (0,9 %) était rapportée seulement dans l'extrait des tiges, et l'acide hexadécanoïque de méthyle (0,6 %) dans l'extrait des racines. Les extraits des feuilles, des tiges et des racines ont été caractérisés par des teneurs élevées en acides gras saturés avec l'acide laurique comme principale composé (respectivement : 17,9 %, 17,5 % et 18,1 %), suivi par l'acide palmitique (respectivement : 16,8 %, 14,3 % et 10,7 %, ), l'acide myristique (respectivement : 10,2 %, 14,5 % et 16,1 %,), l'acide béhénique (respectivement : 7,2 %, 9,1 % et 6,5 %), et l'acide stéarique (respectivement : 3,2 %, 2,7 % et 1,8 %). Les autres principaux composés sont des acides gras insaturés: l'acide linoléique (respectivement 12,5 %, 13,8 % et 14,6 %), l'acide 9-hexadécénoïque (respectivement 5,9 %, 4,1 % et 4,6 %), et l'acide cis-11-eicosénoïque (respectivement : 5,4 %, 2,5 % et 1,6 %) (Tableau III.9).



**Tableau III.9** : les acides gras des extraits des racines, tiges et feuilles du *D. crinitus* (proportions m/m exprimées par rapport au total des acides gras).

N <sup>a</sup>	Composés acides	I <sub>1</sub> <sup>b</sup>	I <sub>a</sub> <sup>c</sup>	Feuilles <sup>d</sup>	Tiges <sup>d</sup>	Racines <sup>d</sup>
1	Propanoïque (C <sub>3</sub> : 0)	618	611	-	0.9	-
2	Enanthique (héptanoïque, C <sub>7</sub> : 0)	1006	1005	0.2	0.2	0.1
3	Undécanoïque (C <sub>10</sub> : 0)	1407	1406	0.8	0.7	1.1
4	Laurique (dodécanoïque, C <sub>12</sub> : 0)	1501	1508	17.9	17.5	18.1
5	Tridecyclique (tridécanoïque, C <sub>13</sub> : 0)	1608	1605	0.3	0.9	0.4
6	Dodécanoïque 2-hydroxy (C <sub>12</sub> : 0)	1627	1619	0.8	0.1	0.3
7	Myristique (tétradécanoïque, C <sub>14</sub> : 0)	1708	1708	10.2	14.5	16.1
8	Farnésyl (3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatriénoïque, C <sub>15</sub> : 3)	1765	1770	tr	0.3	0.2
9	12-Méthyl tétradécanoïque (C <sub>15</sub> : 0)	1771	1777	0.1	0.2	0.3
10	(Z) Méthyle pentadéc-10-énoïque (C <sub>15</sub> : 1)	1786	1787	0.4	tr	0.1
11	Pentadécanoïque (C <sub>15</sub> : 0)	1808	1806	0.4	0.8	0.6
12	Tétradécanoïque 2-hydroxy (C <sub>14</sub> : 0)	1835	1826	0.2	0.1	0.3
13	Palmitoléique (9-Hexadécénoïque, C <sub>16</sub> : 1)	1895	1889	5.9	4.1	4.6
14	Palmitique (hexadécénoïque, C <sub>16</sub> : 0)	1908	1910	16.8	14.3	10.7
15	15-Méthyle hexadécénoïque (C <sub>17</sub> : 0)	1974	1970	-	-	0.3
16	Margarique (heptadécénoïque, C <sub>17</sub> : 0)	2008	2006	0.3	0.4	0.4
17	Linoléique (9,12-octadécadiénoïque, C <sub>18</sub> : 2)	2083	2072	12.5	13.8	14.6
18	Linoléique (9,12,15-octadécatriénoïque, C <sub>18</sub> : 3)	2081	2081	0.5	0.8	7.1
19	Oléique ((Z)-octadécénoïque, C <sub>18</sub> : 1)	2106	2084	0.4	0.7	0.7
20	Stéarique (octadécénoïque, C <sub>18</sub> : 0)	2109	2108	3.2	2.7	1.8
21	Nonadécénoïque (C <sub>19</sub> : 0)	2209	2207	0.3	0.4	0.1
22	Arachidonique (5,8,11,14-eicosatétraénoïque, C <sub>20</sub> : 4)	2217	2216	0.1	0.2	Tr
23	Cis 11-eicosénoïque (C <sub>20</sub> : 1)	2248	2247	5.4	2.5	1.6
24	Arachidique (eicosanoïque, C <sub>20</sub> : 0)	2311	2312	0.2	0.5	0.6
25	Béhenique (docosanoïque, C <sub>22</sub> : 0)	2511	2509	7.2	9.1	6.5
Total identifié				<b>84.1</b>	<b>85.7</b>	<b>86.6</b>

<sup>a</sup> L'ordre d'éluion de la colonne apolaire (Rtx-1). <sup>b</sup> Indice de rétention de la littérature des esters correspondant sur la colonne apolaire (I<sub>l</sub>) (Jennings and Shibamoto. 1980; König and al.. 2001). <sup>c</sup> Indice de rétention de la colonne apolaire Rtx-1 (I<sub>a</sub>). <sup>d</sup> Pourcentages relative (%) de la colonne apolaire (Rtx-1); tr = trace (<0.1%).

**II.6.2. Fraction insaponifiable des feuilles, tiges et racines de *D. crinitus***

L'analyse combinée (CPG et CPG-SM) des insaponifiables de *D. crinitus* a révélé la présence de 33 éléments: 33 dans la fraction des feuilles, 29 dans la fraction des tiges et 15 dans la fraction des racines avec des pourcentages de : 91,5 %, 92,8 % et 91,4 % respectivement, de la composition totale, (Tableau III.10).

**Tableau III.10:** Composition chimique de la fraction insaponifiable des feuilles, tiges et des racines de *D. crinitus*.

N <sup>o</sup> a	Composés	I <sub>r</sub> <sup>b</sup>	I <sub>a</sub> <sup>c</sup>	Feuilles <sup>d</sup>	Tiges <sup>d</sup>	Racines <sup>d</sup>	Identification
1	Nonane	900	900	0.2	tr	0.9	RI, MS
2	$\alpha$ - pinène	936	931	0.4	-	-	RI, MS
3	Sabinène	973	966	0.6	-	-	RI, MS
4	$\beta$ -pinène	978	971	0.1	-	-	RI, MS
5	Mycène	987	981	0.3	-	-	RI, MS
6	Décane	1000	1000	tr	0.1	0.1	RI, MS
7	p-Cymène	1015	1012	0.2	0.1	-	RI, MS
8	Limonène	1020	1021	0.9	1.1	-	RI, MS
9	(E)- $\beta$ -Ocimène	1041	1037	0.5	0.9	-	RI, MS
10	$\gamma$ -terpinène	1051	1049	1.6	0.8	-	RI, MS
11	$\alpha$ -Terpinolène	1082	1079	0.4	0.2	-	RI, MS
12	Undécane	1100	1100	5.5	8.5	4.1	RI, MS
13	Décanal	1188	1187	1.8	2.2	2.3	RI, MS
14	Tridécane	1300	1300	tr	0.1	0.8	RI, MS
15	Undécanol	1367	1368	0.3	0.2	-	RI, MS
16	Dodécanal	1389	1390	3.2	2.8	16.7	RI, MS
17	Isocaryophylène	1407	1416	0.6	0.5	-	RI, MS
18	Dodécanol	1474	1474	30.2	35.4	36.2	RI, MS
19	Germacrène-D	1479	1472	0.1	0.1	-	RI, MS
20	Pentadécane	1500	1500	4.2	3.3	4.7	RI, MS
21	Acétate de dodecyl	1606	1606	2.5	1.9	3.7	RI, MS
22	$\alpha$ - bisabolol	1673	1667	tr	tr	-	RI, MS
23	Heptadécane	1700	1700	3.8	2.6	0.2	RI, MS
24	Hexadéanal	1814	1826	1.1	1.8	0.3	RI, MS
25	Nonadécane	1900	1900	0.1	0.2	0.1	RI, MS
26	Heptadécanol	1968	1965	7.1	9.5	1.2	RI, MS
27	Eicosane	2000	2000	0.4	0.1	-	RI, MS
28	Phytol-(Z)	2080	2074	0.7	0.8	-	RI, MS
29	Heneicosane	2100	2100	tr	0.2	-	RI, MS
30	Phytol-(E)	2107	2105	1.1	0.7	-	RI, MS
31	Tricosane	2300	2300	9.9	7.1	10.5	RI, MS
32	Pentacosane	2500	2500	13.1	11.2	9.8	RI, MS
33	Néophytadiène	1830	1836	0.6	0.4	-	RI, MS

<b>Total identified</b>	<b>91.5</b>	<b>92.8</b>	<b>91.4</b>
Aliphatic	83.4	87.2	91.4
Monoterpenes	5.0	3.1	-
Diterpenes	2.4	1.9	-
Sesquiterpenes	0.7	0.6	-

<sup>a</sup> L'ordre d'éluion dans la colonne apolaire (Rtx-1).  
<sup>b</sup> Indice de rétention de la littérature ( $I_l$ ) (Jennings et Shibamoto. 1980; König et al.. 2001)  
<sup>c</sup> Indice de rétention de la colonne apolaire Rtx-1 ( $I_a$ ).  
<sup>d</sup> Pourcentages relative (%) de la colonne apolaire (Rtx-1); tr = trace (<0.1%).

Même si les composés aliphatiques sont en grande abondance dans les trois fractions, celles-ci sont qualitativement et quantitativement différentes. En effet, les fractions des feuilles et des tiges sont fortement dominées par des composés aliphatiques (83,4% et 87,2 %), monoterpéniques (5.0 % et 3,1 %), diterpènes (2,4 % et 1,9 %) et sesquiterpènes (0,7 % et 0.6 %), respectivement.

En outre, la famille des monoterpènes hydrocarbonés présente des différences qualitatives et quantitatives dans leur composition. Le  $\gamma$ -terpinène (1,6 %) est identifié comme le principal composant de la fraction des feuilles, associé à des faibles quantités de limonène (0,9 %), sabinene (0,6 %), (E)- $\beta$ -ocimène (0,5 %),  $\alpha$ -pinène (0,4 %),  $\alpha$ -terpinolène (0,4 %), myrcène (0,3 %) et le p-cymène (0,2 %), tandis que, les principaux composants de la fraction des tiges sont : le limonène (1,1 %), (E)- $\beta$ -ocimène (0,9 %),  $\gamma$ -terpinène (0,8 %), suivie par  $\alpha$ -terpinolène (0,2 %) et le p-cymène (0,1 %).

Les composés aliphatiques des feuilles et des tiges sont fortement dominés par le dodécanol (30,2 % et 35,4 %, respectivement) associé à des quantités importantes de heptadécanol (respectivement 7,1 % et 9,5 %), undécane (respectivement 5,5 % et 8,5 %), pentadécane (4,2 % et 3,3 % respectivement), heptadécane (respectivement 3,8 % et 2,6 %), dodécanal (3,2 % et 2,8 % respectivement) et l'acétate de dodécyle (2,5 % et 1,9 % respectivement).

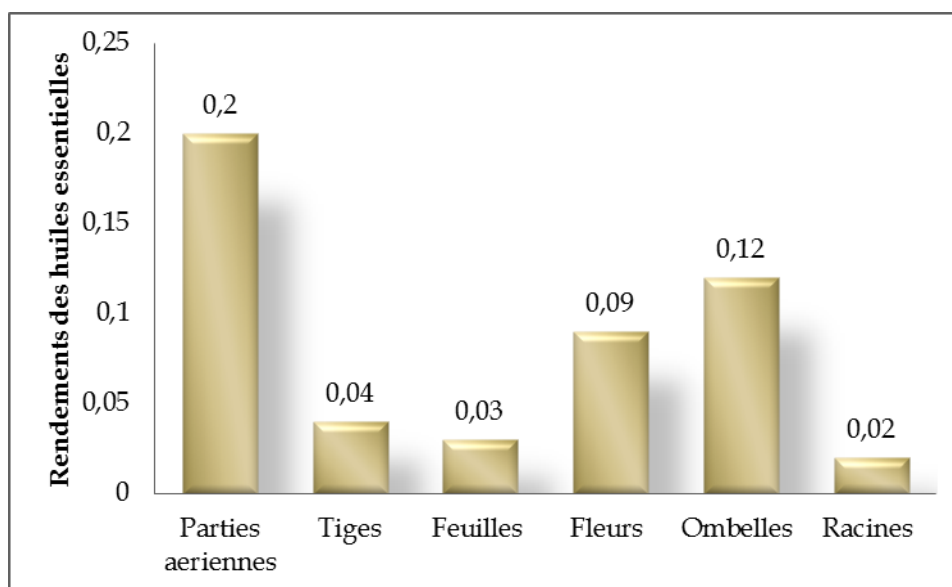
En revanche, la fraction des racines est caractérisée par une grande quantité de composés aliphatiques (91,4 %) et aucun des composés terpéniques n'a été trouvé. Les principales composantes de cet extrait sont le dodecanol (36,2 %), tricosane (10,5 %)

et pentacosane (9,6 %). Enfin, cette fraction est également caractérisée par des aldéhydes (19,3 %) et l'acétate de dodécyle (3,7 %) (Tableau III.10).

### III. Huiles essentielles de *D. muricatus*

Plusieurs enquêtes portant sur la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Daucus* [9, 10] ont été réalisés. Cependant, il reste de nombreuses espèces et sous-espèces de *Daucus* qui n'ont pas encore été examinées. Après plusieurs recherches infructueuses, nous avons trouvé que l'espèce de *D. muricatus*, n'a jamais fait l'objet d'une quelconque étude chimique.

Nous avons étudié pour la première fois les composés volatiles des différents organes du *D. muricatus* (racines, feuilles, tiges, fleurs, et ombelles) extraits par hydrodistillation et par micro-extraction en phase solide (MEPS) en utilisant la chromatographie gazeuse (CPG) et la spectrométrie de masse (CPG-SM). Les huiles étaient isolées par hydrodistillation (400-450 g de plante) pendant 6 h en utilisant un appareil de type Clevenger [1] selon la pharmacopée européenne, les rendements de l'huile sont : 0,02 % pour les racines et de 0,03 à 0,12 % pour les parties aériennes p/p de l'huile.



**Figure III.5:** Rendements des huiles essentielles des différents organes du *D. muricatus*

### III.1-Composition chimique de l'huile essentielle

Les analyses CPG-IR et CPG-SM des huiles essentielles du *D. muricatus* obtenues à partir des racines, tiges, feuilles, fleurs, et des ombelles représentaient, respectivement, 92,8, 94,7, 94,5, 95,4, et 95,7 g/100 g d'huiles essentielles ; elles ont permis l'identification de 99 composés. Leurs indices de rétention, les rendements et les concentrations relatives exprimées en g/100 g d'huile essentielle sont présentés dans le Tableau III.11.

Parmi les composés identifiés : 39 monoterpènes, 32 sesquiterpènes, 22 composés nonterpéniques, trois diterpènes, deux phénylpropanoïdes, et un C<sub>13</sub>-isoprenoid.

Tous ces derniers ont été identifiés en comparant leur SM et leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque "Arômes", à l'exception de neuf composants qui ont été identifiés par comparaison avec les données spectrales et les indices de rétention de la littérature (voir le tableau III.11).

Deux types d'huiles essentielles étaient produits par *D. muricatus*. Les huiles des racines sont essentiellement composées par des composés oxygénés (59,8 g/100 g), et les huiles des parties aériennes (feuilles, tiges, fleurs et ombelles) sont dominées par la présence des composés hydrocarbonés (de 62,3 à 72,2 g/100 g).

Les principaux constituants de l'huile des racines étaient les composés aliphatiques nonterpénique qui représentaient 56,7 g/100 g, comme l'eicosane (18,6 g/100 g), undecan-2-one (10,2 g/100 g), et tridécanol (6,4 g/100 g). Inversement, les principaux composants des organes aériennes du *D. muricatus* étaient des monoterpènes hydrocarbonés (52,0 à 58,5 g/100 g).

Pour tous les organes étudiés, le limonène (21,9 à 24,0 g/100 g) et  $\alpha$ -pinène (9,9 à 21,8 g/100 g) étaient les principaux composants. Leur abondance relative était suivie par celle de sabinène (4,7 à 8,1 g/100 g) dans les tiges, les feuilles et les fleurs, et l'acétate de trans-sabinyne en ombelles (12,1 g/100 g) (Tableau III.11).

**Tableau III.11 :** Composition d'huile essentielle des racines, feuilles, tiges, fleurs et ombelles du *D muricatus*

N°	Composés <sup>a</sup>	Organs séparés									Identification <sup>f</sup>
		RIa <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	Parties aeriennes	tiges	feuilles	Fleurs	ombelles	Racines	
1	Nonane	900	898	899	1.0	0.5	1.3	1.1	0.3	-	RI, MS
2	$\alpha$ -Thujène	932	923	1011	0.6	tr	0.2	0.7	0.1	-	RI, MS
3	$\alpha$ - Pinène	936	931	1016	16.7	9.9	18.9	14.3	21.8	0.5	RI, MS
4	Camphène	950	944	1056	0.3	0.2	0.2	0.2	0.8	tr	RI, MS
5	Thuja-2,4 (10) diène	946	945	1085	tr	0.2	0.1	tr	-	-	RI, MS
6	Sabinène	973	967	1111	18.9	5.1	4.7	8.1	4.6	0.2	RI, MS
7	$\beta$ -pinène	978	970	1102	2.5	2.1	1.8	2.8	1.4	0.1	RI, MS
8	Myrcène	987	980	1152	1.8	2.1	2.3	1.6	2.6	-	RI, MS
9	$\alpha$ -Phellandrène	1002	997	1140	0.6	0.5	0.4	0.6	0.2	-	RI, MS
10	$\alpha$ -Terpinène	1013	1008	1158	1.1	1.1	1.1	1.5	0.8	0.1	RI, MS
11	p-Cymène	1015	1012	1147	1.3	4.4	1.4	0.9	1.4	0.1	RI, MS
12	Limonène	1025	1022	1195	14.2	22.6	21.3	24.0	21.9	0.3	RI, MS
13	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1029	1025	1215	0.1	0.1	0.1	tr	0.2	tr	RI, MS
14	$\gamma$ -Terpinène	1051	1049	1239	2.6	2.4	1.6	3.1	1.1	tr	RI, MS
15	Hydrate de Trans-Sabinene	1053	1052	1438	0.2	0.1	0.1	0.3	tr	-	RI, MS
16	Nonan-2-one	1070	1073	1392	0.1	0.6	0.1	tr	0.1	0.3	RI, MS
17	p-Cyménène	1075	1077	1420	0.6	0.7	0.1	tr	tr	0.1	RI, MS
18	Terpinolène	1082	1079	1292	0.3	0.6	0.3	0.7	0.2	0.1	RI, MS
19	Linalool	1083	1085	1392	0.1	tr	0.4	0.3	0.2	-	RI, MS
20	Undécane	1100	1100	1098	0.6	2.1	1.9	0.4	0.9	0.1	RI, MS
21	Limonène-1,2-epoxide	1117	1119	1446	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.9	RI, MS
22	trans-Pinocarveol	1126	1120	1632	0.3	0.7	0.1	0.2	0.2	0.2	RI, MS
23	trans-2-Nonenal	1135	1133	1525	0.2	1.2	0.4	0.1	0.2	1.1	RI, MS
24	Pinocarvone	1137	1135	1520	0.1	0.4	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
25	Borneol	1150	1149	1670	0.1	0.2	0.1	tr	0.1	tr	RI, MS
26	Cryptone	1160	1159	1642	0.2	0.5	0.3	0.1	0.3	0.2	RI, MS
27	Terpinèn-4-ol	1164	1160	1563	2.7	1.1	0.8	3.1	0.8	1.7	RI, MS
28	Decan-2-one	1176	1170	1503	0.1	0.8	0.3	0.2	0.1	0.2	RI, MS
29	$\alpha$ -Terpineol	1176	1177	1685	0.2	0.3	0.1	0.1	tr	tr	RI, MS
30	Myrtenol	1178	1182	1763	tr	0.5	0.1	0.1	0.2	0.7	RI, MS
31	Décanal	1188	1185	1481	tr	0.8	0.1	0.1	tr	0.2	RI, MS
32	Dodécane	1200	1199	1201	tr	0.2	0.1	tr	0.1	0.3	RI, MS
33	Citronèllo	1213	1211	1724	0.1	0.1	0.1	tr	-	tr	RI, MS
34	Carvone	1214	1215	1749	tr	0.2	0.1	tr	-	tr	RI, MS
35	Pulegone	1215	1216	1602	tr	0.1	tr	tr	-	-	RI, MS
36	p-Anisaldehyde	1218	1219	2049	tr	0.6	tr	tr	0.3	-	RI, MS
37	Geraniol	1235	1235	1799	0.1	0.1	0.1	0.2	-	tr	RI, MS
38	trans-Myrtanol	1240	1236	1858	tr	0.1	0.2	0.2	0.5	-	RI, MS

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

39	Acetate de cis-Chrysanthenyl	1253	1242	1548	0.3	2.2	0.5	tr	0.1	0.2	RI, MS
40	$\alpha$ -Terpinèn-7-al	1257	1256	1763	0.1	0.2	0.2	0.4	0.3	tr	RI, MS
41	Thymol	1267	1264	2149	tr	0.1	0.1	0.1	-	0.6	RI, MS
42	Acetate de Bornyl	1270	1266	1536	0.2	0.6	0.2	0.1	0.4	0.9	RI, MS
43	Undecan-2-one	1273	1270	1579	0.3	3.9	0.5	0.3	0.8	10.2	RI, MS
44	Acetate de Trans-Sabinyl	1278	1271	1650	2.6	1.5	0.7	0.2	12.1	3.1	RI,MS,Ref1
45	Carvacrol	1278	1278	2224	tr	0.2	0.4	tr	0.1	0.5	RI, MS
46	Undécan 2-ol	1287	1285	1723	0.1	0.3	0.1	tr	-	1.2	RI, MS
47	Acétate de myrtenyl	1332	1320	1701	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	0.3	RI, MS
48	$\delta$ -Elemène	1340	1337	1535	0.2	0.5	1.7	0.1	0.2	-	RI, MS
49	Acetate de geranyl	1362	1360	1715	tr	0.2	tr	2.3	-	0.2	RI, MS
50	Undécanol	1363	1365	1820	0.2	0.6	1.1	1.2	0.1	0.3	RI, MS
51	$\alpha$ -Copaène	1379	1377	1488	0.2	0.6	0.5	0.2	0.5	-	RI, MS
52	$\beta$ -Bourbonène	1379	1383	1496	tr	0.4	0.3	0.2	0.1	-	RI, MS
53	$\beta$ -Elemène	1389	1390	1570	0.3	0.3	0.1	0.2	0.5	-	RI, MS
54	Dodécanal	1389	1395	1673	tr	0.1	0.1	0.2	tr	1.9	RI, MS
55	Aristolène	1418	1420	1553	0.1	tr	0.1	0.3	0.1	-	RI, MS
56	trans-Caryophyllène	1424	1422	1586	1.8	0.6	3.8	2.4	2.1	0.3	RI, MS
57	Geranyl acetone	1429	1426	1842	0.1	0.4	0.2	0.3	0.4	0.1	RI, MS
58	$\beta$ -Copaène	1430	1430	1579	tr	0.1	0.1	tr	0.4	-	RI, MS
59	$\alpha$ -Humulène	1455	1450	1655	0.4	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5	RI, MS
60	$\beta$ -Ionone	1468	1460	1902	0.5	0.2	0.1	0.8	0.4	-	RI, MS
61	Dodécanol	1472	1468	1754	0.2	0.2	0.2	tr	0.1	3.7	RI, MS
62	$\gamma$ -muurolène	1473	1471	1667	0.1	0.9	0.3	0.1	-	-	RI, MS
63	Germacrène D	1479	1476	1665	1.5	0.2	1.6	1.4	2.9	1.5	RI, MS
64	trans- $\beta$ -Bergamotène	1480	1475	1598	tr	tr	tr	0.1	tr	0.8	RI, MS
65	6-epi-shyobunone	1481	1480	1855	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	RI, MS
66	$\gamma$ -Humulène	1483	1487	1682	0.2	0.4	0.2	0.4	0.1	-	RI, MS
67	Bicyclgermacrène	1494	1490	1706	0.4	0.4	0.3	0.2	0.2	-	RI, MS
68	$\alpha$ -Muurolène	1496	1498	1710	0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	-	RI, MS
69	Shyobunone	1500	1501	1897	0.1	0.5	0.5	0.4	0.2	0.1	RI, MS
70	$\delta$ -Cadinène	1520	1515	1715	0.8	0.2	0.6	0.6	1.7	0.5	RI, MS
71	E- $\alpha$ -Bisabolène	1531	1526	1733	0.6	0.8	1.6	0.4	1.2	0.2	RI, MS
72	Isobutyrate d'isochavicol	1541	1538	2136	5.3	1.2	2.2	6.7	1.6	2.3	RI, MS
73	Germacrene B	1552	1555	1794	0.2	0.6	0.2	0.2	0.8	tr	RI,MS,Ref1
74	1,5-epoxy-salvial-4(14)-ene	1561	1561	1903	0.1	0.7	0.4	0.5	0.4	3.6	RI, MS
75	Spathulenol	1572	1564	2091	0.5	1.2	1.4	0.3	0.6	-	RI, MS
76	Caryophyllène oxide	1578	1582	1943	tr	0.1	0.3	0.1	tr	0.5	RI, MS
77	Tridécanol	1580	1586	2034	-	tr	tr	tr	tr	6.4	RI,MS,Ref2
78	Viridiflorol	1590	1586	2071	0.1	0.9	0.3	0.5	0.2	-	RI, MS
79	Copabornéol	1592	1595	2142	0.5	0.8	0.3	1.5	0.1	1.4	RI, MS
80	Guaia-6,10(14)-diene-4 $\beta$ -ol	1610	1609	2119	1.1	2.5	2.1	6.6	0.5	0.9	RI,MS,Ref1
81	epi-Cubenol	1621	1623	2046	0.2	0.3	0.2	0.4	0.3	0.9	RI, MS

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

82	Cubenol	1630	1631	2001	0.5	0.2	0.2	0.3	tr	tr	RI, MS
83	$\tau$ -Muurolol	1633	1635	2156	0.5	0.7	0.3	0.6	0.7	1.4	RI, MS
84	$\alpha$ -Cadinol	1643	1644	2212	0.5	0.7	0.5	0.6	0.3	0.9	RI, MS
85	2-methyl Butyrate d'isochavicol	1651	1654	2256	0.1	0.3	0.2	0.2	-	0.4	RI, MS
86	(Z)- $\alpha$ -Santalol	1669	1665	2306	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	-	RI, MS
87	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	1671	1672	2346	0.1	0.3	0.2	0.1	0.5	1.3	RI, MS
88	(E,Z)-Farnesol	1685	1680	2313	tr	0.2	0.1	0.1	0.1	3.1	RI, MS
89	Heptadécane	1700	1699	1698	tr	0.3	0.3	0.1	0.1	0.5	RI, MS
90	acide Tétradécanoïque	1761	1756	2651	tr	0.1	0.2	0.2	-	1.7	RI,MS,Ref2
91	Neophytadiène	1807	1806	1920	0.1	0.2	1.7	0.1	0.1	1.3	RI,MS,Ref1
92	Diisobutyl ester	1826	1826	2525	0.2	0.1	0.4	tr	tr	0.9	RI,MS,Ref2
93	6,10,14Triméthylpentadécanone	1845	1842	2125	0.2	0.1	0.4	tr	0.1	1.8	RI,MS,Ref2
94	acide Hexadécanoïque	1951	1956	2821	0.1	0.2	tr	tr	0.2	3.1	RI,MS,Ref1
95	Eicosane	2000	2000	1998	tr	0.1	tr	tr	0.2	18.6	RI, MS
96	(Z)-Phytol	2080	2085	2611	0.2	0.2	0.8	0.1	0.3	-	RI, MS
97	(E)-Phytol	2114	2119	2568	0.3	0.2	1.9	tr	0.1	-	RI, MS
98	Tricosane	2300	2302	2299	0.1	0.2	tr	tr	0.1	1.5	RI, MS
99	Pentacosane	2500	2498	2501	0.1	0.1	0.2	0.1	0,2	2.7	RI, MS
Total identification %					90.9	93.7	93.6	98.7	95.3	90.1	
Rendement en huile essentielle %					0.2	0.04	0.03	0.09	0.12	0.02	
Monoterpènes hydrocarbonés					61.6	52,0	54.5	58.5	57.1	1.5	
Monoterpènes oxygénés					8.2	10.2	5.3	9.2	16.5	9.1	
Sesquiterpène hydrocarbonés					7.2	6.6	12.2	7.5	11.4	3.8	
Sesquiterpènes oxygénés					4.4	9.6	7,0	12.3	4.3	14.4	
Phenylpropanoïdes					5.4	2.2	2.5	7,0	1.9	3.3	
Diterpènes oxygénés					0.5	0.4	2.7	0.1	0.4	-	
Diterpènes hydrocarbonés					0.1	0.2	1.7	0.1	0.1	1.3	
Composés Non-terpenique					3.5	12.5	7.7	4,0	3.6	56.7	
Composés Hydrocarbonés					70.7	62.3	72.2	67.8	70.5	30.3	
Composés Oxygénés					20.2	31.4	21.4	30.9	24.8	59.8	

<sup>a</sup> L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) .

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup> indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp).

La quantification a été réalisée en utilisant les FR par rapport à tridécane comme étalon interne, g/100 g: concentration exprimée en g/100 g d'huile essentielle sont donnés sur la colonne apolaire à l'exception des composants avec Ria identiques (les concentrations sont indiquées sur la colonne polaire) , tr = trace (<0,05 g/100 g), f RI: Indices de rétention; MS: spectrométrie de masse en mode d'impact électronique; Réf1,: composés identifiés à partir des données de la littérature König et al, 2001, Ref2,: composés identifiés à partir des données de la littérature NIST Chemistry WebBook.



En nous déplaçant du bas vers le sommet de la plante, nous avons constaté que les concentrations relatives des composés nonterpenic diminuent comme suit : 56,7 g/100 g dans les racines, 12,5 g/100 g dans les tiges, 7,7 g/100 g dans le feuilles, 4,0 g/100 g dans les fleurs, puis 3,6 g/100 g dans les ombelles.

### **III.2. Analyse des composés volatiles par Edt-MEPS**

#### **III.2.1. Conditions Edt-MEPS**

Le dispositif MEPS (Supelco) recouvert avec du divinylbenzène/Carboxen/polydiméthylsiloxane (DVB / CAR / PDMS, 30 um) était utilisé pour l'extraction des substances volatiles de la plante. L'optimisation des conditions était réalisée en utilisant des organes frais de la plante (1 g dans un flacon de 20 ml) basé sur la somme de la superficie totale des pics obtenu par CPG -FID.

La Température, le temps d'équilibrage et le temps d'extraction étaient sélectionnés après neuf expériences combinant quatre températures (30, 50, 70 et 90 ° C), soit quatre fois l'équilibrage (20, 40, 60 et 80 min) et trois fois l'extraction (15, 30 et 45 min).

Après échantillonnage, la fibre MEPS était insérée dans les orifices d'injection de la CPG et CPG-SM pour la désorption des composants volatiles (5 min), à la fois en utilisant le mode d'injection splitless. Avant l'échantillonnage, chaque fibre était remise en état pendant 5 min dans le port d'injection CPG à 260 °C.

Les analyses Edt-MEPS étaient effectuées en trois fois. Le coefficient de variation (1,6% <CV <17,8%) calculé sur la base de la superficie totale obtenue à partir du signal FID pour les échantillons, indique que la méthode Edt-MEPS a produit des résultats fiables.

#### **III.2.2. Analyse Edt-MEPS**

Les composés volatils émis par les racines, les feuilles, les tiges, les ombelles, et les fleurs du *D. muricatus*, étaient étudiés en utilisant la Edt-MEPS.

L'optimisation des paramètres d'échantillonnage Edt-MEPS a été réalisée en utilisant le matériel végétal frais sur la base de la somme de la superficie totale des pics obtenu par CPG-FID. Le montant maximum de la superficie totale des pics a été obtenu pour une température d'extraction de 70 ° C, un temps d'équilibre de 60 min, et un temps d'extraction de 30 min.

**Tableau III.12 : Composés volatils du *D. muricatus* extraits par Edt-MEPS.**

N°	Composés <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	Organes séparés					
				Parties aeriennes	Tiges	Feuilles	Fleurs	Ombelles	Racines
<b>1a</b>	Heptane	700	700	2.6±0.07	7.9±0.28	1.3±0.11	1.1±0.15	0.3±0.04	0.2±0.01
<b>1b</b>	3-Methyl butanol	709	705	0.3±0.01	0.7±0.01	0.2±0.01	0.4±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01
<b>1c</b>	3-Methyl-pentan-2-ol	754	760	0.4±0.14	0.4±0.01	0.2±0.01	0.5±0.09	0.4±0.01	0.7±0.01
<b>1d</b>	Hexanal	780	771	0.2±0.01	0.4±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.3±0.06	1.4±0.07
<b>1</b>	Nonane	900	898	0.5±0.07	0.5±0.02	1.1±0.22	0.4±0.01	tr	0.1±0.01
<b>1e</b>	Artemisiatriène	923	921	0.2±0.01	-	-	0.3±0.06	0.1±0.01	-
<b>2</b>	$\alpha$ -Thujène	932	923	0.1±0.01	-	0.1±0.01	0.5±0.04	0.1±0.01	-
<b>3</b>	$\alpha$ -Pinène	936	931	13.2±0.74	8.1±0.36	16.1±0.89	13.1±0.97	15.5±1.1	8.7±0.14
<b>4</b>	Camphene	950	944	0.2±0.01	tr	0.1±0.01	0.3±0.01	0.3±0.08	0.4±0.01
<b>5a</b>	Butyrate de butyl	970	966	0.2±0.01	-	0.2±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01
<b>6</b>	Sabinène	973	967	2.9±0.21	1.4±0.14	2.3±0.45	6.5±0.33	1.5±0.46	0.3±0.01
<b>7</b>	$\beta$ -Pinène	978	970	0.9±0.06	0.7±0.02	1.2±0.56	1.1±0.51	1.1±0.13	1.6±0.21
<b>8</b>	Myrcène	987	980	2.9±0.13	1.5±0.14	3.2±0.21	2.9±0.12	3.9±0.66	0.1±0.01
<b>8a</b>	Yomogi alcohol	991	981	0.4±0.07	0.7±0.01	0.4±0.01	0.4±0.01	0.4±0.05	-
<b>9</b>	$\alpha$ -Phellandrène	1002	997	1.5±0.13	-	3.1±0.16	2±0.29	1.1±0.29	-
<b>9a</b>	3-Carene	1010	1005	0.1±0.01	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.4±0.01
<b>10</b>	$\alpha$ -Terpinène	1013	1008	0.8±0.06	-	0.3±0.01	2.8±0.22	0.2±0.01	0.1±0.01
<b>11</b>	p-Cymène	1015	1012	3.2±0.32	3.4±0.12	3.1±0.51	3.4±0.51	3.2±0.11	9.1±0.76
<b>12</b>	Limonène	1025	1022	22.4±1.28	13.3±0.56	30.6±0.99	19.1±0.77	28.1±0.82	6.9±0.35
<b>13</b>	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1029	1025	0.2±0.01	0.4±0.01	0.1±0.01	0.2±0.02	0.1±0.01	0.3±0.01
<b>13a</b>	(E)- $\beta$ -Ocimène	1041	1031	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.02	0.2±0.01	0.1±0.01	0.3±0.01
<b>14</b>	$\gamma$ -Terpinène	1051	1049	3.2±0.09	4.1±0.54	2.5±0.22	5.1±0.55	1.3±0.35	1.2±0.01
<b>14a</b>	Octanol	1063	1052	0.3±0.01	tr	0.6±0.01	0.4±0.08	0.3±0.05	-
<b>16</b>	Nonan-2-one	1070	1073	0.6±0.07	0.7±0.02	0.5±0.01	0.6±0.08	0.6±0.09	0.2±0.01
<b>17</b>	p-Cymenène	1075	1077	0.3±0.06	-	0.2±0.01	0.4±0.06	0.7±0.03	3.1±0.13
<b>18</b>	Terpinolène	1082	1079	0.7±0.06	0.6±0.01	0.9±0.07	1.3±0.23	0.4±0.01	10.2±0.86
<b>19</b>	Linalool	1083	1085	1.4±0.08	3.2±0.28	0.5±0.01	1.1±0.29	0.9±0.1	0.2±0.01
<b>19a</b>	$\alpha$ -Thujone	1089	1086	0.5±0.04	1.8±0.09	tr	0.5±0.02	0.4±0.02	0.1±0.01
<b>20</b>	Undecane	1100	1100	8.9±0.76	16.9±0.89	6.1±0.38	3.6±0.14	7.4±0.69	7.2±0.26
<b>20a</b>	Acetate de 3-Octyl	1113	1103	1.8±0.12	0.7±0.06	0.2±0.01	0.3±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01
<b>21a</b>	Camphor	1123	1119	1.1±0.07	2.9±0.16	0.7±0.01	0.6±0.06	0.2±0.01	0.5±0.01
<b>22</b>	trans-Pinocarveol	1126	1120	0.4±0.01	0.7±0.01	0.3±0.02	0.4±0.01	0.6±0.02	0.1±0.01
<b>22a</b>	Citronellal	1129	1130	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.4±0.05	-
<b>22b</b>	cis-Verbenol	1132	1132	0.1±0.01	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	-
<b>24</b>	Pinocarvone	1137	1135	0.1±0.01	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.02	0.7±0.01
<b>25</b>	Bornéol	1150	1149	0.5±0.08	0.9±0.01	0.4±0.01	0.3±0.04	0.4±0.01	-
<b>26</b>	Cryptone	1160	1159	0.5±0.06	0.5±0.01	0.5±0.08	0.4±0.01	0.7±0.09	3.8±0.11
<b>27</b>	Terpinène-4-ol	1164	1160	1.4±0.18	2.1±0.43	0.9±0.06	1.8±0.36	1.1±0.15	0.1±0.01
<b>27a</b>	Myrtenal	1172	1163	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.3±0.02
<b>27b</b>	Estragole	1175	1169	1.1±0.09	1.1±0.58	1.3±0.29	1.7±0.12	0.6±0.08	-
<b>29</b>	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1177	0.4±0.05	0.5±0.04	0.4±0.08	0.4±0.03	0.5±0.01	0.2±0.01
<b>29a</b>	Verbénone	1184	1178	0.3±0.01	0.7±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	-
<b>31</b>	Décanal	1188	1185	0.1±0.01	-	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	-
<b>33</b>	Citronellol	1213	1211	1.1±0.14	1.1±0.22	1.1±0.33	0.9±0.06	1.5±0.23	0.1±0.01
<b>34</b>	Carvone	1214	1215	0.7±0.07	1.1±0.09	0.5±0.01	0.6±0.04	0.6±0.02	0.1±0.01
<b>35</b>	Pulegone	1215	1216	0.3±0.01	0.8±0.02	0.2±0.01	0.2±0.01	0.1±0.01	-

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

37	Geraniol	1235	1235	0.2±0.01	tr	0.1±0.01	0.4±0.02	0.1±0.01	0.8±0.05
38	trans-Myrtanol	1240	1236	0.1±0.01	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.3±0.01	-
38a	Geranial	1244	1239	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	tr	-
39	Acetate cis-Chrysanthenyl	1253	1242	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	-
42	Acetate de bornyl	1270	1266	0.6±0.05	1.2±0.11	0.4±0.05	0.5±0.06	0.6±0.04	9.7±0.55
43	Undécan-2-one	1273	1270	0.6±0.08	0.8±0.04	0.6±0.08	0.4±0.03	0.5±0.01	0.3±0.01
44	Acétate de Trans-Sabinyll	1278	1271	5.1±0.47	3.8±0.26	2.6±0.12	3.5±0.38	9.6±0.53	
47a	Acétate de neryl	1342	1335	2.0±0.31	2.4±0.36	3.4±0.65	1.3±0.35	0.9±0.1	0.3±0.01
48	δ-Elemène	1340	1337	0.3±0.02	0.7±0.06	0.3±0.05	0.1±0.01	tr	0.1±0.01
49	Acétate de gèranyl	1362	1360	0.1±0.01	tr	tr	0.2±0.01	tr	0.2±0.01
50	Undécanol	1363	1365	0.1±0.01	tr	tr	tr	tr	1.9±0.01
51	α-Copaène	1379	1377	0.7±0.01	1.1±0.12	0.4±0.02	0.6±0.03	0.9±0.08	0.4±0.01
51a	Daucene	1380	1379	0.5±0.02	0.9±0.08	0.1±0.01	0.2±0.01	0.7±0.01	0.7±0.06
54	Dodécanal	1389	1395	0.2±0.01	0.3±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	1.3±0.01
54a	Tétradécane	1400	1399	0.1±0.01	0.2±0.02	0.1±0.01	0.1±0.01	tr	-
56	trans-Caryophyllène	1424	1422	2.3±0.23	1.4±0.13	3.1±0.25	3.8±0.26	1.2±0.15	1.9±0.18
58	β-Copaène	1430	1430	0.3±0.02	0.4±0.01	0.6±0.05	0.3±0.01	0.3±0.01	0.4±0.01
59	α-Humulène	1455	1450	0.4±0.05	-	0.1±0.01	0.9±0.08	0.1±0.01	0.1±0.01
61	Dodécanol	1472	1468	tr	tr	tr	tr	tr	3.4±0.28
62	γ-murolène	1473	1471	1.3±0.13	0.5±0.01	0.6±0.01	1.5±0.42	1.9±0.21	4.3±0.16
63	Germacrène D	1479	1476	0.4±0.04	0.5±0.06	0.2±0.01	0.4±0.02	0.3±0.01	0.2±0.01
64	trans-β-Bergamotène	1480	1475	tr	tr	tr	tr	tr	0.5±0.03
65	6-epi-shyobunone	1481	1480	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.2±0.01	0.2±0.01	-
65a	β-Selinène	1486	1481	0.2±0.01	0.2±0.01	0.2±0.02	0.1±0.01	0.2±0.03	0.5±0.02
69	Shyobunone	1500	1501	0.1±0.01	tr	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.7±0.01
70	δ-Cadinène	1520	1515	0.6±0.04	0.5±0.01	0.3±0.04	0.1±0.01	1.3±0.16	0.9±0.07
71	(E)-α-Bisabolène	1531	1526	1.1±0.31	0.5±0.02	1.4±0.12	0.9±0.1	1±0.45	0.4±0.01
72	Isobutyrate (E)-Anyl	1541	1538	0.3±0.05	tr	0.3±0.01	0.9±0.06	0.1±0.01	0.1±0.1
76	oxyde de Caryophyllène	1578	1582	0.2±0.01	-	0.1±0.01	0.4±0.01	0.1±0.01	0.7±0.01
77	Tridécanol	1580	1586	tr	tr	tr	tr	tr	1.1±0.07
87	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	1671	1672	tr	-	tr	tr	tr	0.6±0.01
89	Heptadécane	1700	1699	0.4±0.13	-	1.3±0.65	0.2±0.01	0.2±0.01	-
% d'identification				97.8	95.4	99.1	94.3	97.6	90.6
Superficie totale CPG-FID 10 <sup>5</sup>				103	22	154	108	107	68
Monoterpènes hydrocarbonés				52.9	33.6	64.1	59.3	57.8	42.8
Monoterpènes oxygénés				20.6	25.6	14.4	16	20.5	17.6
Sesquiterpène hydrocarbonés				8.1	5.8	7.2	8.7	7.2	10.4
Sesquiterpènes oxygénés				0.4	-	0.3	0.7	0.4	2.0
Phenylpropanoïdes				0.3	-	0.3	0.9	0.1	0.1
Composés Non-terpénique				15.5	30.4	12.8	8.7	11.6	17.7
Composés Hydrocarbonés				73.7	65.5	82.2	73.6	73.7	60.7
Composés Oxygénés				24.1	29.9	16.9	20.7	23.9	29.9

<sup>a</sup> ordre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). Les nombres correspondent à ceux du tableau 12, Les composants volatils identifiés exclusivement par les fraction HS ont été affectés par une lettre, <sup>b</sup> les indices de retentions de la littérature sur la colonne apolaire (LALR) signalés par König et al., 2001., <sup>c</sup> indices de rétention sur la 1 colonne apolaire Rtx- (RIA), <sup>d</sup> les pourcentages d es moyens de trois analyses obtenus par CPG-FID (sur RTX-1: colonne apolaire) dans les paramètres HS-SPME optimisées: température: 70 ° C, temps d'équilibre: 120 min, le temps d'extraction: 30 min.

L'identification des 74 composants a été effectuée en comparant leur SM et leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque "Arômes", et quatre composants furent identifiés en comparant leurs données SM et leurs indices de rétention polaires avec ceux rapportés dans la littérature et dans les bibliothèques commerciales.

En ce qui concerne la contribution de l'organe à l'empreinte aromatique de la plante, il convient de noter que les composés volatils étaient plus abondants dans les feuilles que dans les autres parties de la plante. Notre analyse a montré que la composition chimique des fractions MEPS obtenues à partir de différents organes, était qualitativement similaire, mais différente par les quantités relatives des principaux composants (Tableau III.12).

Par rapport à l'huile du *D. muricatus*, les principaux composés volatils émis par les plantes étaient les composés hydrocarbonés (de 60,7 à 82,2 %) pour tous les organes étudiés. Plus précisément, les monoterpènes d'hydrocarbonés (33,6%-64,1 %) et les composés hydrocarbonés non terpéniques (6.4 %-25.5 %) étaient supérieurs à ceux des composés oxygénés, qui n'ont jamais représenté plus de 23,9 %.

Les principaux composés volatiles des racines étaient : le terpinolène (10,2 %), l'acétate de bornyle (9,7 %), le p-cymène (9,1 %),  $\alpha$ -pinène (8,7 %), et undécane (7,2 %). Les quantités relatives de terpinolène (0,4-1,3 %) et p-cymène (3,1-3,4 %) étaient plus faibles dans les organes aériens, et le principal volatil émis par les feuilles, les fleurs et les ombelles était le limonène (30,6 %, 19,1 %, et 28,1 %, respectivement). Dans les tiges, le limonène (13,3 %) était présent en quantités inférieures à celles de l'undecane (16,9 %), qui était identifiée comme un composé majoritaire. En outre, l'undecane était produit en quantités appréciables dans les feuilles, les fleurs et les ombelles (6,1 %, 3,6 % et 7,4 %, respectivement). Ils étaient accompagnés par  $\alpha$ -pinène, qui représentait 8,1 % dans les tiges et toujours plus de 13.1 % dans les feuilles, les fleurs et les ombelles. Avec ces composés hydrocarbonés, nous avons noté la présence de l'acétate de trans sabinyl, qui avait une concentration relativement élevée en ombelles (9,6 %) que dans les autres organes aériens (2,6-3,8 %) (Tableau III.12).

### III.2.3. Comparaison entre les deux méthodes

Les différences chimiques observées entre les huiles essentielles et les fractions volatiles extraites en utilisant HD et MEPS, respectivement, peuvent être expliquées par le fait que la première technique est basée sur l'extraction quasi-totale des volatiles de la plante, et cette dernière technique est contrôlée par une étape d'équilibre solide/gaz. Pendant l'hydrodistillation, les composés les plus volatiles en composés solubles dans l'eau sont perdus dans la phase gazeuse et l'hydrolat, respectivement, alors qu'avec l'extraction MEPS, c'est l'affinité des fibres de chaque composé qui surveille le prélèvement des matières volatiles.

### IV. Huiles essentielles de *D. carota ssp. hispanicus* Gouan :

Les racines et les parties aériennes du *D. carota ssp. hispanicu* étaient recueillis dans 10 stations de l'ouest d'Algérie.

**Tableau III.13:** Informations concernant les lieux de récolte du *D. carota ssp. hispanicus*

Echantillons	Lieux	Latitudes (N)	Longitudes (E)	Altitudes (m)	Nature Des sols	Climats
S1	Kihal	35° 12' 16"	1° 11' 46"	490	Sol calcaire riche en composés organique (sol agricole)	Sec
S2	Amieur	34° 02' 05"	1° 14' 17"	319		
S3	Bensekrane	34° 04' 49"	1° 13' 10"	263		
S4	Saf Saf	34° 53' 58"	1° 16' 49"	599		
S5	Mansourah	34° 51' 27"	1° 20' 50"	907	Sol fersiallitique rouge à caractère vertique, possède une très bonne teneur en eau	Humide
S6	Beni Boublene	34° 51' 41"	1° 20' 15"	908		
S7	Lalla Setti	34° 51' 45"	1° 18' 56"	1030		
S8	Mafrouche	34° 51' 00"	1° 17' 48"	1140	Sol fersiallitique brun Prend naissance sur roche mère calcaire. Riche en Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> et K <sup>+</sup>	Humide et Froid
S9	Hafir	34°49'60"	1° 22' 0"	1100		
S10	Terny	34° 47' 44"	1° 21' 32"	1220	Sol dur, riche en Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> et K <sup>+</sup>	Humide et Froid

La nature des sols et le climat ont été reportés par le Ministère Algérien de l'Agriculture et Développement Rural, 2010 [11].

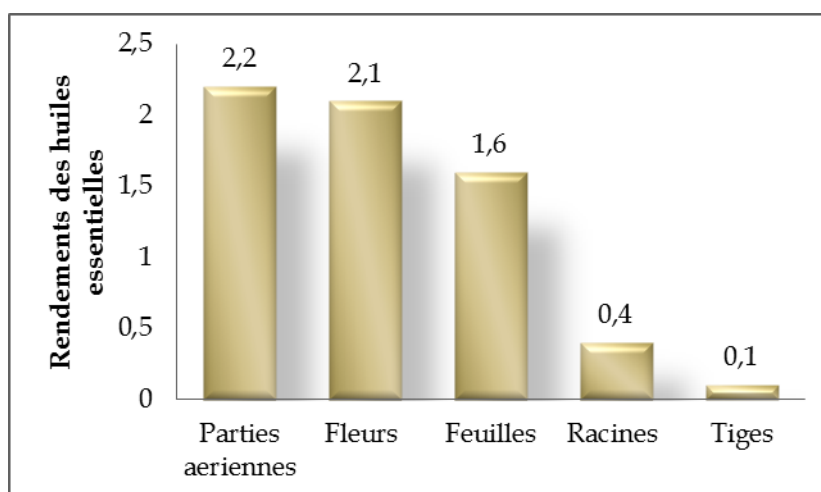
Les informations concernant les lieux de récolte tels que les noms des lieux, latitudes, longitudes, la nature des sols et les climats sont consignés dans le tableau III.13. Les

endroits de récolte étaient distribués sur deux zones différentes selon l'altitude, la nature des sols et les climats :

La zone 1 comprend Kihal, Amieur, Besekrane et Saf-Saf (S1, S2, S3 et S4 respectivement), quatre sites de montagne moyenne (319 à 599 m) avec un sol calcaire riche en matière organique et les climats secs (Tableau III.13). La zone 2 comprend Mansourah, Beni Boublene, Lalla Setti, Mafrouche, Hafir et Terny (S5, S6, S7, S8, S9 et S10 respectivement), six régions montagneuses (907-1220 m) avec des sols riches en minéraux et des climats humides et plus froids [12].

#### IV.1. Extraction des huiles essentielles

Les parties aériennes fraîches séparées (feuilles, tiges et fleurs) et les racines étaient soumises à l'hydrodistillation pendant 5h en utilisant un appareil de type Clevenger selon la Pharmacopée européenne [13]. Les rendements des huiles essentielles étaient exprimés en % (p/p) par la masse de la matière végétale séchée. Le Matériel végétal frais était séché pendant cinq jours à la température ambiante, la teneur en eau était proche de 82,5 % de la masse de la plante.



**Figure III.6:** Rendements des huiles essentielles des différents organes de *D. carota ssp. hispanicus* de la région de Hafir (S9)

### III.2. Compositions chimiques des huiles essentielles du *D. carota ssp. hispanicus*

Les compositions chimiques des huiles essentielles des racines, et des parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) du *D. carota ssp. hispanicus* Gouan récoltées dans la station de Hafir (S9) étaient étudiées par CPG-Ir et CPG-SM. Les pourcentages suivant : 99,1 %, 97,4 %, 96,1 %, 95,0 %, 98,9 % étaient respectivement identifiés dans les huiles essentielles des racines, parties aériennes, les feuilles, les tiges et les fleurs, respectivement (Tableau III.16). Tous les composants étaient identifiés par comparaison de leur SM et CPG-Ir avec ceux de la bibliothèque "Arômes", à l'exception de cinq éléments qui étaient identifiés par comparaison avec des données spectrales et les indices de rétention de la littérature (Tableau III.16). Parmi eux, 28 sesquiterpènes, 20 monoterpènes, 14 composés aliphatiques, 4 composés phénoliques et un composé diterpéniques étaient identifiés.

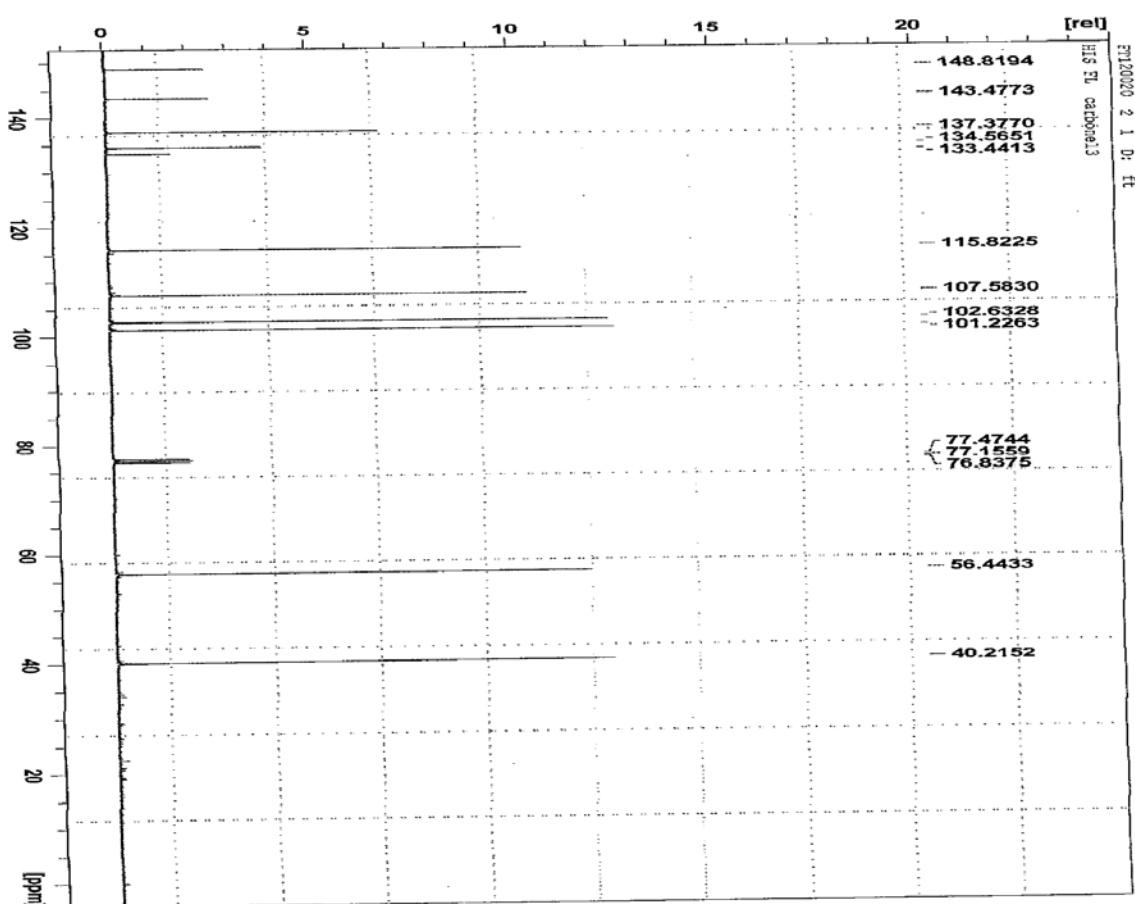


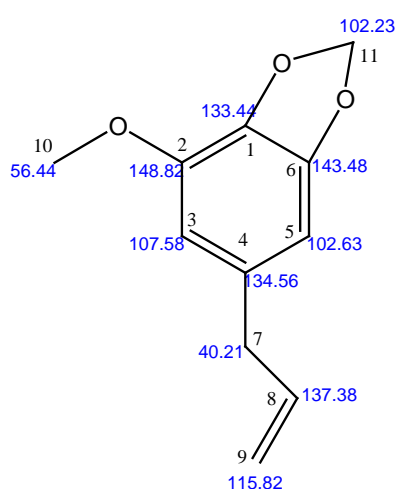
Figure III.7 : Spectre RMN <sup>13</sup>C de la myristicine.

Les Phénylpropanoïdes étaient la classe dominante des composés des huiles essentielles du *D. carota ssp. hispanicus* qui représentait 67,2 à 96,9 %. Bien que la myristicine a été identifiée avec une probabilité significative sur la base des propositions des bibliothèques commerciales, ce composé a fait l'objet d'une confirmation par RMN  $^{13}\text{C}$ .

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III.7) acquis de l'huile de parties aériennes d'un échantillon de Kihal (86,2 %) a présenté onze signaux. Tous les carbones ont été repérés. Les variations de déplacements chimiques entre les valeurs mesurées dans l'huile et celles décrites dans la littérature [14] n'excèdent pas 0,9 ppm (Tableau III.15).

**Tableau III.15 :** Structure et données spectrales ( $\delta$ , ppm dans  $\text{CDCl}_3$ ) en RMN du Carbone-13 de la myristicine

N°	RMN $^{13}\text{C}$				
	Expérimentale	Théorique		Expérimentale	Théorique
1	133.44 C	133.58	7	40.21 $\text{CH}_2$	40.23
2	148.82 C	148.94	8	137.38 CH	137.40
3	107.56 CH	107.91	9	115.82 $\text{CH}_2$	115.82
4	134.56 C	134.65	10	56.44 $\text{CH}_3$	56.59
5	102.63 CH	102.71	11	102.23 $\text{CH}_2$	101.22
6	143.48 C	143.57			



**Figure III.8 :** structure chimique de la myristicine



**Tableau III.16:** Composition de l'huile essentielle des racines, des parties aériennes, des feuilles, tiges et fleurs du *D. carota* ssp. *hispanicus*

N°	Composés <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	RF <sup>e</sup>	<i>D. carota</i> ssp. <i>hispanicus</i> <sup>f</sup>					Identification <sup>g</sup>
						Racine s	Parties aériennes	tiges	Feuilles	Fleurs	
1	Pentan-3-one	654	652	954	1.40	-	tr	-	Tr	-	RI, MS
2	Heptane	700	700	700	1.01	-	0.1	-	0.1	-	RI, MS
3	2-Methyl pentan-3-one	750	747	991	1.40	-	0.1	0.1	Tr	-	RI, MS
4	Hexanal	770	771	1049	1.40	-	tr	0.1	Tr	-	RI, MS
5	(E)-2-Hexenal	832	830	1204	1.40	-	0.1	0.1	Tr	tr	RI, MS
6	$\alpha$ -Thujène	932	925	1014	1.01	-	0.3	4.3	0.5	0.1	RI, MS
7	$\alpha$ -Pinène	936	931	1016	1.01	-	tr	0.1	0.2	-	RI, MS
8	Thuja-2,4(10)-diene	946	943	1115	1.01	-	0.1	-	Tr	-	RI, MS
9	Camphène	950	947	1062	1.01	-	0.1	tr	-	-	RI, MS
10	6-Methylhept-5-en-2-one	966	961	1325	1.40	-	tr	tr	-	-	RI, MS
11	Sabinène	973	968	1111	1.01	-	tr	tr	-	0.1	RI, MS
12	$\beta$ -Pinène	978	974	1102	1.01	-	0.2	1.2	0.4	0.2	RI, MS
13	2-Pentylfuran	981	978	1353	1.59	-	0.1	tr	Tr	-	RI, MS, Ref
14	Myrcène	987	980	1152	1.01	-	0.3	0.2	-	tr	RI, MS
15	2-methyl Butyrate d'isobutyl	994	991	1102	1.55	-	0.2	tr	Tr	-	RI, MS
16	$\alpha$ -Phellandrène	1002	997	1155	1.01	-	0.1	0.2	0.2	-	RI, MS
17	$\alpha$ -Terpinène	1008	1011	1267	1.01	-	0.1	1.9	2	0.1	RI, MS
18	p-Cymène	1011	1015	1256	1.01	-	0.1	0.9	Tr	tr	RI, MS
19	Limonène	1025	1022	1195	1.01	-	0.8	0.4	0.3	tr	RI, MS
20	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1024	1027	1221	1.01	-	1.1	2.6	Tr	1.1	RI, MS
21	(E)- $\beta$ -Ocimène	1034	1037	1237	1.01	-	tr	0.4	Tr	0.1	RI, MS
22	$\gamma$ -Terpinène	1051	1051	1233	1.01	-	0.2	0.2	Tr	-	RI, MS
23	m-Tolualdehyde	1053	1055	1575	1.40	-	0.1	tr	-	0.1	RI, MS
24	4-Methyl benzaldehyde	1060	1064	1591	1.40	-	0.2	tr	-	0.1	RI, MS
25	Terpinolène	1082	1079	1274	1.01	-	0.3	0.1	-	-	RI, MS
26	Nonanal	1076	1081	1387	1.40	-	tr	tr	0.1	tr	RI, MS
27	Isovalerate de 3-Methyl butyl	1098	1090	1267	1.55	-	tr	0.2	Tr	tr	RI, MS
28	Isovalerate de 2-Methyl butyl	1102	1097	1284	1.55	-	0.3	0.2	Tr	tr	RI, MS
29	oxyde (Z)-Ocimène	1115	1115	1365	1.59	-	tr	tr	Tr	tr	RI, MS, Ref
30	allo-Ocimène	1120	1121	1359	1.01	-	tr	tr	Tr	-	RI, MS
31	oxyde (E)-Ocimène	1125	1127	1377	1.59	-	0.1	tr	Tr	-	RI, MS, Ref
32	(E)-2-Nonenal	1136	1134	1522	1.40	-	0.1	tr	Tr	-	RI, MS
33	Lyratol	1150	1148	1769	1.34	-	0.1	-	0.1	-	RI, MS
34	(E)-2-Nonen-1-ol	1153	1152	1672	1.34	-	0.2	tr	-	tr	RI, MS
35	(E)-2-Décenal	1240	1237	1646	1.40	-	tr	0.5	Tr	-	RI, MS
36	Acetate de bornyl	1270	1265	1571	1.55	-	0.1	0.3	0.4	-	RI, MS
37	$\alpha$ -Longipinène	1360	1357	1465	1.0	-	tr	tr	Tr	tr	RI, MS
38	$\alpha$ -Ylangène	1376	1371	1470	1.0	-	0.3	0.2	-	tr	RI, MS
39	$\alpha$ -Copaène	1379	1382	1457	1.0	-	0.1	0.2	Tr	0.1	RI, MS
40	$\beta$ -Bourbonène	1386	1385	1510	1.0	-	0.2	-	Tr	tr	RI, MS

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

41	β-Ylangène	1420	1413	1560	1.0	-	0.5	1.1	0.4	0.3	RI, MS
42	(E)-β-Caryophyllène	1421	1416	1579	1.0	-	0.2	tr	-	tr	RI, MS
43	(E)-α-Bergamotène	1434	1430	1572	1.0	-	0.2	0.2	0.1	tr	RI, MS
44	α-Himachalène	1450	1447	1630	1.0	-	0.1	0.2	0.1	0.1	RI, MS
45	α-Humulène	1455	1460	1660	1.0	-	0.4	tr	0.2	0.1	RI, MS
46	α-Curcumène	1473	1468	1763	1.0	tr	0.1	1.0	0.9	0.1	RI, MS
47	Germacrène D	1479	1477	1704	1.0	0.3	3.1	3.0	2.9	6.4	RI, MS
48	Zingiberène	1489	1489	1717	1.0	-	0.3	0.3	0.4	0.2	RI, MS
49	Bicyclodermacrène	1494	1495	1720	1.0	-	0.3	0.2	-	0.7	RI, MS
50	Myristicine	1489	1499	2186	1.25	16.6	73.2	66.9	80.2	83.8	RI, MS
51	δ-cadinène	1507	1503	1742	1.0	-	0.2	1.6	0.2	0.2	RI, MS
52	Elemicine	1518	1520	2232	1.25	-	0.3	0.1	Tr	0.6	RI, MS
53	(E)-α-Bisabolène	1531	1526	1776	1.0	0.1	0.1	0.1	Tr	0.1	RI, MS
54	Elemol	1541	1539	2070	1.34	-	0.4	0.1	0.2	tr	RI, MS
55	Epiglobulol	1558	1550	2013	1.34	1.4	5.1	2.1	3.1	1.2	RI, MS
56	Epoxy salvia-1,5-4(14)-ène	1560	1562	1902	1.55	-	0.1	1.4	0.1	0.2	RI, MS
57	Spathulenol	1572	1568	2110	1.34	-	0.2	0.3	0.3	tr	RI, MS
58	Hydrate de cis-Sesquisabinène	1586	1566	2099	1.34	0.1	0.3	0.1	0.1	tr	RI, MS
59	oxyde de Caryophyllène	1578	1574	1937	1.59	-	0.4	0.5	Tr	-	RI, MS
60	4(14)-Salvialène-1-one	1592	1585	2109	1.31	-	0.5	0.1	0.1	0.1	RI, MS, Ref
61	Viridiflorol	1592	1594	2083	1.34	0.3	2.3	0.5	0.7	0.3	RI, MS
62	Guaiol	1593	1589	2090	1.34	-	0.6	0.1	0.1	tr	RI, MS
63	Aromadendrene oxide II	1623	1620	1996	1.59	-	0.1	0.3	0.1	0.1	RI, MS
64	τ-Muurolol	1633	1626	2138	1.34	-	0.1	0.1	0.1	0.3	RI, MS
65	τ-Cadinol	1633	1632	2160	1.34	-	0.8	0.4	0.1	0.3	RI, MS
66	α-Cadinol	1643	1641	2223	1.34	-	0.2	0.8	0.1	0.1	RI, MS
67	Apiole	1649	1646	2402	1.25	80.3	1.1	0.2	0.1	1.7	RI, MS, Ref
68	(E)-Phytol	2114	2015	2568	1.34	-	0.1	tr	0.1	tr	RI, MS
<b>% didentification</b>						<b>99.1</b>	<b>97.4</b>	<b>96.1</b>	<b>95.0</b>	<b>98.9</b>	
<b>Rendements d'huile essentielle %</b>						<b>0.4</b>	<b>2.2</b>	<b>0.1</b>	<b>1.6</b>	<b>2.1</b>	
% composés Hydrocarbonés						0.4	9.9	20.6	8.8	10.0	
% Monoterpènes hydrocarbonés						-	3.7	12.5	3.6	1.7	
% Sesquiterpènes hydrocarbonés						0.4	6.1	8.1	5.2	8.3	
% composés hydrocarbonés Non terpénique						-	0.1	-	-	-	
% composés oxygénés						98.7	87.5	75.5	86.2	88.9	
% monoterpènes oxygénés						-	0.6	1.2	0.5	-	
% sesquiterpènes oxygénés						1.8	11.1	6.8	5.1	2.6	
% composés oxygénés Non terpénique						-	0.8	0.3	0.2	-	
% diterpènes oxygénés						-	0.1	-	0.1	-	
% Phénylpropanoïdes						96.9	74.9	67.2	80.3	86.3	

<sup>a</sup> ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). <sup>b</sup> indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (LALR) signalés par König et al. 2001. <sup>c</sup> indices de rétention sur le RTX 1 colonne apolaire (RIA). <sup>d</sup> indices de rétention sur la colonne Rtx-Wax polaire (RIP). <sup>e</sup> facteurs de réponse (RF). <sup>f</sup> Exemple: S9. Hafir. Pourcentages (moyens de trois analyses). g RI: Indices de rétention; MS: spectrométrie de masse en mode d'impact électronique; Réf.: composés identifiés à partir des données de la littérature König et al .. 2001.

Cependant, deux types d'huiles essentielles étaient produits par *D. carota ssp. hispanicus* en fonction de la partie aérienne ou souterraine de la plante. L'apiole (80,3 %) était le composant majoritaire suivie par la myristicine (16,6 %) dans les huiles essentielles des racines. La myristicine (de 66,9 à 83,8 %) est la principale et unique composante dans les huiles des parties aériennes. Le déplacement du bas vers le sommet de la plante, a montré que le pourcentage de la myristicine augmente comme suit: 16,6 % dans les racines, 66,9 % dans les tiges, 80,2 % dans les feuilles et 83,8 % dans les fleurs. Les composés terpéniques sont très faibles dans l'huile essentielle des racines (2,2 %) et ils étaient plus élevés (de 12,6 à 28,6 %) dans les huiles essentielles des parties aériennes. Ces classes de composés étaient principalement représentés par le germacrène D (2.9 à 6.4 %) et l'épiglobulol (1.2 à 5.1 %) (Tableau III.16).

Seules quelques différences quantitatives ont eu lieu entre les compositions chimiques des huiles essentielles à partir des organes séparés (feuilles, tiges et fleurs) et ceux des parties aériennes.

Par rapport aux études précédemment rapportées dans la littérature (**tableau I.1**), les compositions chimiques des huiles essentielles à partir du *D. carota ssp. hispanicus* algérien présentent une originalité.

Les huiles essentielles des parties aériennes étaient clairement différentes de ceux des autres origines, la myristicine n'a jamais été signalée. La myristicine (29,7 %) et le dillapiole (46,6 %) étaient identifiés comme principaux composants dans les huiles des racines du *D. carota ssp. maritimus* de la Tunisie, l'huile essentielle de la racine du *D. carota ssp. hispanicus* d'origine algérienne était différente par la présence de l'apiole qui était rapporté ici, pour la première fois, en tant que composé essentiel de l'huile du *D. carota ssp. hispanicus*.

#### **IV.3. La variabilité chimique des huiles essentielles du *D. carota ssp. hispanicus***

L'analyse par CPG-IR et CPG-SM des huiles essentielles du *D. carota ssp. hispanicus* obtenus à partir des parties aériennes et des racines sur 10 sites comptaient pour 92,3 à 98,5 % et de 97,4 à 99,4 % des huiles, respectivement.

**Tableau III.17:** Composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes du *D. carota ssp. hispanicus* des dix stations de l'ouest Algérien.

N°	Composés <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	Echantillons de <i>D. carota ssp. hispanicus</i> <sup>e</sup>																				Id. <sup>f</sup>
					Racines										Parties aériennes										
					S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	Penta-3-one	654	652	954	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0.1	0.1	0.1	tr	tr	tr	tr	RI, MS
2	Heptane	700	700	700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	RI, MS
3	2-Methylpentan-3-one	750	747	991	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.2	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
4	Hexanal	770	771	1049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0.1	tr	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
5	(E)-2-Hexenal	832	830	1204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
6	$\alpha$ -Thujène	932	925	1014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.3	0.1	RI, MS
7	$\alpha$ -Pinène	936	931	1016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.3	tr	0.5	0.8	0.2	0.9	0.9	tr	0.1	RI, MS
8	Thuja-2,4(10)-diène	946	943	1115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
9	Camphène	950	947	1062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.3	tr	tr	tr	0.1	tr	RI, MS
10	6-Methylhept-5-en-2-one	966	961	1325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	RI, MS
11	Sabinène	973	968	1111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	0.2	tr	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
12	$\beta$ -Pinène	978	974	1102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.2	0.4	0.9	0.8	1.1	0.8	0.2	1.8	RI, MS
13	2-Pentylfuran	981	978	1353	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	0.1	0.1	0.2	tr	tr	0.1	0.2	RI, MS, Ref
14	Myrcène	987	980	1152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.1	0.1	0.3	tr	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4	RI, MS
15	2-methyl Butyrate d'isobutyle	994	991	1102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	RI, MS
16	$\alpha$ -Phellandrene	1002	997	1155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	-	tr	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	RI, MS
17	$\alpha$ -Terpinène	1008	1011	1267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	-	tr	0.1	0.1	1.9	0.9	0.1	0.2	RI, MS
18	p-Cymène	1011	1015	1256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
19	Limonène	1025	1022	1195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.3	0.5	0.4	0.6	0.1	0.9	0.7	0.8	0.9	RI, MS

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

20	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1024	1027	1221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	1.7	1.8	1.9	2.6	1.6	2.6	2.6	1.1	2.2	RI, MS
21	(E)- $\beta$ -Ocimène	1034	1037	1237	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	RI, MS
22	$\gamma$ -Terpinène	1051	1051	1233	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.2	0.1	tr	0.2	0.2	0.2	0.3	RI, MS
23	m-Tolualdehyde	1053	1055	1575	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
24	4-methyl-Benzaldehyde	1060	1064	1591	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.2	0.2	RI, MS
25	Terpinolène	1082	1079	1274	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.3	0.4	RI, MS
26	Nonanal	1076	1081	1387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.2	0.3	tr	0.1	0.1	tr	tr	RI, MS
27	Isovalerate de 3-Methyl butyl	1098	1090	1267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	tr	0.2	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
28	Isovalerate 2-Methyl butyl	1102	1097	1284	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	RI, MS
29	oxyde de (Z)-Ocimène	1115	1115	1365	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1	tr	0.2	0.1	0.3	0.3	tr	tr	RI, MS, Ref
30	allo-Ocimène	1120	1121	1359	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	tr	0.2	tr	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
31	oxyde (E)-Ocimène	1125	1127	1377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	0.2	RI, MS, Ref
32	(E)-2-Nonenal	1136	1134	1522	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1	0.2	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
33	Lyratol	1150	1148	1769	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	0.1	tr	RI, MS
34	(E)-2-Nonen-1-ol	1153	1152	1672	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	tr	0.2	tr	RI, MS
35	(E)-2-Décenal	1240	1237	1646	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	tr	0.5	0.1	0.3	0.3	tr	0.1	RI, MS
36	Acétate de bornyl	1270	1265	1571	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	tr	RI, MS
37	$\alpha$ -Longipinène	1360	1357	1465	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	tr	0.2	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
38	$\alpha$ -Ylangène	1376	1371	1470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	RI, MS
39	$\alpha$ -Copaène	1379	1382	1457	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	RI, MS
40	$\beta$ -Bourbonène	1386	1385	1510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	RI, MS
41	$\beta$ -Ylangène	1420	1413	1560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.3	0.2	0.9	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	RI, MS
42	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1416	1579	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	RI, MS

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

43	(E)- $\alpha$ -Bergamotène	1434	1430	1572	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.2	0.1	RI, MS
44	$\alpha$ -Himachalène	1450	1447	1630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	RI, MS
45	$\alpha$ -Humulène	1455	1460	1660	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.4	0.4	0.9	0.3	0.6	0.6	0.4	0.8	RI, MS
46	$\alpha$ -Curcumène	1473	1468	1763	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	RI, MS
47	Germacrène D	1479	1477	1704	tr	0.3	0.1	0.1	1.2	1.2	0.4	0.4	0.3	0.2	1.2	2.2	2.3	1.9	3.2	2.1	3.1	3.1	3.1	5.3	RI, MS
48	Zingiberène	1489	1489	1717	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.1	0.4	0.4	0.4	0.2	0.3	0.1	0.3	0.4	RI, MS
49	Bicyclogermacrène	1494	1495	1720	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	0.1	0.4	0.5	0.3	0.5	RI, MS
50	Myristicine	1489	1499	2186	83.4	83.3	57.4	58.3	39.2	39.5	25.9	25.5	16.6	15.6	86.2	84.1	80.1	78.6	70.3	76.5	66.7	69.2	73.2	62.9	RI, MS
51	$\delta$ -cadinène	1507	1503	1742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	RI, MS
52	Elemicin	1518	1520	2232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	RI, MS
53	(E)- $\alpha$ -Bisabolène	1531	1526	1776	0.3	0.3	0.1	0.1	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	0.2	RI, MS
54	Elemol	1541	1539	2070	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.3	0.3	0.4	0.6	RI, MS
55	Epiglobulol	1558	1550	2013	2.1	2.0	1.2	1.3	1.9	1.8	2.7	2.6	1.4	1.3	1.1	1.7	1.9	3.1	1.4	6.6	2.1	3.1	5.1	4.8	RI, MS
56	Epoxy salvial-1,5-4(14)-ene	1560	1562	1902	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.1	0.1	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3	0.1	0.1	RI, MS
57	Spathulenol	1572	1568	2110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.2	0.4	0.4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	RI, MS
58	Hydrate cis-Sesquisabinène	1586	1566	2099	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	tr	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	RI, MS
59	oxyde de Caryophyllène	1578	1574	1937	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.4	0.5	0.5	0.2	0.2	0.4	0.2	RI, MS
60	4(14)-Salvialene-1-one	1592	1585	2109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.5	0.3	RI, MS, Ref
61	Viridiflorol	1592	1594	2083	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.5	1.2	1.6	2.2	2.3	0.5	RI, MS
62	Guaiol	1593	1589	2090	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.1	0.3	0.7	0.4	0.3	0.2	0.2	0.6	0.3	RI, MS
63	Aromadendrene oxide II	1623	1620	1996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	0.1	0.5	RI, MS
64	t-Muurolol	1633	1626	2138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	RI, MS
65	t-Cadinol	1633	1632	2160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.1	0.1	0.5	0.7	0.8	0.4	0.4	0.8	0.7	RI, MS

CHAPITRE III : EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

66	$\alpha$ -Cadinol	1643	1641	2223	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	0.2	0.4	RI, MS
67	Apiole	1649	1646	2402	13.3	13.2	39.7	38.8	55.4	54.1	69.1	69.9	80.3	81.3	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.2	1.7	1.8	1.1	4.1	RI, MS, Ref
68	(E)-Phytol	2114	2015	2568	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	tr	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	tr	RI, MS
	<b>% d'identification</b>				<b>99.3</b>	<b>99.4</b>	<b>98.8</b>	<b>98.9</b>	<b>98.7</b>	<b>97.4</b>	<b>98.4</b>	<b>98.9</b>	<b>99.1</b>	<b>98.8</b>	<b>97.7</b>	<b>96.5</b>	<b>94.1</b>	<b>98.5</b>	<b>94.6</b>	<b>97.6</b>	<b>92.3</b>	<b>94.9</b>	<b>97.4</b>	<b>94.3</b>	
	Rendement de l'huile %				0.22	0.13	0.15	0.19	1.1	1.2	1.3	1.1	1.6	1.0	0.40	0.49	0.50	0.85	1.2	1.5	1.8	2.1	3.1	2.2	
	<b>% composés hydrocarbonés</b>				<b>0.3</b>	<b>0.6</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.4</b>	<b>0.3</b>	<b>5.3</b>	<b>6.6</b>	<b>7.0</b>	<b>8.7</b>	<b>13.4</b>	<b>7.7</b>	<b>14.9</b>	<b>13.4</b>	<b>9.9</b>	<b>16.5</b>	
	% Monoterpène hydrocarbonés				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.2	3.1	2.9	4.3	6.2	3.5	8.7	7.2	3.7	7.1	
	% Sesquiterpène hydrocarbonés				0.3	0.6	0.2	0.2	1.7	1.7	0.5	0.5	0.4	0.3	3.1	3.5	4.1	4.3	7.1	4.2	6.2	6.2	6.1	9.3	
	% composés hydrocarbonés Non terpéniques				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-	-	-	0.1	0.1	
	<b>% composés Oxygénés</b>				<b>99</b>	<b>98.8</b>	<b>98.6</b>	<b>98.7</b>	<b>97</b>	<b>95.7</b>	<b>97.9</b>	<b>98.4</b>	<b>98.7</b>	<b>98.5</b>	<b>92.4</b>	<b>90.4</b>	<b>87.1</b>	<b>89.8</b>	<b>81.2</b>	<b>89.9</b>	<b>77.4</b>	<b>81.5</b>	<b>87.5</b>	<b>77.8</b>	
	% monoterpènes Oxygénés				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	0.6	0.4	0.8	0.4	9	1	0.6	0.5	
	% sesquiterpènes Oxygénés				2.3	2.3	1.5	1.6	2.4	2.1	2.9	3	1.8	1.6	3.8	4	4.5	7.5	6.3	10.3	6.3	7.8	11.1	8.9	
	% composés oxygénés Non-terpéniques				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	0.2	0.4	1.3	1.5	1.1	1	1	0.8	0.8	
	% diterpènes Oxygénés				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	-	
	% Phenylpropanoïdes				96.7	96.5	97.1	97.1	94.6	93.6	95.0	95.4	96.9	96.9	87.6	85.6	81.6	80.4	72.5	78	68.9	71.5	74.9	67.6	

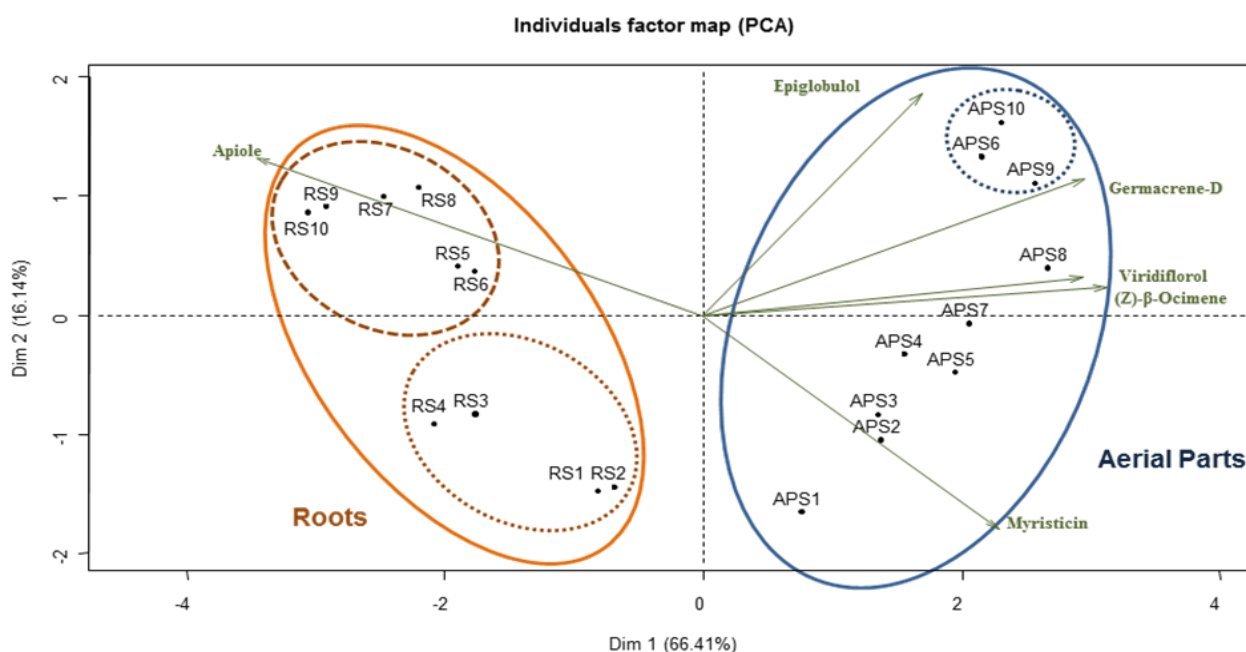
<sup>a</sup> ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). <sup>b</sup> indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (LALR) (König et al., 2001). <sup>c</sup> indices de rétention sur le RTX 1 colonne apolaire (RIA). <sup>d</sup> indices de rétention sur la colonne Rtx-Wax polaire (RIP). <sup>e</sup> échantillons algériens: S1. Kihal; S2. Amieur; S3 Bensekrane; S4. Chelaida; S5. Mansourah; S6. Beni Boublene; S7. Mafrouche; S8. Lalla Setti; S9. Hafir; S10. Terny. Pourcentages (moyens de trois analyses). FID. Identification: RI: Indices de rétention; MS: spectrométrie de masse en mode d'impact électronique; Réf.: Composés identifiés à partir des données de la littérature (König et al., 2001)

Bien que les dix huiles essentielles des parties aériennes étaient qualitativement similaires, il y a peu de différence dans les pourcentages abondances normalisées de leurs composantes principales: la myristicine (de 62,9 à 86,2%), l'épiglobulol (1.1-6.6%), germacrène D (1,2-5,3%), l'apiole (1.1 à 4.1%) et viridiflorol (0,5-2,3%). En ce qui concerne les huiles essentielles des racines, il y a des différences significatives entre les pourcentages abondances normalisées de leurs principaux composants. Par exemple, l'apiole variait de 13,2% à 81,3% et la myristicine variait de 15,6% à 83,4% (Tableau III.17).

#### IV.4. L'analyse en composantes principales et la Classification Hiérarchique Ascendante :

L'analyse en composantes principales (ACP) et la classification hiérarchique ascendante (CHA) étaient appliquées pour identifier les relations possibles entre les compositions des huiles essentielles et les origines géographiques des échantillons.

Les données présentées dans les figures III.9 et III.10 étaient obtenues à partir de la matrice de corrélation et la matrice normalisée reliant les compositions des huiles essentielles aux sites d'échantillonnage. La distribution de ces six composés : (Z)- $\beta$ -ocimène, myristicine, germacrène D, epiglobulol, viridiflorol et apiol est illustrée dans la figure III.9.

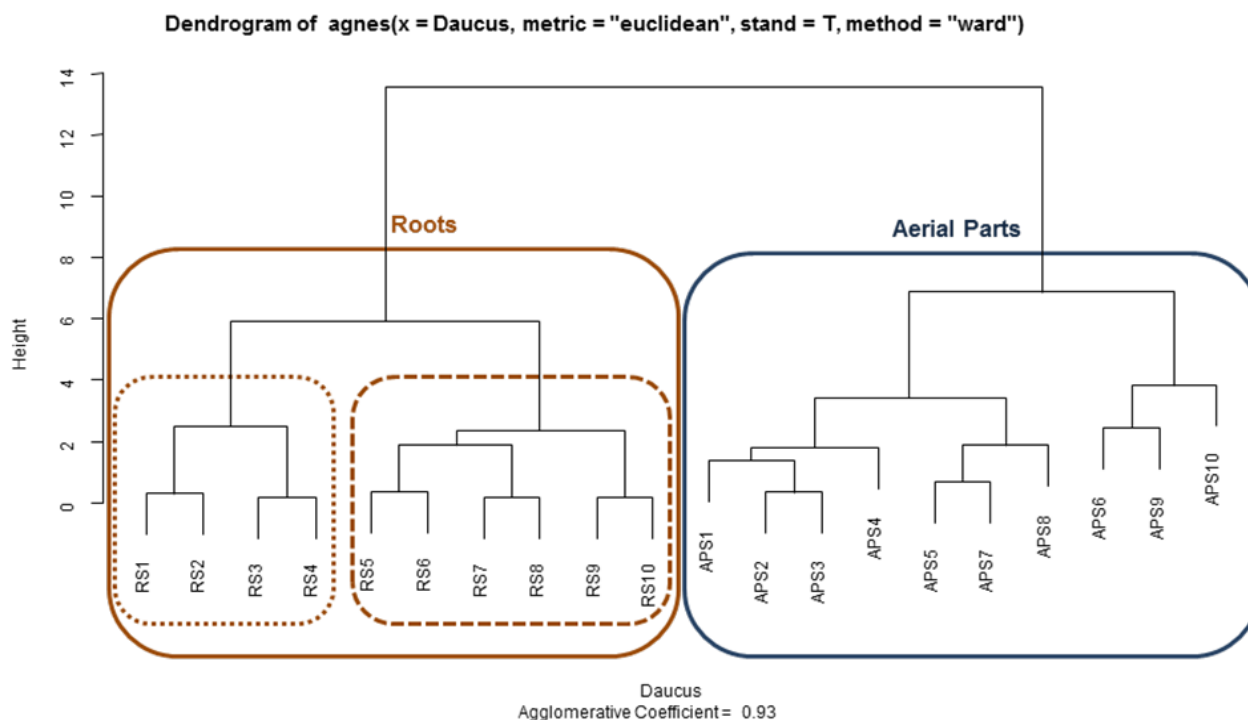


R: Racines ; Ap: parties aériennes.

**Figure III.9 :** ACP des compositions chimiques des huiles du *D. carota ssp. hispanicus*



L'analyse en composantes principales (ACP) et la classification hiérarchique ascendante (CHA) établies à l'aide des deux premiers axes, suggèrent qu'il existe deux principaux groupes de *D. carota ssp. hispanicus* (figures III.9 et III.10).



R: Racines ; Ap: parties aériennes.

**Figure III.10 :** CHA compositions chimiques du *D. carota ssp. hispanicus* d'Algérie

**Tableau III.18:** Analyse de cluster des échantillons des racines du *D. carota ssp. hispanicus* de l'analyse statistique

No <sup>a</sup>	Composés	Les racines			
		Groupe I (S1-4)		Groupe II (S5-10)	
		Gamme <sup>b</sup>	Moyenne <sup>b</sup>	Gamme <sup>b</sup>	Moyenne <sup>b</sup>
<b>Composés Phenylpropanoïdes</b>			<b>96.8</b>		<b>99.8</b>
<b>50</b>	Myristicine	58.3-83.4	70.6	15.6-39.5	31.4
<b>71</b>	Apiole	13.2-38.8	26.2	54.1-81.3	68.4

<sup>a</sup> Numérotation selon le tableau 17; <sup>b</sup> Abondance du pourcentage normalisé

Un groupe contient toutes les huiles des échantillons des parties aériennes et l'autre groupe contient toutes les huiles des échantillons des racines.

Par exemple : les huiles des parties aériennes représentent un groupe homogène (de S1 à S10) caractérisé par des quantités élevées de myristicine (de 66,7 à 86,2 %). Par contre, les huiles des échantillons des racines étaient divisées en deux sous-groupes en fonction des pourcentages de la myristicine et d'apiole (Tableau III.18).

Le premier sous-groupe (de S1 à S4) était riche en myristicine (de 58,3 à 83,4 %) avec l'apiole (de 13,2 à 38,8 %) et le second sous-groupe (de S5 à S10) contient des quantités élevées d'apiole (de 54,1 à 81,3 %) et des quantités moindres de myristicine (de 15,6 à 39,5 %).

#### **IV.5. Corrélation entre la variabilité chimique des huiles essentielles et les paramètres environnementaux des points d'échantillonnage**

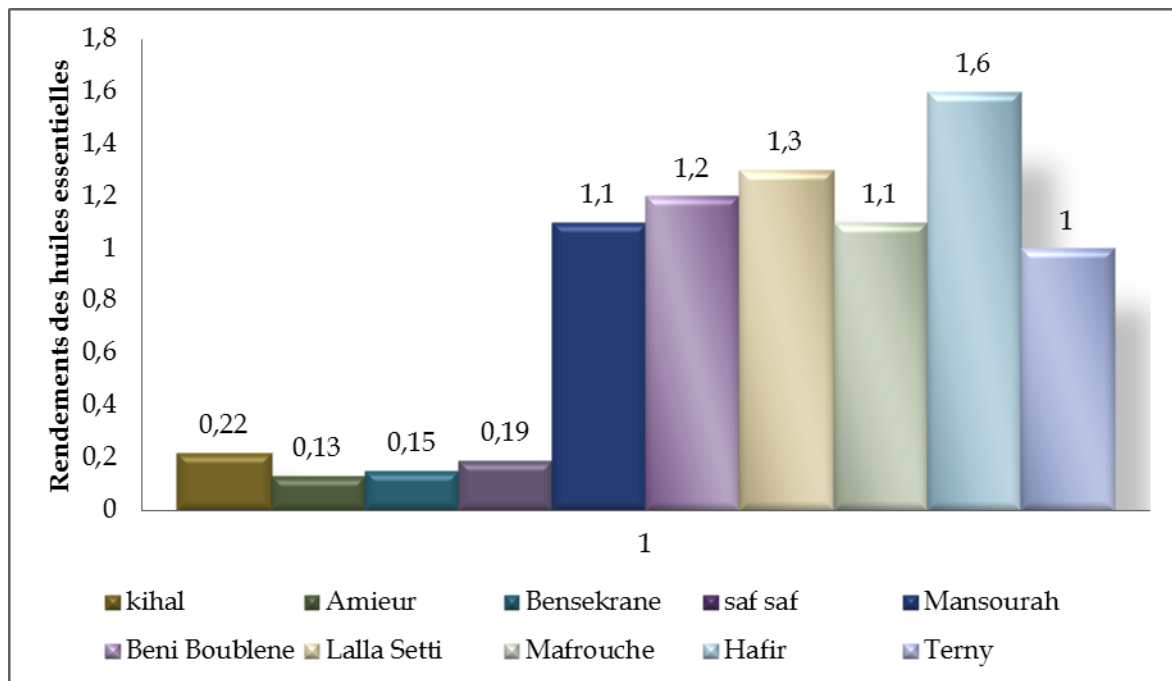
L'analyse en composantes principales (ACP) et la classification hiérarchique ascendante (CHA) ont révélées la variabilité chimique des huiles essentielles des racines du *D. carota ssp. hispanicus* dans dix stations (figures III.9 et III.10). Il est à noter que les abondances normalisées des deux composantes principales de l'huile diffèrent largement selon les paramètres environnementaux des sites d'échantillonnage.

Les échantillons provenant des stations : Kihal, Amieur, Besekrane et Saf-Saf (Zone 1: de S1 à S4) qui poussent sur des sols riches en calcaire avec un climat sec, produisent des huiles essentielles riches en myristicine ; tandis que les spécimens de Mansourah, Beni Boublene, Lalla Setti, Mafrouche, Hafir et Terny (Zone 2: de S5 à S10) qui poussent sur des sols riches en minéraux avec les climats humides et plus froids produisent des huiles essentielles riches en apiole.

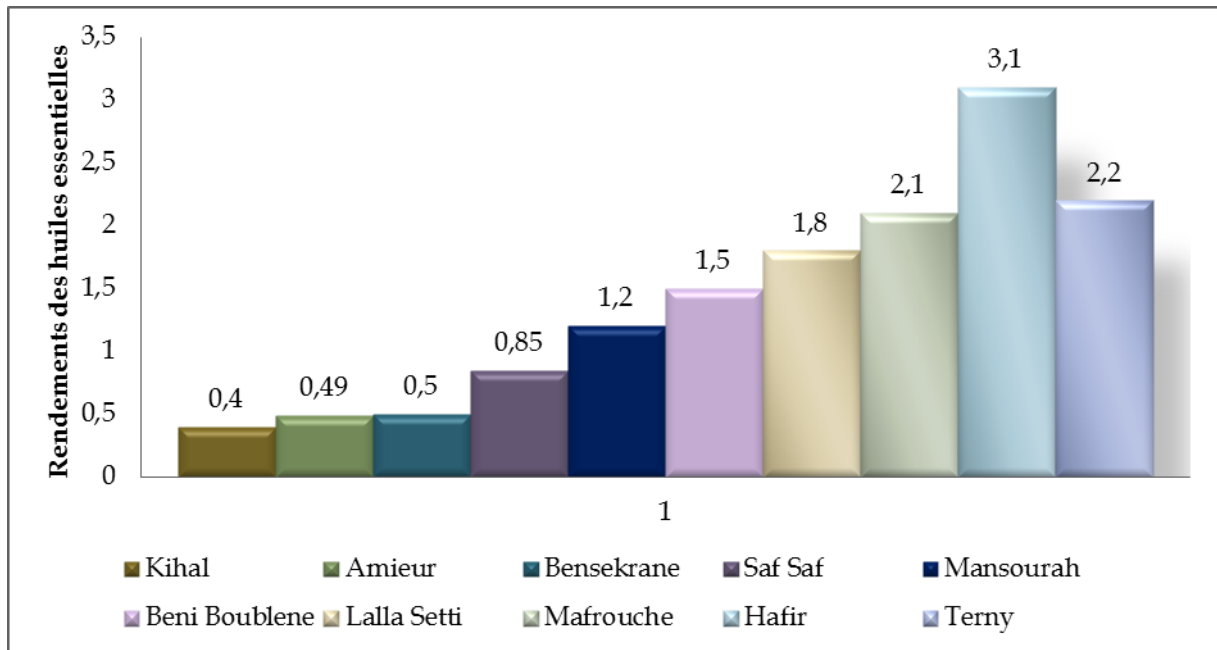
En revanche, il semble que les huiles essentielles des parties aériennes du *D. carota ssp. hispanicus* n'ont pas été affectées par la nature des sols et du climat.

En outre, il est intéressant de noter la corrélation directe entre les rendements des huiles essentielles et la zone de récolte. Cette corrélation se produit pour les racines et les parties aériennes du *D. carota ssp. hispanicus*.

Les échantillons provenant des sols riches en calcaire à climat sec (Zone 1: de S1 à S4) présentent des rendements plus faibles (de 0,13 à 0,22 % pour les huiles des racines et 0,4 à 0,85 % pour les huiles des parties aériennes), et les échantillons des sols riches en minéraux et climats humide plus frais (Zone 2: de S5 à S10) présentent des rendements en huiles essentielles plus élevés (de 1,0 à 1,6% pour les huiles des racines et de 1,2 à 3,1 % pour les huiles des parties aériennes).



**Figure III.11:** Rendements (%) des huiles essentielles des racines de *D. carota ssp. hispanicus* en fonction des zones de récolte.



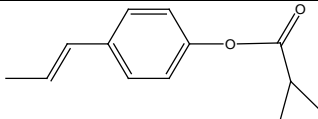
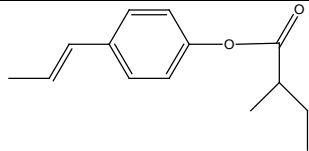
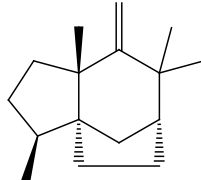
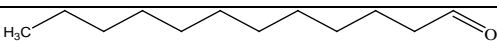
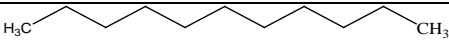
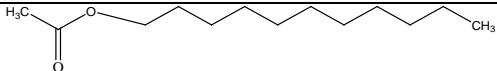
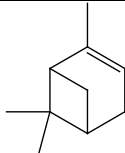
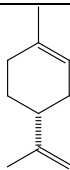
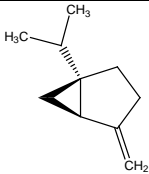
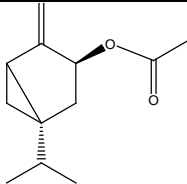
**Figure III.12:** Rendements (%) des huiles essentielles des parties aériennes de *D. carota ssp. hispanicus* en fonction des zones de récolte.

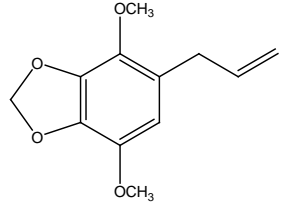
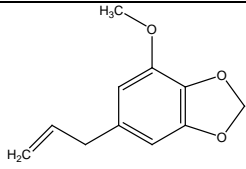
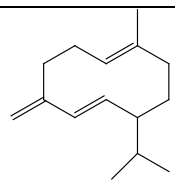
En règle générale, les différences observées dans la composition chimique des différentes huiles peuvent être la conséquence de plusieurs facteurs. Ces facteurs peuvent inclure des différences dans les conditions climatiques, les lieux géographiques et les types des sols [15,16].

Les Stress biotiques et abiotiques exercent une influence considérable sur la production de plusieurs métabolites secondaires des plantes [17]. La sécheresse est l'un des plus importants facteurs du stress abiotiques [18], ce qui affecte la croissance des plantes, la photosynthèse des feuilles [19] et modifie les propriétés biochimiques des plantes [20]. De la même manière, les changements dans la composition chimique des huiles essentielles étaient rapportés selon le type du sol [21,22].

Enfin, pour avancer dans l'étude de la variabilité chimique du *D. carota ssp. hispanicus* d'Algérie, il pourrait être intéressant de déterminer la diversité génétique des populations étudiées ici.

**Tableau III.18:** Principaux constituants des huiles essentielles des 3 *Daucus*

Espèces	Composés majoritaires	(%)	Structure
<i>D. crinitus</i>	Isobutyrate d'isochavicol	53	
	Butyrate d'isochavicol 2-méthyle	60	
	Zizaène	44	
<i>D. muricatus</i>	Dodécanal	35	
	Undécane	17	
	Dodécyl acétate	57	
	$\alpha$ -Pinène	3	
	Limonène	12	
	Sabinène	6	
	Acétate de trans-sabinyol	44	

<i>D. carota</i> <i>ssp.</i> <i>hispanicus</i>	Apiol	67	
	Myristicine	50	
	Germacrène-D	47	

Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique de ces huiles essentielles. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces ; c'est le cas du *D. carota ssp. hispanicus* dont les composés majoritaires sont l'apiol ou la myristicine, dépassant les 60 % de la composition de l'huile essentielle.

#### IV.6.Conclusion

La partie importante de ce projet visait à étudier la composition chimique des huiles essentielles de trois *Daucus* obtenues par hydrodistillation. Ces huiles ont été très peu étudiées par le passé, et pour la première fois, nous avons décrit la composition chimique des huiles essentielles de *D. carota ssp. hispanicus*, *D. crinitus* et *D. muricatus* de la région de Tlemcen.

Les résultats relatifs à la composition chimique des huiles essentielles extraites des racines et de la partie aérienne des trois *Daucus* montrent une variation quantitative et qualitative du profil chimique des huiles étudiées. Cette différence de la composition chimique observée entre les huiles essentielles des deux parties de la plante, pourrait s'expliquer par une adaptation aux facteurs biotiques et abiotiques, tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, aux facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol.

### Références bibliographiques

- [1] Conseil de l'Europe, Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A, Sainte-Ruffine, France, 1996.
- [2] Lanfranchi DA, Laouer H, El-Kolli M, Prado S, Maulay-Bailly C, Baldovini N. Bioactive Phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J Agric Food Chem.*, 2010, 58: 2174-2179.
- [3] Kubeczka KH, Bartsch A, Ullmann I. Recent studies on essential oils of Apiaceae. Aetherische Oele, *Ergeb. Int. Arbeitstag.*, 1982, 7: 158-187.
- [4] Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *Halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity, *J Ethnopharmacol.*, 2008, 119: 129-134.
- [5] Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants, *Plant Growth Regulation*, 2001, 34: 3-21.
- [6] Kim NS, Lee DS. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry, *J Separat Sci.*, 2004. 27: 96-100.
- [7] Circella G, Franz C, Novak J, Resch H. Influence of day length and leaf insertion on the composition of marjoram essential oil, *Flavour Fragr J.*, 1995, 10: 371-374.
- [8] Skoula M, Abbes JE, Johnson CB. Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete, *Biochem Sys Eco.*, 2000, 28: 551-561.
- [9] Harborne JB. Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis, Chapman & Hall, London, 1998.
- [10] Kula J, Izydorczyk K, Czajkowska A, Bonikowski R. Chemical composition of carrot umbells oils from *Daucus carota* ssp. *sativus* cultivated in Poland. *Flavour Fragr J.*, 2006, 21: 667-669.
- [11] Mojab F, Hamedi A, Nickavar B, Javidnia K, Shaheed B. Hydrodistilled Volatile Constituents of the Leaves of *Daucus carota* L. subsp. *Sativus* (Hoffman.) Arcang. (Apiaceae) from Iran. *J Essent Oil Bear Pl.*, 2008, 11: 271-277.
- [12] Le Ministère Algérien de l'Agriculture et Développement Rural, 2010
- [13] Collignon B. Hydrogéologie appliquée des aquifères karstiques des monts de Tlemcen, 1986.
-

- [14] Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, First Ed. Council of Europe, Strasbourg, 1997.
- [15] Cheng SS, Liu JY, Hsui YR, Chang ST. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresour Technol.*, 2006, 97: 306-312.
- [16] Cheng SS, Chua MT, Chang EH, Huang CG, Chen WJ, Chang ST .Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresour Technol.*, 2009, 100: 465-470.
- [17] Jaleel CA, Sankar B, Murali PV, Gomathinayagam M, Lakshmanan GMA, Panneerselvam R. Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2008, 62: 105-111.
- [18] Dash S, Mohanty N. Evaluation of assays for the analysis of thermo tolerance and recovery potentials of seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.*, 2001, 158: 1153-65.
- [19] Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol.*, 2004, 6: 269-279.
- [20] Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environ. Exp. Bot.*, 2007, 59: 109-116.
- [21] Gouyon PH, Vernet P, Guillerm JL, Valdeyron G. Polymorphisms and environment. The adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity*, 1986, 57: 59-66.
- [22] Martonfi P, Grejtovsky A, Repcak M. Chemotype pattern differentiation of *Thymus pulegioides* on different substrates. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1994, 22: 819-825.
- [23] Brada M, Bezzina M, Marlier M, Carlier A, Lognay G. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *J. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2007, 11: 3-7.



# *CHAPITRE IV*

## *Partie biologique*

## I. Investigation phytochimique et activité antioxydante des extraits de *D. crinitus*

Dans cette partie expérimentale, deux axes ont été envisagés :

Le premier axe concerne l'extraction des composés phénoliques par le méthanol et l'eau, suivi par la quantification des teneurs de ces composés. Les dosages obtenus exprimés en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  sont déterminés en utilisant les réactifs suivants : le Folin-Ciocalteu pour les polyphénols, le trichlorure d'alumine pour les flavonoïdes.

Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés au pouvoir antioxydant des extraits et de l'huile essentielle de *D. crinitus*.

La synthèse bibliographique entreprise au début de ce travail a permis de constater que les connaissances des composés phytochimiques sur le *D. crinitus* sont très limitées. Par ailleurs, une demande croissante en ingrédients d'origine naturelle a été observée ces dernières années favorisant par conséquent la recherche de nouveaux composés bioactifs.

### I.1. Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés selon la méthode décrite par Harborne (1998) [1], pour détecter la présence d'hétérosides, saponines, tanins, flavonoïdes, stéroïdes, triterpènes, les coumarines, les quinones, les acides organiques et les alcaloïdes. Ils étaient basés sur l'observation visuelle d'un changement de couleur ou de formation de précipité après l'ajout des réactifs spécifiques. Le tableau IV.1 montre la présence de divers composés tels que les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques et les coumarines.

**Tableau IV.1:** Prospection phytochimique des extraits de *D. crinitus*.

Extraits	Métabolites secondaires					
	1	2	3	4	5	6
Méthanolique (tiges /feuilles)	+	+	+	+	-	-
Aqueux (tiges/feuilles)	+	+	+	-	-	-

1 : les tanins ; 2 : flavonoïdes ; 3 : les acides phénoliques ; 4 : les coumarines ; 5 : les saponosides ; 6 : les alcaloïdes ; (+) : présence ; (-) : absence

D'après le Tableau IV.1, on remarque que les extraits aqueux et méthanolique montrent une inférence positive pour le test des tanins, des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les saponosides étaient absents dans les deux extraits (absence de mousse). Cependant le test des alcaloïdes produit une inférence négative pour les deux extraits.

## I.2. Estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

Les polyphénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules chimiques, dont la nature chimique et la teneur sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu est la plus utilisée [2]. La courbe d'étalonnage (Figure IV.1) établie à l'aide de différentes concentrations d'acide gallique, nous a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques de chacun des deux extraits. Elle était exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalent en acide gallique par mL d'extrait ( $\mu\text{gEAG/mL}$  d'extrait). La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits, de couleur jaune, absorbent dans le visible entre 415 et 420 nm. [3]

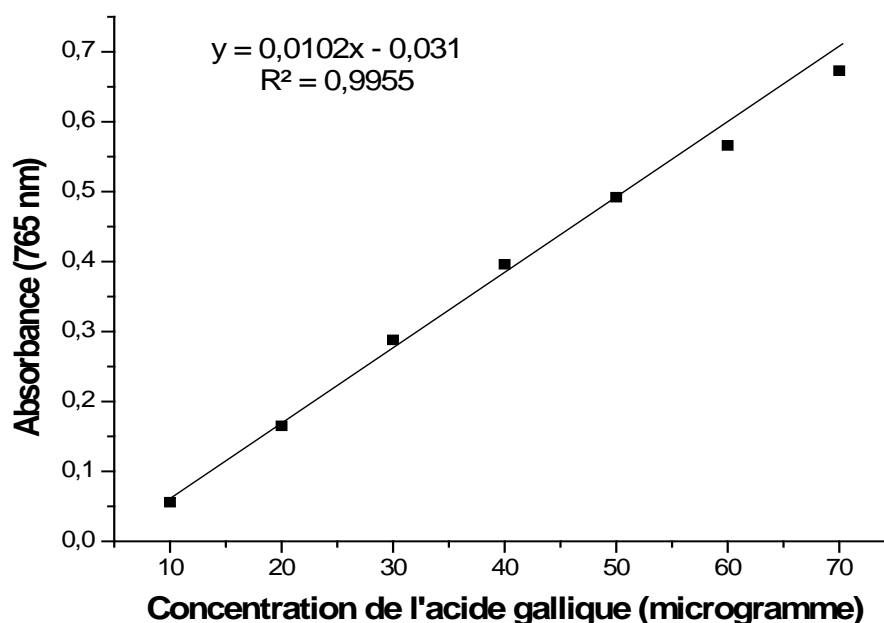


Figure IV.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique à différentes concentrations

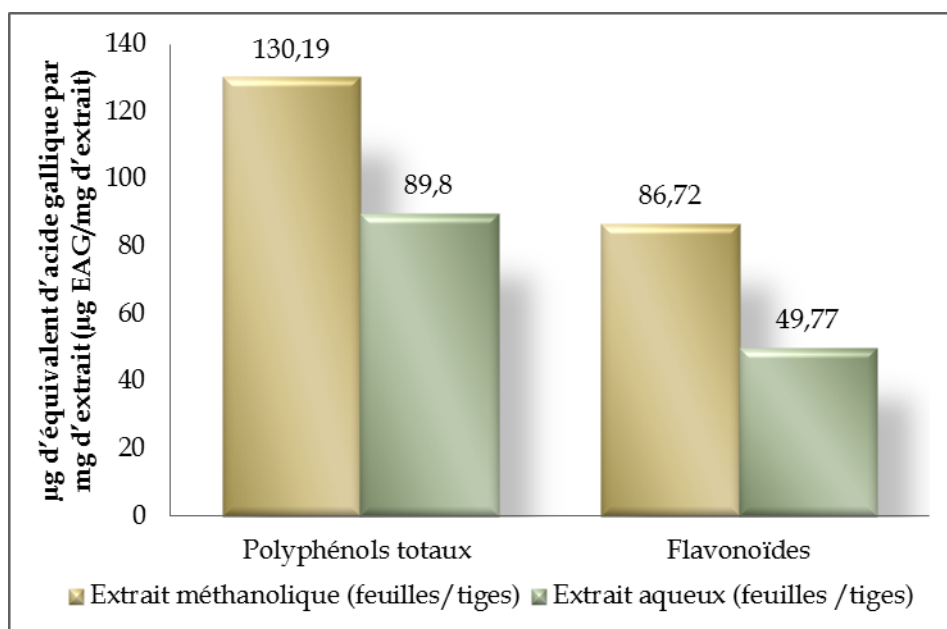
**Tableau IV.2 :** Résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits de *D. crinitus*.

Extraits	Polyphénols totaux <sup>(a)</sup>	Flavonoïdes <sup>(b)</sup>
Extrait méthanolique (feuilles/tiges)	130.19 ± 5	86.72 ± 4
Extrait aqueux (feuilles /tiges)	89.80 ± 3	49.77 ± 2

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± de trois mesures parallèles.

(a) µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

(b) µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).



**Figure IV.2 :** Comparaison entre les polyphénols totaux et les flavonoïdes.

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique a des composants phénoliques totaux plus élevés que l'extrait aqueux. Cependant, Le contenu des polyphénols totaux trouvés dans l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux étaient respectivement  $130.19 \pm 5$  et  $89.80 \pm 3$  µg EAG/mg. De même, l'extrait méthanolique était plus riches en flavonoïdes ( $86.72 \pm 4$  µg EAG/mg d'extrait) que l'extrait aqueux ( $49.77 \pm 2$  µg EAG/mg d'extrait).

### **I.3. Activité antioxydante**

Le stress oxydant, cause de plusieurs maladies, l'Alzheimer [4], l'artériosclérose et le cancer [5], suscite la recherche de nouveaux remèdes antioxydants. Actuellement, La recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues de plantes, qui sont douées des propriétés antiradicalaires. L'intérêt croissant des effets bénéfiques de l'antioxydant sur la santé a mené au développement d'un grand nombre de tests pour déterminer les capacités antioxydantes des extraits naturels. Le test DPPH est parmi les plus utilisés dans la littérature. Dans cette optique, l'étude de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques, aqueux et des huiles essentielles de *D. crinitus* a été réalisée. Cette plante contient des flavonoïdes et des polyphénols qui sont en général de très bons antioxydants. Ainsi, elle est, au vu de notre étude, considérée comme une plante antioxydante et antiradicalaire.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits était réalisée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-Diphényle-1-picrylhydrazil). L'évaluation de l'activité anti-radicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH entre 515 et 520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionné à l'antioxydant [6].

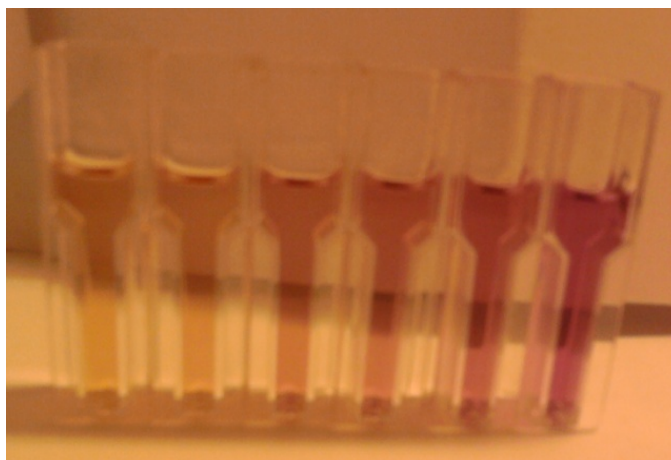
#### **La Vitamine C (acide ascorbique) : (prise comme référence)**

Ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton. Ce radical peut facilement s'oxyder en captant l'anion superoxyde et certaines espèces radicalaires (perhydroxyles et peroxydes) [7,8].

#### **Résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits de *D. crinitus***

Le radical libre DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante. C'est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les extraits testés. Ce virage de couleur est accompagné d'une diminution de l'absorbance (DO) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH. Conventionnellement une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres, est considérée comme une grande activité antioxydante.

L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de l'extrait, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cet extrait.



**Figure IV.3 :** Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur du DPPH

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction de DPPH causée par différentes concentrations d'huiles essentielles et d'extraits de *D. crinitus*. D'après les tableaux IV. 3, IV.4 et IV.5 ci-dessous; la plus faible activité radicalaire (60.26 et 53.12%) a été exposée par l'huile essentielle des racines et de la partie aérienne à une concentration respectivement de 24 et 36 mg/mL, tandis que la plus forte activité (69.82 et 62.89%) a été exposée par l'extrait méthanolique à une concentration respectivement de 0.1 et 0.7 mg/mL.

D'autre part l'extrait aqueux des racines et de la partie aérienne présente une activité radicalaire moyenne (77.51 et 80.56%) à une concentration de 1.4 mg/mL. Par conséquent, l'activité antioxydante des extraits et de l'huile essentielle augmente avec une augmentation de leurs concentrations. À des concentrations plus élevées, l'activité antioxydante des extraits était plus proche de l'effet de l'acide ascorbique.

**Tableau IV.3:** Capacité antioxydante de l'extrait méthanolique des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

Extraits méthanolique	Concentrations (mg/mL)	Inhibition (%)	Valeurs des IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Racines	0.14	19.54	$y = 72,789x + 14,147$ $R^2 = 0,9436$ 0.492
	0.23	32.84	
	0.35	44.68	
	0.70	62.89	
Partie aériennes	0.04	35.08	$y = 564,8x + 11,874$ $R^2 = 0,9877$ 0.068
	0.06	46.00	
	0.08	54.74	
	0.1	69.82	

**Tableau IV.4:** Capacité antioxydante de l'extrait aqueux des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

Extraits Aqueux	Concentrations (mg/mL)	Inhibition (%)	Valeurs des IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Racines	0.20	27.96	$y = 40,602x + 21,02$ $R^2 = 0,9972$ 0.710
	0.28	32.25	
	0.46	41.37	
	1.40	77.51	
Parties aériennes	0.01	20.54	$y = 41,48x + 23,254$ $R^2 = 0,992$ 0.644
	0.02	26.47	
	0.70	53.80	
	1.40	80.56	

**Tableau IV.5:** Capacité antioxydante de l'huile essentielle des racines et des parties aériennes de *D. crinitus*.

Huile essentielle	Concentrations (mg/mL)	Inhibition (%)	Valeurs des IC <sub>50</sub> (mg/mL)
<b>Racines</b>	6.0	17.46	$y = 2,4483x + 1,7633$ $R^2 = 0,9925$ 19.71
	8.0	19.05	
	12	32.7	
	24	60.26	
<b>Parties aériennes</b>	6	10.24	$y = 1,4451x + 0,8279$ $R^2 = 0,9989$ 34.02
	12	17.49	
	18	26.51	
	36	53.12	

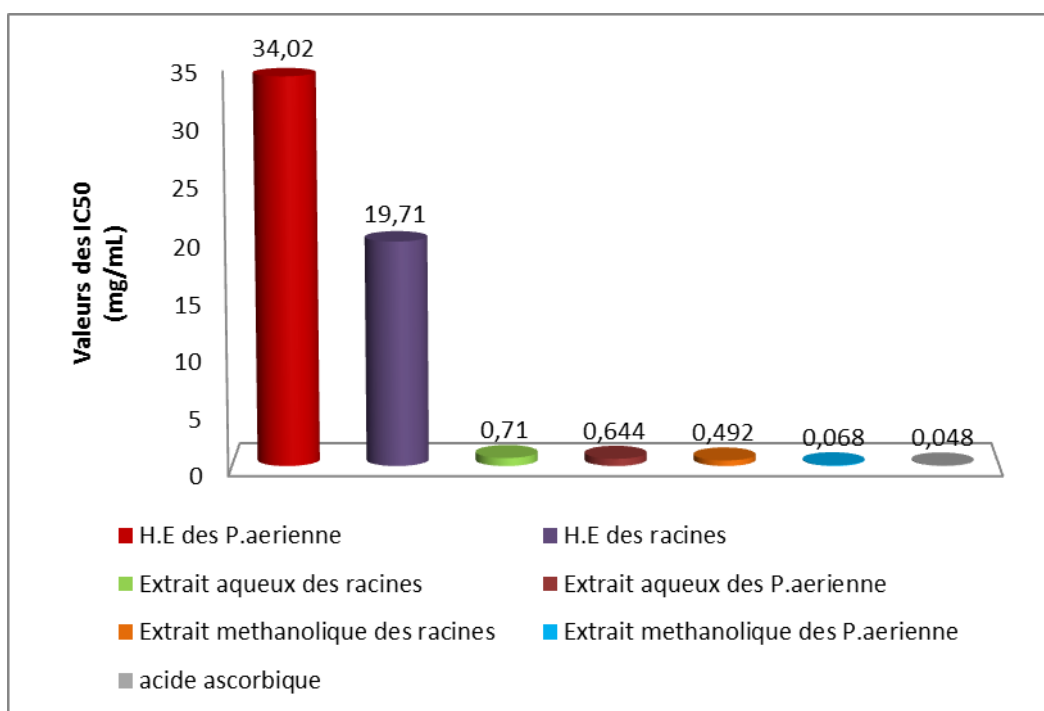
**Tableau IV.6 :** Capacité antioxydante de l'acide ascorbique

Source	Concentrations (mg/mL)	Inhibition (%)	Valeurs des IC <sub>50</sub> (mg/mL)
<b>Acide ascorbique</b>	0,04	39,04	$y = 1486 x - 21,25$ $R^2 = 0,996$ 0,048
	0,05	51,03	
	0,06	68,57	
	0,08	97,84	

L'activité DPPH est généralement présentée par la valeur IC<sub>50</sub> (Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) ; calculée pour chaque extrait, elle permet de les classer entre eux. Plus la IC<sub>50</sub> est petite, plus la molécule est antioxydante. Les résultats (Tableaux IV.3, IV.4 et IV.5), révèlent que tous les extraits testés ainsi que l'acide ascorbique (Tableau IV.6) pris comme référence, sont des antiradicalaires.



Cependant l'extrait méthanolique de la partie aérienne et des racines a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée, respectivement avec des IC<sub>50</sub> de 0.068 et 0.492, suivie par l'extrait aqueux (IC<sub>50</sub> : 0.644 pour la partie aérienne et 0.710 pour les racines) et en dernier l'huile essentielle (19.71 et 34.02 respectivement pour les racines et la partie aérienne). (Figure IV.4)



**Figure IV.4 :** Comparaison des concentrations IC<sub>50</sub> des extraits de *D. crinitus*.

### Conclusion générale

En fonction de ces résultats, il existe une relation entre la teneur totale en phénol et l'activité antioxydante. En effet, il est extrêmement important de souligner qu'il existe une corrélation positive entre le potentiel de l'activité antioxydante et la quantité de composés phénoliques dans les extraits. En outre, comme indiqué dans les données de la littérature [9], l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique peut être attribuée à sa teneur relativement élevée (110.19 mg/ml). Toutefois, les composants responsables des activités antioxydantes des extraits n'ont pas été identifiés et des travaux supplémentaires devraient être menés pour identifier et isoler ces composés bioactifs.

## II. Activité antimicrobienne

Dans les pays en développement, les maladies infectieuses constituent une préoccupation importante de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité [10]. En effet, elles sont à l'origine de plus de 17 millions de décès par an dans le monde, dont plus de la moitié provient du seul continent africain [11]. Divers champignons et bactéries sont impliqués dans ces infections. En dépit des dommages causés par ces micro-organismes nuisibles, le monde scientifique a découvert de nombreux traitements pour soulager les patients. Ces remèdes ont permis de réduire l'incidence des maladies infectieuses surtout dans les pays développés [12]. Les populations pauvres ont toujours eu recours aux plantes pour se soigner. De nos jours, en raison du coût sans cesse élevé des prix des médicaments disponibles, associé à l'émergence de microbes multi-résistants, on note un regain d'intérêt pour la pharmacopée [13, 14,15]. Les populations à faibles revenus sont concernées par ces pratiques [16,17]

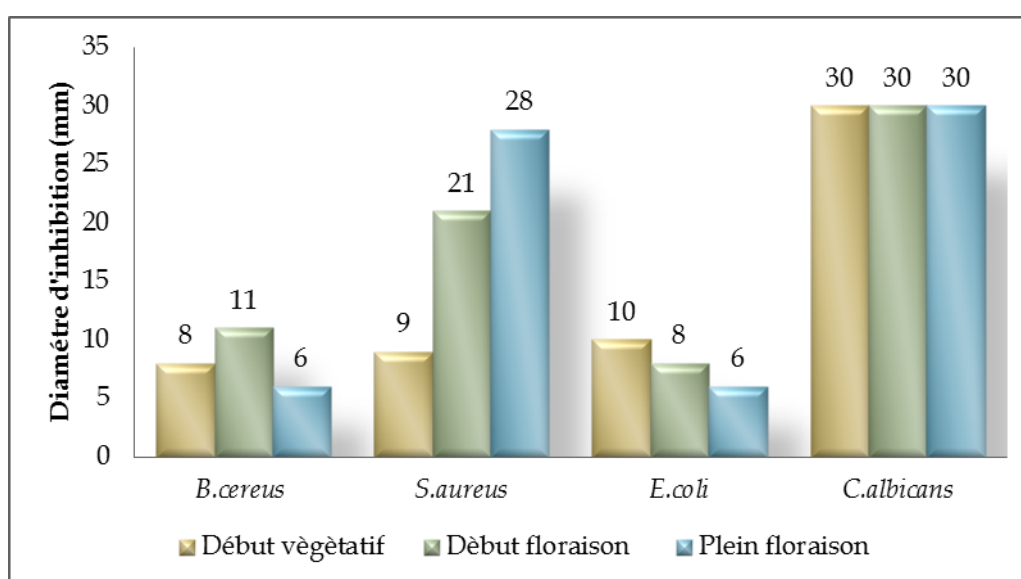
Face à ces différents obstacles d'ordre financier et à la résistance que présente l'emploi des antimicrobiens actuellement disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances à la fois efficaces et à large spectre d'action. Les propriétés antimicrobiennes sont essentiellement dues à la fraction d'huiles essentielles contenues dans ces plantes. Une huile essentielle est composée de plusieurs constituants aromatiques plus ou moins volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : hydrocarbures (composés terpéniques), alcools (ex: géranol), aldéhydes (ex: citral).

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires [18], ou au niveau de la microflore vaginale [19] et d'origine fongique, contre les dermatophytes [20,21] les moisissures allergisantes [22] ou les champignons opportunistes [23] ,Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre [24].

## II.2. Résultats et interprétations

### II.2.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du *D. crinitus*

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *D. crinitus* durant les trois stades végétatifs était évaluée par un test de diffusion sur disque. Les résultats indiqués dans la figure 5 représentent la zone nette d'inhibition dont le diamètre (6 mm) du disque de papier. L'activité biologique a été affectée à l'huile essentielle comme suit: forte activité: zone d'inhibition > 20 mm, une activité modérée: zone d'inhibition < 20 et > 12 mm et aucune inhibition: zone < 12 mm.



**Figure IV.5 :** Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des parties aériennes de *D. crinitus* durant les trois stades végétatifs.

Comme le montre la Figure IV.5, les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles étudiées variaient de 6 à 30 mm avec les plus hautes valeurs des zones d'inhibition observées contre le *C. albicans* (30 mm) et *S. aureus* (28 mm). *C. albicans* est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle provoque des infections fongiques essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique. Toutefois, aux stades début floraison et pleine floraison, les huiles essentielles ont une forte activité antibactérienne contre *S. aureus* avec des diamètres de zones d'inhibition de 21 et 28 mm, respectivement.

Les autres souches bactériennes (*E. coli* et *B. cereus*) n'ont montré aucune inhibition, avec des diamètres de zones entre 6 et 10 mm. De toutes les espèces utilisées, *S. aureus* est l'une des plus commune des bactéries gram-positives qui provoque des intoxications alimentaires. Sa source n'est pas la nourriture elle-même, mais les humains qui contaminent les aliments après qu'ils ont été traités [25]. Ces observations peuvent être attribuées à la nature des composants biologiquement actifs. En effet, divers composés chimiques ont une activité directe contre de nombreuses espèces de bactéries, telles que les terpènes et une variété d'hydrocarbures aliphatiques (alcools, aldéhydes et les cétones). Le caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et le caractère hydrophile de leurs groupes fonctionnels sont d'une importance principale à l'action antimicrobienne des composants d'huiles essentielles.

Un rang d'activité a été proposé comme suit:

Phénols > Alcools > aldéhydes > Cétones > oxyde > esters > hydrocarbure [26]. Par exemple, certaines huiles essentielles contenant des structures phénoliques sont très actifs contre un large spectre de micro-organismes [26, 27]. L'importance du groupe hydroxyle a été confirmée [28, 29]. Les aldéhydes sont connus pour posséder une activité antimicrobienne puissante. Il a été proposé qu'un groupe aldéhyde conjuguée à une double liaison carbone-carbone est un arrangement fortement électronégatif, ce qui peut expliquer leur activité [30], ce qui suggère une augmentation proportionnelle de l'activité antibactérienne avec l'électronégativité [31, 32].

Les alcools aliphatiques ont été signalés à posséder des activités modérée contre plusieurs bactéries. Le diamètre d'inhibition allant de 6 à 10 mm (Figure IV.5 ). L'activité augmente avec la longueur de la chaîne carbonée [33]. Les composés terpéniques ont également montré des propriétés antimicrobiennes qui semblent avoir une activité antibactérienne forte à modérée contre les bactéries Gram-positives et contre les champignons pathogènes, mais en général, une activité plus faible a été observée contre les bactéries Gram négatif [34, 35]. Deuxièmement, il existe des preuves que des composants mineurs ont un rôle crucial à jouer dans l'activité antibactérienne, éventuellement en produisant un effet synergique entre les autres composants. Ceci s'est avéré être le cas pour la sauge [36], certaines espèces de thymus [37] et l'origan [38].

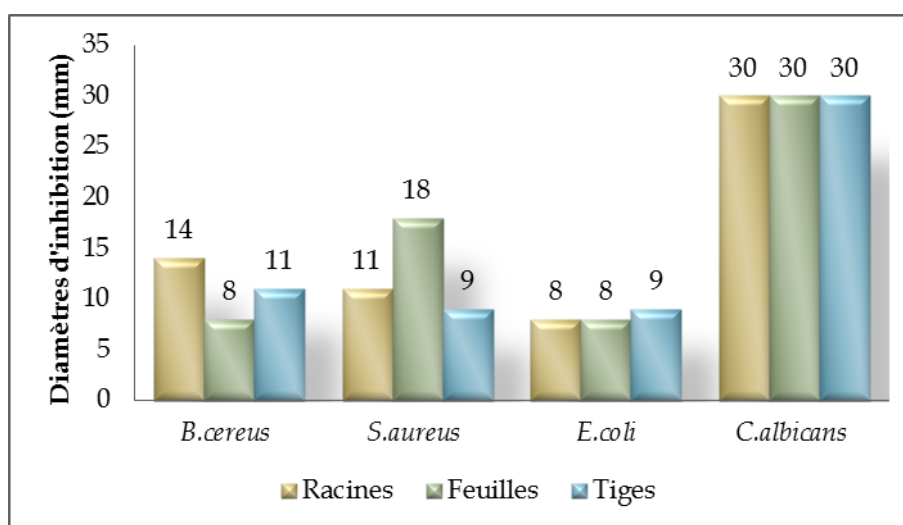
## II.2.2. Activité antimicrobienne des acides gras et des fractions insaponifiables du *D. crinitus*

Les activités antibactériennes in vitro des extraits insaponifiables, méthanoliques et aqueux des racines, feuilles et tiges du *D. crinitus* contre les bactéries utilisées sont qualitativement et quantitativement évaluée par la présence ou l'absence de zones d'inhibition.

### a-Méthodes de diffusion des disques

Comme le montre la figure IV.6, les extraits insaponifiables des racines, feuilles et tiges ont montrés des effets inhibiteurs contre les bactéries pathogènes testés.

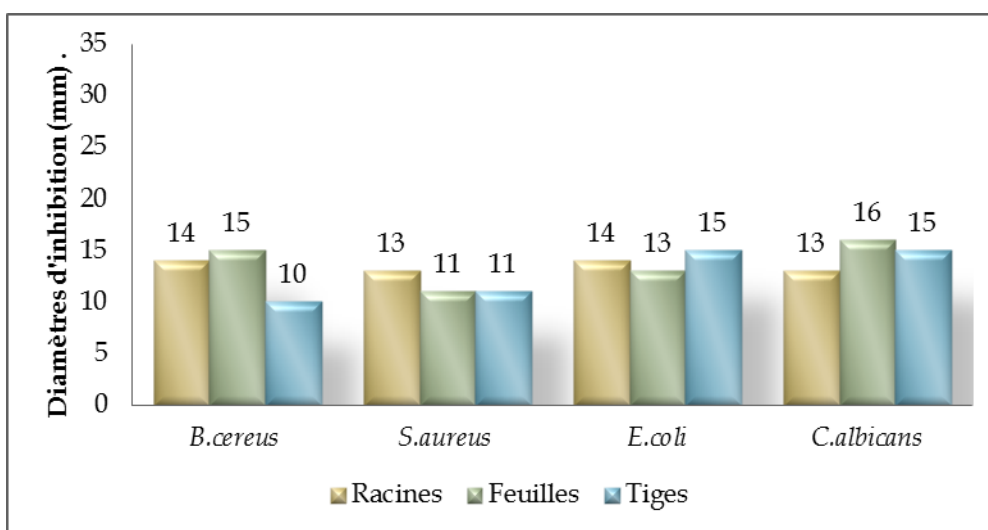
*C. albicans*, *S. aureus* et *B. cereus* ont été jugées les pathogènes les plus inhibés par les extraits insaponifiables avec leurs zones respectives de diamètre d'inhibition de 30 (racines, feuilles et tiges), 18 (feuilles) et 14 (racines) mm. Le reste de la souche bactérienne (*E. coli*) n'a montré aucune inhibition, avec un diamètre de zones d'inhibition allant de 8 à 9 mm (Figure IV.6).



**Figure IV.6 :** Activité antimicrobienne des insaponifiables de *D. crinitus*

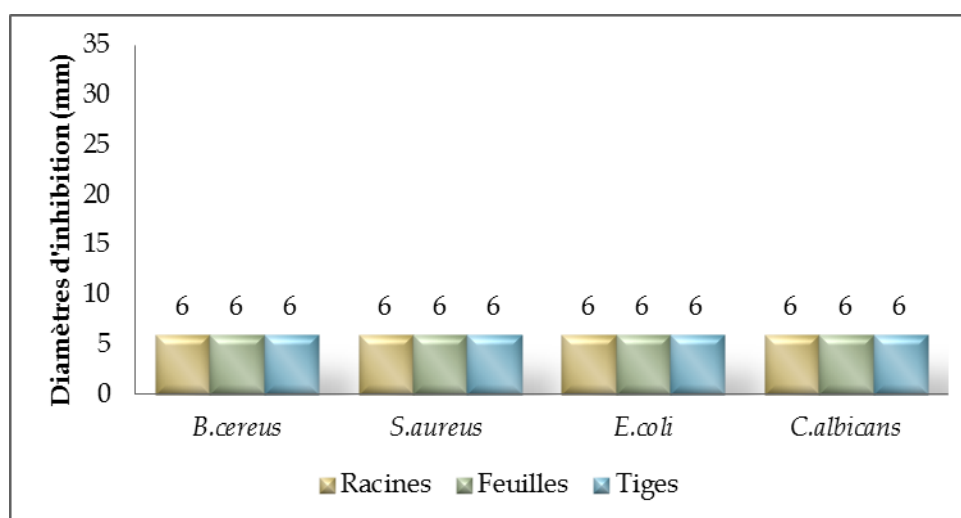
On remarque aussi que les extraits méthanoliques exercent des effets potentiels de l'activité antibactérienne contre les bactéries testées. Cependant, les racines, les feuilles et les tiges présentent des effets inhibiteurs contre *C. albicans* avec des diamètres de zones d'inhibition de 13, 16 et 15 mm respectivement, *E. coli* (14, 13 et

15 mm respectivement), *B. cereus* (14, 15 et 10 mm respectivement) et *S. aureus* (13, respectivement 11 et 11 mm) (Figure IV.7).



**Figure IV.7:** Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de *D. crinitus*

Cependant, les extraits aqueux n'ont montré aucun effet de l'activité antibactérienne contre des bactéries pathogènes testés. (Figure IV.8)



**Figure IV.8:** Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *D. crinitus*

#### b- Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Comme le montre le Tableau IV.7, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus à partir de l'extrait d'insaponifiable qui non seulement a présenté la plus petite valeur de

la CMI (46,5, 56.2 et 76,2 µg/mL pour les extraits des feuilles, tiges et racines respectivement) contre *C. albicans*, mais aussi a inhibé la croissance d'autres micro-organismes.

**Tableau IV.7 :** Concentrations minimales inhibitrices CMI (µg/mL) des extraits des insaponifiables, méthanolique et aqueux *du D. crinitus*

Microorganismes	CMI (µg/mL)								
	Extrait insaponifiable			Extrait méthanolique			Extrait aqueux		
	Racines	Feuilles	Tiges	Racines	Feuilles	Tiges	Racines	Feuilles	Tiges
<b>Gram-positif</b>									
<i>Bacillus cereus</i>	250	255	255	500	500	500	>3000	>3000	>3000
<i>Staphylococcus aureus</i>	136	122.1	122.1	800	800	800	>3000	>3000	>3000
<b>Gram-négative</b>									
<i>Echerichia coli</i>	126	111.5	111.5	1600	1800	1750	>3000	>3000	>3000
<b>Levure</b>									
<i>Candida albicans</i>	76.2	46.5	56.2	400	400	400	>3000	>3000	>3000

Les extraits des insaponifiables des feuilles, des tiges et des racines montrent également un effet antimicrobien fort contre *E. coli* avec des CMI de 111,5, 111,1 et 126 µg/mL, respectivement, et *S. aureus* avec des CMI de 122,1, 122,1 et 136 µg/mL, respectivement, et une activité moyenne sur le *B. cereus* avec des CMI de 255, 255 et 250 µg/mL, respectivement (Tableau IV.7). En utilisant la technique de la méthode de dilution en gélose, les extraits méthanoliques des racines, tiges et feuilles du *D. crinitus* ont montré des propriétés antimicrobiennes à des valeurs de CMI allant de 500 à 1800 µg/mL pour les bactéries et 400 µg/mL pour le *C. albicans*. Les extraits aqueux des racines, feuilles et tiges n'ont montré aucune inhibition des microorganismes dosée jusqu'à la valeur de 3000 µg/mL pour les bactéries et 2000 µg/mL pour les *C. albicans*.

### Conclusion

Les extraits des insaponifiables des racines, feuilles et tiges évalués dans ce travail possèdent différentes variétés de composés phytochimiques qui pourraient être considérés comme responsables de leur activité antimicrobienne. Bien qu'ils se

produisent habituellement sous forme de mélanges complexes, leur activité peut généralement être prise en compte en fonction de leurs principaux composants. L'activité antimicrobienne des extraits des insaponifiables des racines, feuilles et tiges pourrait être due à la sensibilité de la souche étudiée pour le dodécanol,  $\alpha$ -pinène, sabinène, limonène et les autres composants plus légers présents dans les extraits des insaponifiables [39,40,41].

### **II.2.3. *D. muricatus***

#### **Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *D. muricatus***

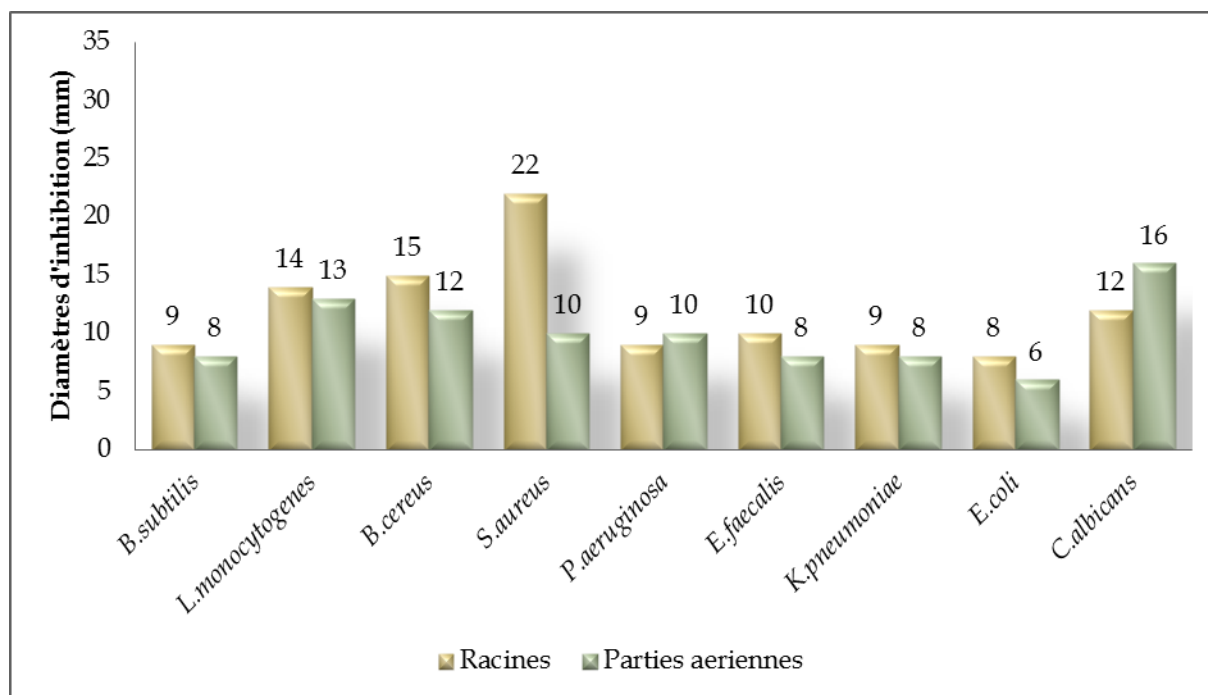
Les activités antibactériennes in vitro des huiles essentielles à partir des racines et des parties aériennes du *D. muricatus* contre neuf micro-organismes pathogènes étaient évaluées qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence des zones d'inhibition.

#### **a-Méthode de diffusion :**

L'examen préalable de l'activité antimicrobienne in vitro des huiles essentielles de l'espèce *D. muricatus* contre les bactéries employées, a été étudié par la technique de diffusion des disques sur gélose. Les résultats ont montré une variation dans les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de la plante (Figure IV.9). L'huile essentielle a montré une forte activité: zone d'inhibition > 20 mm, une activité modérée: zone d'inhibition < 20 et > 12 mm et aucune inhibition: zone < 12 mm. L'activité la plus élevée était démontrée contre *S. aureus* par l'huile essentielle de la racine (diamètre de la zone d'inhibition 22 mm), tandis que la plus basse était démontrée contre *E. coli* par l'huile des parties aériennes (diamètre de la zone d'inhibition de 6 mm). D'autre part, *C. albicans*, *B. cereus* et *L. monocytogenes* étaient également sujettes à une inhibition de la croissance avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 12 à 16 mm.

Les autres souches bactériennes (*B. subtilis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. coli*) n'ont montré aucune inhibition avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 8 à 10 mm (Figure IV.9).





**Figure IV.9 :** Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des racines et des parties aériennes de *D. muricata*

#### **b- Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)**

Les deux effets antibactériens et antifongiques relevés sont présentés dans le Tableau IV.8. En général, les huiles des racines ont montré une plus grande activité contre les bactéries que les huiles des parties aériennes. L'action inhibitrice la plus importante de l'huile des racines était observée contre *S. aureus* avec une CMI de 8  $\mu\text{g/mL}$ . Toutefois, *B. cereus* et *L. monocytogenes* ont montré une bonne activité avec des valeurs de CMI de 65  $\mu\text{g/mL}$ . Quant à l'effet antifongique, l'huile des parties aériennes était efficace contre la levure pathogène *C. albicans* (CMI = 45  $\mu\text{g/mL}$ ) et une activité antimicrobienne moyenne sur le *B. cereus* et *L. monocytogenes* avec une CMI de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Il convient de noter que la concentration maximale testée (6000  $\mu\text{g/mL}$ ) n'a pas eu d'effet sur la croissance des autres micro-organismes.

**Tableau IV.8** : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *D. muricatus*

Microorganismes	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Racines	Parties aériennes
<b>Gram-positif</b>		
<i>B. subtilis</i>	>6000	> 6000
<i>L. monocytogenes</i>	65	250
<i>B. cereus</i>	65	250
<i>S. aureus</i>	8	>6000
<i>P. aeruginosa</i>	>6000	>6000
<i>E. faecalis</i>	>6000	>6000
<b>Gram-négatif</b>		
<i>K. pneumoniae</i>	>6000	>6000
<i>E. coli</i>	>6000	>6000
<b>Levures</b>		
<i>C. albicans</i>	95	45

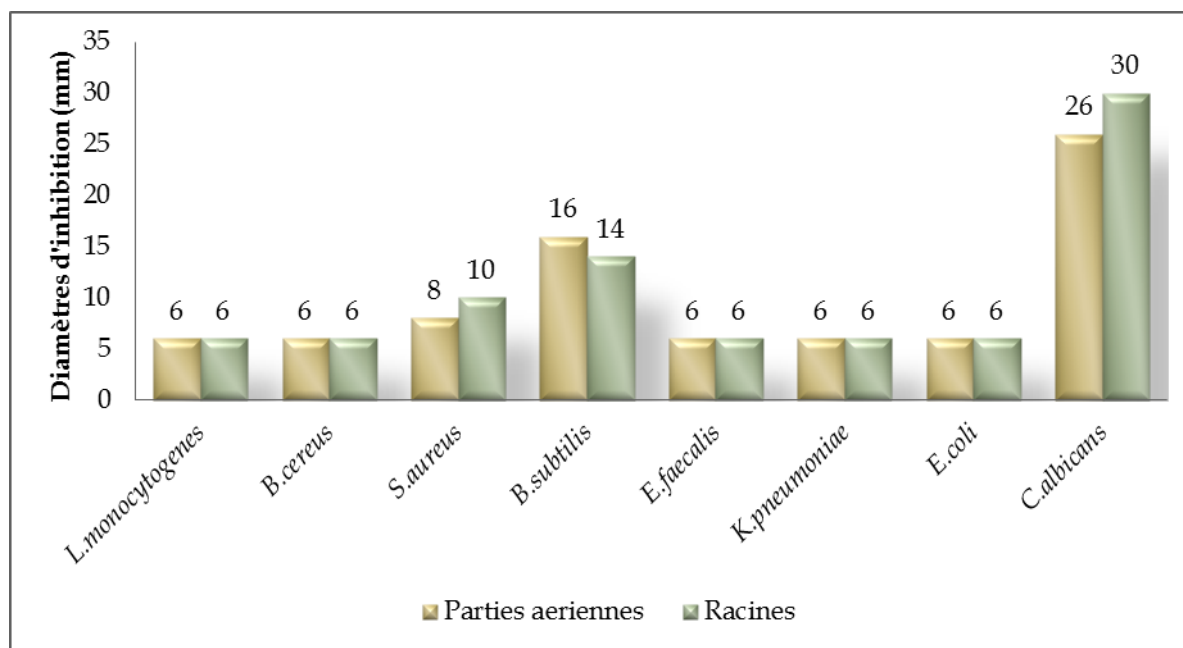
Divers composés chimiques des huiles de *D. muricatus* isolés par hydrodistillation, ont une activité directe contre de nombreuses espèces de bactéries, telles que les terpènes et une variété d'hydrocarbures aliphatiques (alcools, aldéhydes et cétones). L'activité de l'huile des racines peut s'expliquer au moins partiellement par sa teneur en undecan-2-one (10,2%). Cette cétone a précédemment démontrée une activité antimicrobienne et nématocide [42,43]. L'activité la plus élevée de l'huile des racines par rapport à l'huile des parties aériennes peut être attribuée à ce fait. Une autre classe importante de cette huile : les alcools aliphatiques, qui ont été déjà signalés comme des composés antimicrobiens, possèdent des activités modérées contre plusieurs bactéries [44].

#### II.2.4. *D. carota ssp. hispanicus*

##### II.2.4.1. Résultats de l'activité antibactérienne

###### a-Méthode de diffusion :

On a évalué l'activité antibactérienne de l'huile essentielle contre des souches pathogènes de Gram positive (*S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* et *B. subtilis*) et les bactéries Gram négative (*E. coli* et *K. pneumoniae*).



**Figure IV.10 :** Activité antimicrobienne des racines et des parties aeriennes de *D. carota ssp. hispanicus*

Selon les résultats donnés dans la (Figure IV.10), les deux huiles essentielles ont montré une forte activité antimicrobienne contre *C. albicans*. La moyenne de la zone d'inhibition de l'huile essentielle du *D. carota ssp. hispanicus* contre *C. albicans* est située à 26 et 30 mm pour les parties aériennes et les racines, respectivement. Toutefois, *B. subtilis* est aussi sujette à une inhibition modérée de la croissance avec des diamètres d'inhibition allant de 14 à 16 mm. Les autres souches bactériennes (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *E. coli*) n'ont montré aucune inhibition, avec des diamètres d'inhibition allant de 6 à 10 mm (Figure IV.10).

#### **b- Concentrations minimales inhibitrices (CMI)**

L'activité antimicrobienne des racines et des parties aériennes des huiles essentielles a été confirmée par le dosage de bouillon de microdilution. Comme, le montre le tableau IV.9, les résultats les plus prometteurs étaient obtenus à partir de l'huile de la partie aérienne qui avait la valeur de CMI la plus faible (0,078 mg/mL) contre *C. albicans*. L'huile de la partie aérienne a également montré un effet antimicrobien contre

*B. subtilis* et *S. aureus* avec une CMI de 1,2 et 4,8 mg/mL, respectivement. Il convient de noter que la concentration la plus élevée testée (5 mg/mL) n'a eu aucun effet sur la croissance des autres micro-organismes (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *E. coli*).

L'huile essentielle du *D. carota ssp. hispanicus* est principalement composée, par deux types de composés phénoliques (myristicine et apiole). Cependant, un grand nombre de composés phénoliques présentent un large spectre d'effets biologiques, en particulier l'activité antimicrobienne [45,46]

**Tableau IV.9 :** Activité antimicrobienne du *D. carota ssp. hispanicus* utilisant la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Souches bactériennes	CMI (mg/mL)		Gen (mg/mL)	Am B (mg/mL)
	Parties aériennes	Racines		
<b>Gram-positif</b>				
<i>L. monocytogenes</i>	> 5	> 5	nt	-
<i>B. cereus</i>	> 5	> 5	nt	-
<i>S. aureus</i>	4.8 ± 0.6	4.2 ± 0.6	0.128 ± 0.02	-
<i>B. subtilis</i>	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.5	0.156 ± 0.09	-
<i>E. faecalis</i>	> 5	> 5	nt	-
<b>Gram-négatif</b>				
<i>K. pneumoniae</i>	> 5	> 5	0.625 ± 0.08	-
<i>E. coli</i>	> 5	> 5	0.256 ± 0.08	-
<b>Levure</b>				
<i>C. albicans</i>	0.078 ± 0.02	0.125 ± 0.04	-	0.312 ± 0.02

Am B: Amphotericine B (10 µg/mL); Gen: Gentamycine (10 µg/disc); MIC = concentration minimale inhibitrice (mg/mL); nt: non testé.

#### II.2.4.2. Résultats de l'activité fongicide

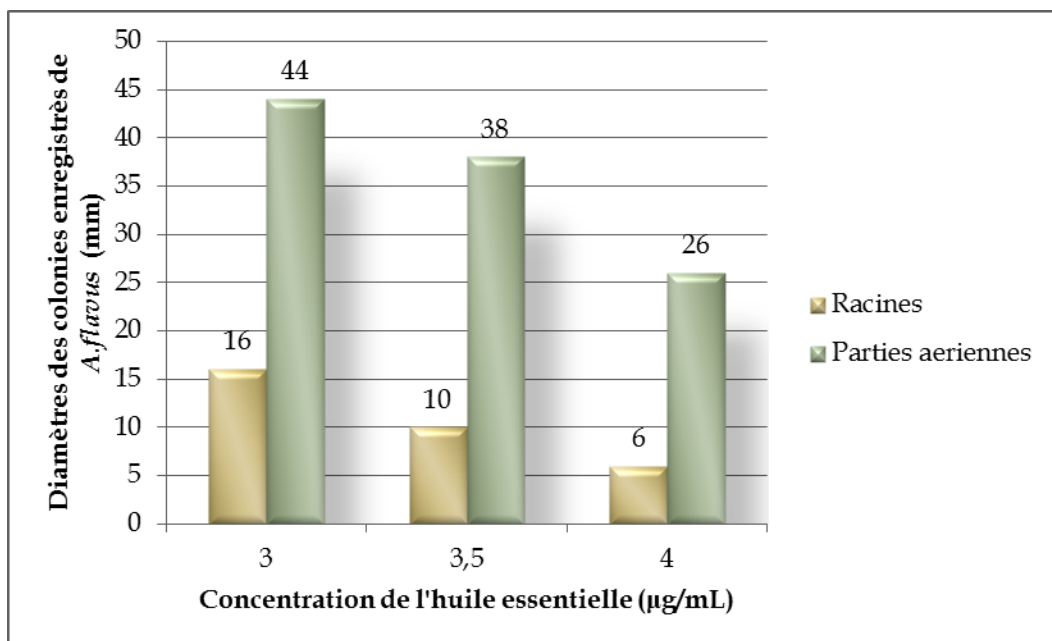
Les résultats des essais in vitro ont montré que l'huile essentielle des racines du *D. carota ssp. hispanicus* a eu un effet fongicide puissant contre la croissance de *A. flavus*. Les résultats sont donnés dans la (Figure IV.11).

La CMI et CMF de l'huile essentielle de la racine du *D. carota* ssp. *hispanicus*, était retrouvé à 4,0 µl/mL contre la souche toxigène de *A. flavus*, respectivement. Les résultats de l'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage (PI), présentés dans la (Figure IV.12), indiquaient que la croissance radiale des souches était totalement inhibée par l'huile essentielle. Le pourcentage d'inhibition de la croissance (PI) était significativement influencé par le temps d'incubation et la concentration en huile essentielle. La croissance du mycélium était considérablement réduite avec l'augmentation de la concentration d'huile essentielle. L'huile essentielle des racines était plus active que l'huile des parties aériennes.

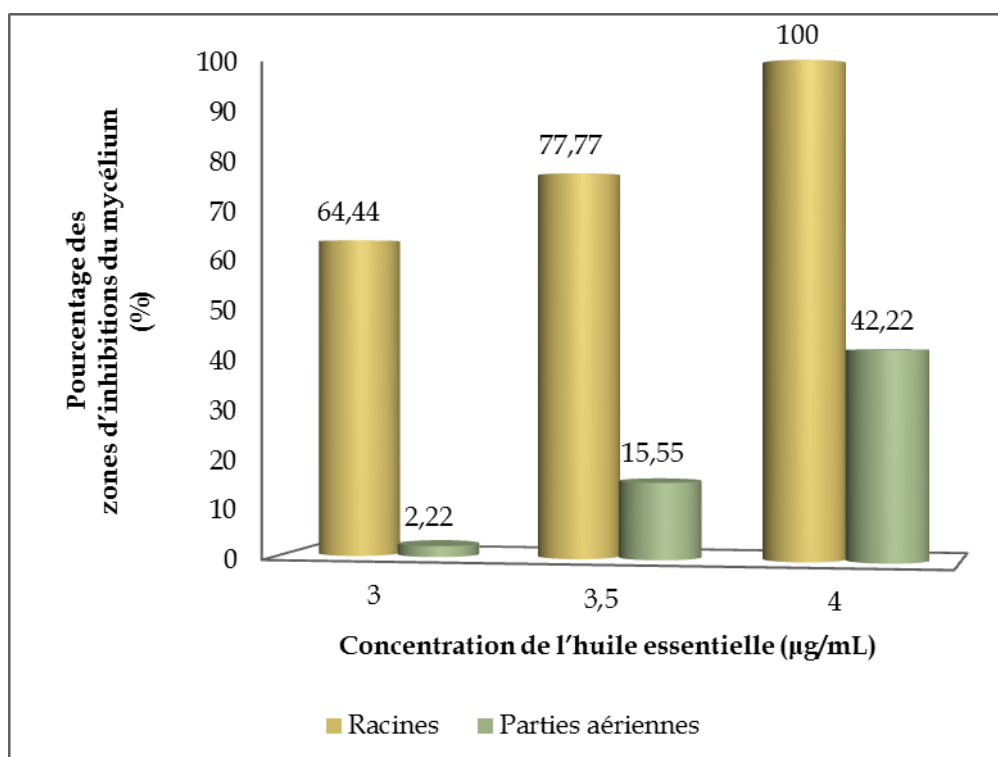
Le pourcentage de la zone d'inhibition et la valeur de la concentration minimale d'inhibition de l'huile de la racine ont été enregistrés en tant que 100% et à 4 µg/mL au bout de 8 jours, respectivement. (Figure IV.12). En outre, la concentration de 4 µg/mL avec l'huile essentielle des parties aériennes présentait une faible inhibition, avec un pourcentage de réduction de 42.22 % après 8 jours (Figure IV.12). L'huile essentielle des racines était efficace contre *A. flavus*. La bioactivité de l'huile essentielle peut être due à la présence de certains composants hautement fongitoxiques tel que les phénylpropanoïdes [47]. Par exemple, l'apiole a déjà été signalé comme un inhibiteur spécifique de l'aflatoxine [48].

**Tableau IV.10:** Effet de l'huile essentielle du *D. carota* ssp. *hispanicus* contre les champignons pathogènes *A. flavus* par la technique de petriplate inversé

Essais	Diamètres des colonies enregistrés de l' <i>A. Flavus</i> (mm)			Pourcentage des zones d'inhibitions du mycélium		
	3.0	3.5	4.0	3.0	3.5	4.0
<b>Concentration de l'huile essentielle (µg/mL)</b>						
<b>Racines</b>	16 ± 0.4	10 ± 0.0	6 ± 0.0	64.44 ± 0.8	77.77 ± 0.9	100 ± 0.00
<b>Parties aériennes</b>	44 ± 0.8	38 ± 0.9	26 ± 0.5	2.22 ± 0.1	15.55 ± 0.5	42.22 ± 0.8



**Figure IV.11 :** Effet de l'huile essentielle du *D.carota ssp. hispanicus* contre les champignons pathogènes de *A. flavus*



**Figure IV.12 :** Pourcentage des zones d'inhibitions du mycèlium en fonction des concentrations de l'huile essentielle de *D.carota ssp hispanicus*.

### II.3.Conclusion :

La méthode de diffusion des disques est la plus couramment utilisée dans le domaine de recherche des principes actifs contenus dans les huiles essentielles; elle présente l'avantage d'être rapide, d'une grande simplicité à mettre en œuvre et ne nécessite qu'une faible quantité de matrice. S'agissant des inconvénients, une huile très visqueuse, voire une huile qui cristallise, aura un diamètre d'inhibition faible ou nul même si elle est fortement bactéricide. Cela est dû, dans ces cas à un problème de diffusion sur le gel.

Par contre, la méthode de dilution en milieu liquide, est complémentaire à la précédente, elle donne directement la CMI, mais, par rapport à l'autre méthode, elle présente l'inconvénient d'être grande consommatrice en temps d'expérience et en quantité de matrice nécessaire.

Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles du *D. crinitus* ont été testées sur quatre micro-organismes différents. Les huiles essentielles des différents stades phénologiques ont montré une forte activité contre *C. albicans* (30 mm) et *S. aureus* (11-28 mm), ce sont des souches de bactéries qui sont considérées comme très dangereuses et très difficile à éliminer. Ainsi, elles représentent une source de substances antibactériennes naturelles qui peuvent potentiellement être utilisées dans les systèmes de pathogènes.

Les extraits insaponifiables et méthanoliques des racines, feuilles et tiges étaient actifs contre *B. cereus*, *S. aureus*, *Escherichia coli* et *C. albicans*.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des racines du *D.muricatus* contre huit souches bactériennes et une levure était révélée active contre *S. aureus*, tandis que l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes était active contre la levure *C. albicans*.

En outre, les huiles essentielles des racines du *D. carota ssp. hispanicus* se sont révélées être parfaitement fongicides et inhibitrices de la production d'aflatoxines et la valeur de la concentration d'inhibition minimale enregistrée était de 4µg / mL au bout de 8 jours.

## Références bibliographiques

- [1] Harborne JB. *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman & Hall, London, 1998.
- [2] Portes E. *Synthèse et Etudes de Tétra hydro curcuminoïdes: Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle*. Thèse de doctorat Université Bordeaux I, 2008, 44-46 pp.
- [3] Alyafi Alzhri G. *Determination of chemical composition of Prangos and the possibility to use in the applied field*, Damascus University, 2007, 54 pp.
- [4] Butterfield D, Lauderback C. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta peptide associated free radical oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 32:1050-1060.
- [5] Gardner P. Superoxide-driven a conitase FE-S center cycling. *Bio science Rep.*, 1997, 17: 33-42.
- [6] Molyneux P. The use of stable free radical diphenyl picril hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 2004, 26: 211-219.
- [7] Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004, 266: 37-56.
- [8] Van Antwerpen P. *Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase/peroxyde d'hydrogène/chlorure*. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles, 2006.
- [9] Béliveau R, Gingras D. *Les aliments contre le cancer*. Ed du Trécarré, Outremont, 2005, 213pp.
- [10] Bourgeois A, *Les MST/SIDA au Cameroun. Bidiagnostic and therapy*. Magasine bilingue de santé au Cameroun No004 ,1999.
- [11] OMS. *Maladies infectieuses en Afrique. Situation et perspectives d'action*. 7ème Réunion du forum pour le partenariat avec l'Afrique. Moscou, Russie, 2006, 19 pp.
- [12] Soro D, Koné MW, Kamanzi AK. Evaluation de l'activité antibactérienne et anti-radical libre de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire. *Europ. J. Sci. Res.*, 2010, 40: 307-317.



- [13] Kaboré ZI, Millogo/Koné H. Étude antibactérienne *in vitro* d'extraits alcaloïdiques de *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae) vis-à-vis d'*Escherichia coli* Entéropathogène, Sérotype 0127. *Revue Pharmacopée et Médecine traditionnelles africaines*, 1997, 9: 17-23.
- [14] Akoua KC, Guessend N, Gbonon V, Faye-kette AYH, Dosso M. Methicillini-resistant of *S. aureus* activity: A new hospital problem. *Medecines Maladies Infectieuses*, 2004, 34: 132-36.
- [15] Guillemot D, Maugendre P, Vhauvin, Sermé TC. Consommation des antibiotiques en France. *BEH*, 2004, 3233: 141-147.
- [16] Emurawa AC. Antibacterial substance rom *Carica papaya* fruit extract. *J Nat Prod.*, 1982, 45 : 123-127.
- [17] De Souza C, Amegavi KK, Koumaglo K, Gbeassor M. Étude de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux totaux de dix plantes médicinales. *Rev Méd Pharmaco afr.*, 1993, 7: 109-115 .
- [18] Pellecier J, Jacob M, Simeon Bouchberg M. Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plant Médecin Phytothér.*, 1980, 14: 83-98.
- [19] Viollon C, Leger D, Chaumont JP. Activités antagonistes *in vitro* de certains composés volatils naturels vis-à-vis de germes de la flore vaginale. *Plant Méd Phytothér.*, 1993, 26: 17-22.
- [20] Chaumont JP, Leger D. Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement voisins, relation structure-activité. *Plant Méd Phytothér.*, 1989, 23: 124-128.
- [21] Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM. Antifungal activity of essential oils obtained from plants against dermatophytes, *Mycoses*, 1993, 36: 333-336.
- [22] Chaumont JP, Leger D. Lutte contre les moisissures allergisantes des habitations. Propriétés inhibitrices de l'huile essentielle de Géranium "Bourbon", du citronellol, du géraniol et du citral. *Ann Pharm Fr.*, 1992, 50: 156-166.
- [23] Viollon C, Chaumont JP. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 1994, 128: 151-153.
- [24] Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J Agr Food Chem.*, 1996, 44: 1202-1205.

- [25] Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, *Inter J of Food Microbiol.*, 2000, 56: 3-12.
- [26] Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem.*, 2003, 10: 813-829.
- [27] Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L, *J Agri Food Chem.*, 2003, 51: 3958–3965.
- [28] Dorman H JD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *J Applied Microbiol.*, 2000, 88: 308-316.
- [29] Lawrence BM. A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries, in *New Crops*, J. Janick, J. E. Simon, Eds., Wiley, New York, 1993, 620-627.
- [30] Moleyar V, Narasimham P. Antifungal activity of some essential oil components, *Food Microbiol.*, 1986, 3: 331-336.
- [31] Kurita N, Miyaji M, Kurane R. Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants, *Agriclt and Biol Chem.*, 1979, 43: 2365-2371.
- [32] Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y. Antifungal activity of components of essential oils, *Agriclt and Biol Chem.*, 1981, 45: 945-952.
- [33] Kabelitz N, Santos PM, Heipieper HJ, Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*, *FEMS Microbiol Lett.*, 2003, 220: 223-227.
- [34] Hada T, Shiraishi A, Furuse S. Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Natural Medicines*, 2003, 57: 64-67.
- [35] Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M, Sökmen A. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *thymus eigii*, *J Agri Food Chem.*, 2004, 52: 1132-1137.
- [36] Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*, *Inter J of Food Microbio.*, 2001, 67: 187-195.
- [37] Lattaoui N, Tantaoui-Elaraki A. Individual and combined oils, *Rivista Italiana EPPOS*, 1994, 13: 13-19.

- [38] Paster N, Menasherov M, Ravid U, Juven B, Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain, *J Food Protect.*, 1995, 58: 81-85.
- [39] Magiatis P, Melliou E, Skattsounis AL, Chinou IB, Mitaku S. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus var chia*. *Planta Med.*, 1999, 65 :749-52.
- [40] Oussou KR, Yolou S, Boti JB, Guessend KN, Kanko C, Ahibo C, Casanova J. Etude chimique et activité Anti-diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *Eur J Sci Res.*, 2008, 24: 94-103.
- [41] Oussou KR, Kanko C, Guessend N, Yolou S, Koukoua G, Dosso M, N'Guessan YT, Figueredo G, Chalchat JC. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie*, 2004, 7: 1081-1086.
- [42] Benhadj FM, Marzouk B, Chraif I, Boukef K. Analysis of tunisian *Ruta graveolens* L. oils from Jemmel. *J Food Agr Environ.*, 2007, 5: 52–55.
- [43] Nikoletta G, Francesca N, Manconi, Leonti M, Maxia A, Caboni P. Aliphatic Ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) Induce Paralysis on Root Knot Nematodes. *J Agric Food Chem.*, 2011, 59: 322-332.
- [44] Kabelitz N, Santos PM, Heipieper HJ. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol Lett.*, 2003, 220: 223-227.
- [45] Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yoshinari T, Rezaee MB, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Int J Food Microbiol.*, 2008, 123: 228-33.
- [46] Razzaghi-Abyaneh M, Yoshinar T, Sams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Nagasawa H, Sakuda S . Dillapiol and Apiol as specific inhibitors of the biosynthesis of Aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2007, 71: 232923-32.

### Conclusion générale

Les plantes médicinales ont été, depuis la nuit des temps, l'arsenal thérapeutique de l'homme. Marginalisées depuis plusieurs décennies, elles connaissent en ce moment un regain d'intérêt considérable de la part du public et des chercheurs entre autres.

L'Algérie de par son climat (méditerranéen, aride) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existe à l'état spontané. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier certaines plantes, poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Tlemcen.

Ce travail avait pour objet, l'extraction, l'analyse chimique et l'activité biologique des huiles essentielles de trois espèces appartenant au même genre *Daucus* de la famille des Apiacées.

L'intérêt majeur de l'Edt-MEPS est son application aux plantes ne renfermant pas ou très peu d'huile essentielle; dans ce cas, elle devient la seule technique capable de fournir une information sur les composés volatils de la plante.

En effet, l'étude menée sur les deux espèces *D. crinitus* et *D. muricatus* a confirmé l'intérêt de mettre en œuvre l'Edt-MEPS en tant que méthode d'extraction simple et rapide pour accéder aux composés volatils. En utilisant les analyses CPG-Ir et CPG-SM, les huiles essentielles et les matières volatiles extraites des organes séparés du *D. crinitus* ont été étudiées en utilisant l'Edt-MEPS. Les analyses des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation nous ont permis d'identifier 72 composants, alors que les fractions volatiles extraites à l'aide de la MEPS ont montré la présence de 79 composés.

Deux types d'huiles essentielles ont été produits par le *D. crinitus* : les huiles des racines ont eu les composés aliphatiques comme composant principal (87,0-90,1 %) et les huiles des parties aériennes avaient comme composés majeurs les phénylpropanoïdes (43,1-88,6 %). L'analyse Edt-MEPS a montré une répartition plus

## Conclusion générale

---

précise des composés dans les organes étudiés: les composés aliphatiques oxygénés sont bien représentés dans les racines (44,3-84,0 %), les composés aliphatiques hydrocarbonés étaient dans les feuilles et les tiges (22,2-87.9 %) et phénylpropanoïdes étaient dans les fleurs et les ombelles (47,9-64,2 %). Par ailleurs, l'Edt-MEPS a permis l'identification de l'isochavicol (29,6-34,7%) en tant que composant principal dans les feuilles du *D. crinitus*, mais il n'a pas été détecté dans les huiles, probablement en raison de sa solubilité dans l'eau. Cette étude a démontré que l'extraction Edt-MEPS peut être considérée comme une technique alternative pour isoler les substances volatiles des plantes aromatiques.

En ce qui concerne le *D. muricatus*, les analyses chimiques montrent que l'huile des racines est principalement composée par des oxygénés non-terpéniques (59,8 g/100g), et les huiles des parties aériennes (les feuilles, les tiges, fleurs, et ombelles) sont principalement composées par des composés terpéniques hydrocarbonés (62,3-72,2g/100 g).

La composition chimique de la fraction volatile isolée à partir des différents organes du *D. muricatus*, montre que les principales composantes volatils émises par la plante sont des composés hydrocarbonés (60,7-82,2 g/100 g). Seules des différences quantitatives ont été observés. Les différences chimiques observées entre les huiles essentielles et les fractions volatiles extraites par hydrodistillation et MEPS, peuvent être expliquées par le fait que la première technique (HD) est basée sur l'extraction quasi totale de la matière volatile de la plante et la deuxième technique (MEPS) était contrôlée par une étape d'équilibre solide/gaz. Au cours de l'hydrodistillation, les composés les plus volatiles et les composés solubles dans l'eau sont perdus dans la phase gazeuse et l'hydrolat, respectivement, alors qu'avec l'extraction MEPS, c'est l'affinité des fibres de chaque composé qui surveille le prélèvement des matières volatiles.

La variation de la composition chimique des huiles essentielles pour la même espèce peut être due à de nombreux facteurs, tels que les facteurs génétiques, les stades phénologiques, les conditions environnementales et les conditions pédoclimatiques.

## Conclusion générale

---

Pour étudier cette variation selon les stades phénologiques, les huiles essentielles à partir des parties aériennes du *D. crinitus* ont été analysées à trois stades de développement (début végétatif, début de floraison, et la pleine floraison). Le rendement en huile variait en fonction du stade de développement, et la plus forte teneur en huile (0,15% p/p) a été obtenue à la pleine floraison. La composition chimique des huiles essentielles a montré que, quel que soit le stade de l'analyse, les composés phénoliques ont été le groupe le plus abondant. Leur niveau augmentait de façon significative au cours de la maturation et variait de 36,4 à 82,1%. Cependant, les composés phénoliques et aliphatiques sont les principaux composants lors de la phase du début végétative.

Pour l'espèce *D. carota ssp. hispanicus* l'analyse chimique a permis l'identification de 68 composés représentant 92,3 à 98,5% des huiles essentielles des parties aériennes et 8 éléments représentant 97,4 à 99,4% des huiles essentielles des racines. Les huiles essentielles ont été dominées par des composés phénylpropanoïdes, ils comptaient pour 93,6 à 97,1% dans les racines et de 67,2 à 86,3% pour les parties aériennes. Les principaux composés des huiles essentielles des parties aériennes étaient la myristicine (62,9-86,2%), l'épi-globulol (1.1-6.6%), le germacrène D (1,2-5,3%) et l'apiole (1.1-4.1%), alors que les huiles des racines sont constituées de la myristicine (de 15,6 à 83,4%) et l'apiole (de 13,2 à 81,3%).

L'étude de la variabilité des huiles essentielles du *D. carota ssp. hispanicus* provenant de dix sites d'échantillonnage de l'ouest algérien a révélé que la variabilité de la composition chimique des huiles essentielles des racines (quantités de myristicine et de apiole) était en fonction des paramètres environnementaux. Inversement, il a été prouvé que les huiles des parties aériennes n'ont pas été affectées par les facteurs pédoclimatiques.

Après l'étude des huiles essentielles de cette espèce, nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition des acides gras et des extraits insaponifiables du *D. crinitus*, qui n'ont jamais été signalés dans les études antérieures. Les fractions d'acides gras des différents organes (feuilles, tiges et racines) ont été caractérisées par l'acide laurique

## Conclusion générale

---

(17,9, 17,5 et 18,1% respectivement) et d'autres acides gras à longue chaîne (jusqu'à C22 ).

Les fractions insaponifiables des différents organes du *D. crinitus* ont montré des quantités élevées de composants aliphatiques (83,4, 87,2 et 91,4 %, respectivement). Les composants monoterpènes, diterpènes et sesquiterpène étaient présents en faibles pourcentages.

Afin de trouver de nouveaux produits bioactifs naturels, les activités antimicrobiennes des composants des huiles essentielles et des extraits ont été étudiées. Les activités antimicrobiennes des huiles du *D. crinitus* a été testées sur quatre micro-organismes différents. Les huiles des différents stades phénologiques ont montré une forte activité contre *C. albicans* (30 mm) et *S. aureus* (11-28 mm), des souches de bactéries qui sont considérées comme très dangereuses et très difficiles à éliminer.

Cependant, les extraits des insaponifiables et des extraits méthanoliques, et aqueux (des feuilles, tiges et racines) du *D. crinitus* étaient actifs contre *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans*.

En outre, l'huile essentielle des racines du *D. muricatus* contre huit souches bactériennes et une levure était active contre *S. aureus*, tandis que l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes était active contre la levure *C. albicans*.

L'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles du *D. carota ssp. hispanicus* étaient testé contre des microorganismes importants et se sont révélées être parfaitement fongicides et inhibitrices de la production d'aflatoxines. La valeur de la concentration d'inhibition minimale enregistrée était de 4 µg/mL au bout de 8 jours.

Les résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits de solvant de *D. crinitus* ont montré que l'extrait méthanolique avait la plus haute teneur en composés phénoliques totaux (130,19 mg GA/mg d'extrait) et la plus forte activité antioxydante (89,82 %) en utilisant la méthode DPPH. Cependant, les composantes responsables des activités antioxydantes des extraits n'ont pas été identifiées et les

## **Conclusion générale**

---

travaux supplémentaires devraient être menés pour identifier et isoler ces composés bioactifs.

Enfin, il serait intéressant de tester l'activité antioxydante par d'autres méthodes et d'évaluer les extraits étudiés par des tests *in vivo* pour permettre de déceler éventuellement l'utilité de nouveaux agents en phyto-thérapeutiques et en agroalimentaire comme conservateurs alimentaires naturels.



ملخص:  
النباتات الطبية على حد سواء المنتج النهائي للاستهلاك والمواد الخام لإنتاج المواد الفعالة. أنها تمثل مصدرا هاما من مصادر الدخل لكثير من الناس.  
الجزائر هي موطن لمجموعة كبيرة ومتنوعة من الأنواع ويوضح ما هو الثراء النباتي لا يمكن إنكارها. وهذا هو السبب ونحن مهتمون في دراسة بعض النباتات التي تنمو في البرية في جبال منطقة تلمسان.  
هو بالنسبة لنا للمساهمة في التوصل إلى فهم أفضل من ثلاثة أنواع من نفس جنس *daucus* الأسرة *Apiaceae*.  
في هذا السياق، وتتمثل الأهداف الرئيسية لهذا العمل يمكن تلخيصها على النحو التالي: استخراج الزيوت العطرية من ثلاثة أنواع *D. muricatus*، *D. carota SSP hispanicus* و *Daucus crinitus*. تحديد التراكيب الكيميائية من خلال طرق التحليل المختلفة: GC والتقييم GC-MS في المختبر لبعض الأنشطة البيولوجية (المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة)، وتحديد المركبات المسؤولة عن النشاط العام من الضروري التفت.

كلمات البحث:  
*D. carota hispanicus SSP*، *D. muricatus*، *Daucus crinitus*، والزيوت العطرية، المضادة للجراثيم، المضادة للأكسدة.

## Résumé :

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. Elles représentent une source de revenu non négligeable pour de nombreuses populations.

L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier certaines plantes, poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Tlemcen.

Il s'agit pour nous de contribuer à une meilleure connaissance de trois espèces appartenant au même genre *daucus* de la famille des Apiacées,

Dans cette optique, les objectifs principaux de ce travail peuvent se résumer ainsi: l'extraction des huiles essentielles des trois espèces *Daucus crinitus*, *D. muricatus* et *D. carota ssp hispanicus*. la détermination de leurs compositions chimiques par les différentes méthodes d'analyses : CPG et CPG-SM, l'évaluation, in vitro, de quelques activités biologiques (antimicrobienne et antioxydante) et l'identification des composés responsables de l'activité globale de l'huile essentielle.

**Mots clés :** *Daucus crinitus*, *D. muricatus*, *D. carota ssp hispanicus*, huiles essentielles, antimicrobienne, antioxydante .

## Abstract :

Medicinal plants are both an end product for consumption and raw material for the production of active substances. They represent a significant source of income for many populations.

Algeria sheltered a large and diverse set of species and demonstrates thereby an indisputable floristic richness. That is why we are interested in studying some plants growing in the wild in the mountains of the region of Tlemcen. It is for us to contribute to a better understanding of three species of the same genus *Daucus* family *Apiaceae*. In this context, the main objectives of this work can be summarized as: the extraction of essential oils from three species *D. crinitus*, *D. muricatus* and *D. carota ssp hispanicus*, determining their chemical compositions by different analytical methods: GC and GC-MS, evaluation in vitro of some biological activities (antimicrobial and antioxidant) and identification of compounds responsible for the overall activity of the essential oil.

**Keywords:** *Daucus crinitus*, *D. muricatus*, *D. carota ssp. hispanicus*, Essential oils, Antimicrobial and Antioxidant activities.

# *Publications*

# Grasas y aceites

International Journal of Fats and Oils

Volumen 61

N.º 3

julio-septiembre 2010

Sevilla (España)

ISSN: 0017-3495



 **CSIC**  
INSTITUTO DE LA GRASA

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

## Partial chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus crinitus* Desf. extracts.

By M. A. Dib,<sup>a,\*</sup> M. Bendahou,<sup>b</sup> A. Bendiabdellah,<sup>a</sup> N. Djabou,<sup>a</sup> H. Allali,<sup>a</sup> B. Tabti,<sup>a</sup>  
J. Paolini<sup>c</sup> and J. Costa<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Organic Chemistry, Natural Products and Analysis (COSNA), Department of  
Chemistry, Faculty of Sciences, University Aboubekr Belkaïd BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

<sup>b</sup>Departement of Biology, Faculty of Sciences, University Aboubekr Belkaïd BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

<sup>c</sup>UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse,  
BP 52, 20250 Corte, France

(\* Corresponding author: a\_dibdz@yahoo.fr)

### RESUMEN

#### Composición química parcial y actividad antimicrobiana de extractos de *Daucus crinitus* Desf.

La composición química de los ácidos grasos y la fracción insaponificable de raíces, hojas, y tallos de *Daucus crinitus* Desf. fueron establecidas utilizando cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). La fracción de ácidos grasos de los diferentes órganos (hojas, tallos y raíces) se caracterizó por el ácido láurico (17.9, 17.5 y 18.1% respectivamente) y otros ácidos grasos de cadena larga (hasta C<sub>22</sub>). Diferencias cualitativas y cuantitativas se registraron entre las fracciones insaponificable de los diferentes órganos de *D. crinitus*. De hecho, las fracciones insaponificable de la raíz, de la hoja y del tallo mostraron cantidades altas de componentes alifáticos (83.4%, 87.2% y 91.4%, respectivamente). Los componentes monoterpénicos, diterpénicos y sesquiterpénicos solo estuvieron presentes en un pequeño porcentaje. Las propiedades antimicrobianas de los extractos de *D. crinitus* fueron ensayadas en cuatro microorganismos diferentes. Estos extractos fueron activos contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

**PALABRAS CLAVE:** Ácidos grasos – Actividad antimicrobiana – *Daucus crinitus* Desf. – Fracción insaponificable – GC-MS.

### SUMMARY

#### Partial chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus crinitus* Desf. extracts.

The chemical composition of fatty acids and the unsaponifiable fraction of the roots, leaves and stems from *Daucus crinitus* Desf. were determined using gas chromatography (GC) and gas chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The fatty acid fractions of different organs (leaves, stems and roots) were characterized by lauric acid (17.9, 17.5 and 18.1 % respectively) and other long chain fatty acids (until C<sub>22</sub>). Qualitative and quantitative differences were reported between the unsaponifiable fractions of different organs from *D. crinitus*. The unsaponifiable fractions of the leaves, roots and stem showed high amounts of aliphatic components (83.4%, 87.2% and 91.4%, respectively). The monoterpen, diterpen and sesquiterpen components were only

present in small percentages. The antimicrobial properties of the *D. crinitus* extracts were tested on four different microorganisms. These extracts were found to be active against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

**KEY-WORDS:** Antimicrobial activity – *Daucus crinitus* Desf. – Fatty acid – GC/MS - Unsaponifiable fraction.

### 1. INTRODUCTION

The carrot is a plant belonging to the Apiaceae family and is grown throughout the temperate regions for its roots that are consumed raw and cooked. The carrot is reported to be endowed with medicinal properties, i.e. hypotensive, diuretic, carminative, stomachic and antilipemic (Gilani *et al.*, 2000; Kumarasamy *et al.*, 2005; Nicolle *et al.*, 2004). In Algerian folk medicine, the leaves are used raw or in an infusion as depurative and diuretic agents.

In Algeria, the *Daucus* genus is represented by some species living in dry and uncultivated areas and, among them, *D. carota* is widespread together with its many subspecies. In this group *D. crinitus* is different from the other species. The morphological features observed in the leaves of the *Daucus* genus are alternately arranged, except in *D. crinitus*, in which they appear to be pseudovercillate. Also, *D. crinitus* is characterized by the presence of many subspecies that colonize sands and cliffs (Quezel and Santa, 1963; Sáenz Laín, 1981).

The species studied is known by two botanical classifications that are considered synonyms: *D. crinitus* Desf. and *D. meifolius* Brot. This species grows along the Central-Western Mediterranean coasts; in Algeria it can be found along the Western coast from Tlemcen to Mascara (Quezel and Santa, 1963; Sáenz Laín, 1981). In folk medicine, it is also used to expel the placenta after childbirth or to give some stoutness. The mixture is also galactogene and depurative.

Previous studies refer mainly to the different subspecies and varieties of *D. carota*. In this species, a considerable qualitative and quantitative variability has been observed. In the fruits of *D. carota* ssp. *sativus* (Benecke *et al.*, 1987) and *D. carota* (subspecies non reported) (Ashraf *et al.*, 1979; Hilal *et al.*, 1977; Meshcheryuk *et al.*, 1983; Nigam and Radhakrishnan, 1963; Perineau *et al.*, 1991; Stahl, 1964; Talwar *et al.*, 1963; Toulemonde *et al.*, 1987) the main constituents were carotol, daucol, geranyl acetate and terpinyl acetate. For *D. carota* ssp. *gummifer* high percentages of geranyl acetate have been reported (Pinilla *et al.*, 1995). In the essential oil obtained from the fruits, leaves and stems of *D. carota* ssp. *maximus* (Saad *et al.*, 1995), trans-methylisoeugenol, methyleugenol, basarone, shyobunone and preisocalamendiol were identified among the main constituents; in disagreement with other varieties, carotol, daucol and geranyl acetate were completely absent. Sabinene, linalool, linalyl acetate, carvone and carotol were the main compounds identified in the volatile oil of the leaves of *D. carota* ssp. *sativa* (Khanna *et al.*, 1989). Kameoka *et al.* (1989) identified cis- and trans-asarone,  $\beta$ -bisabolene, asarone aldehyde, eugenol, 2-hydroxy-4-methoxyacetophenone, 3-carene and methyleugenol among the volatiles of the fruits of *D. carota* (subspecies not reported).

The essential oils obtained from the leaves and fruits of *D. gingidium* ssp. *gingidium* have been studied (Guido *et al.*, 2007). The main constituents of the essential oil from the leaves were sabinene (26.8%),  $\alpha$ -pinene (10.8%), germacrene-D (6.9%) and limonene (5.7%). Sabinene (60.6%) was the main compound identified in the essential oil of the fruits, followed by  $\alpha$ -pinene (12.2%) and 4-terpineol (5.4%).

In Algeria, many patients used medicinal plants, aside from conventional treatments, as an alternative therapy for many diseases. Recently, special attention has been paid to the bioactive elements extracted from plants in order to discover new drugs for the treatment of several pathologies (Kivçak and Mert, 2001). Therefore, the aim of the present work was: (i) to establish the chemical composition of solvent extracts (fatty acids and unsaponifiable fractions) of the stems, leaves and roots from *D. crinitus* for the first time. For this purpose, the analysis of extract composition was carried out by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS); (ii) to test the antibacterial and antifungal activities of unsaponifiable, methanolic and aqueous fractions against four species of micro-organisms using a microdilution method. The assessment of the *D. crinitus* potential as a source of natural compounds for pharmaceutical application is expected as a possible outcome of this study.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Plant material

Samples from each organ (stems, leaves and roots) of *D. crinitus* were collected in the Bensekrane

forest area (at about 30 km north west of Tlemcen - Algeria) [287 m, 35°07'N 1°22'O] in September, 2009. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Tlemcen University Botanical Laboratory (Voucher number: UBL 05.09). A portion of each organ was stored at 4°C for further analysis.

### 2.2. Sample preparation

Samples were air-dried and crushed. Obtained powders were sieved in size grading 0.355 and 0.600 mm for roots, leaves and stems, respectively. 50 g of each organ were extracted with 2x200 mL of methanol and petroleum ether under reflux (Soxhlet apparatus) separately. After evaporation of the solvent under reduced pressure, extracts were gathered and dried on MgSO<sub>4</sub>. The extraction was performed in triplicate and the yields (average of three extractions) in methanol were 2.5% for stems, 6.1% for leaves and 1.8% for roots and in petroleum ether were 1.2% for stems, 5.8% for leaves and 1.5% for roots. For aqueous extracts, 5 g of each organ were extracted with 100 mL of water and were lyophilized.

### 2.3. Extraction of unsaponifiable compounds

1 g of petroleum ether extract was saponified with 50 mL of methanolic potassium hydroxide solution (2 mol/L) for 1 h under reflux; the unsaponifiable components were then extracted three times with 100 mL of ether. The pooled extracts were washed three times with 50 mL of deionized water. The solvent was subsequently removed at 35°C under reduced pressure with a rotary evaporator. The unsaponifiable fractions of the leaves, stems and roots represent 54.1%, 69.1% and 55.3% (w/w) of petroleum ether extract, respectively.

### 2.4. Extraction of fatty acids

The soapy aqueous solution obtained previously was acidified (HCl 1N) until precipitation of fatty acids (pH 5-6). The freed fatty acids were extracted with ether (3x 50 mL) and dried on MgSO<sub>4</sub> and then weighed. Fatty acids were transformed into their methyl ester derivatives by the addition of a methanolic solution of BF<sub>3</sub> 10% (Metcalfe and Schmitz, 1961). Thereafter, fatty acids were extracted three times with 50 mL of hexane at room temperature. The organic layer was evaporated and dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The acid fractions of the leaves, stems and roots represent 21.2%, 29.4% and 11.4% (w/w) of diethyl ether extract, respectively.

### 2.5. Gas chromatography analysis (GC)

GC analyses were carried out using a Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and a fused-silica capillary column (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25  $\mu$ m), Rtx-



1 (polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 ml/min); the injection volume was 0.2 µL. Retention indexes (I) of the compounds were determined relative to the retention times of the series of n-alkanes (C5-C30) with linear interpolation, using the Van den Dool and Kratz equation (Van Den Dool and Kratz, 1963) and software from Perkin–Elmer. Component relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors.

## 2.6. Gas chromatography-Mass spectrometry analysis (GC-MS)

Samples were analyzed with a Perkin–Elmer Turbo mass detector (quadrupole), coupled to a Perkin–Elmer Autosystem XL, equipped with the fused-silica capillary columns Rtx-1 and Rtx-Wax (ion source temperature 150°C; energy ionization 70 eV). EI mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1 s). Other GC conditions were the same as described under GC except split 1/80.

## 2.7. Component identification

As previously reported (Paolini *et al.*, 2005), the methodology used for the identification of individual components was based on: (a) a comparison of calculated retention indices  $I_a$  on an apolar column with those of authentic compounds or literature data  $I_l$  (Jennings and Shibamoto, 1980; National Institute of Standards and Technology, 2005; National Institute of Standards and Technology, 2005) and (b) computer matching with commercial mass spectral libraries (König *et al.*, 2001; Adams, 2001; Mc Lafferty and Stauffer, 1994; Mc Lafferty and Stauffer, 1988; National Institute of Standards and Technology, 1999) and a comparison of mass spectra with those of our own library of authentic compounds or literature data (Jennings and Shibamoto, 1980; Joulain and König, 1998).

## 2.8. Bacterial and yeast strains and media

The bacterial strains used in this study, i.e. *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, were isolated at the Medical Reanimation Department of the Hospital University Center of Tlemcen in Algeria. The yeast *Candida albicans* was isolated at the Dermatology Department of the same hospital.

Bacterial strains preserved in nutrient agar at 4°C were revived in a nutrient solution and incubated at 37±1°C for 18 to 24 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Pronadisa Hispanalab). *C. albicans* preserved at 4°C in the Sabouraud agar supplemented with chloramphenicol was revived in a nutrient solution

and incubated at 30±1°C for 24 to 48 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL sterile physiological water.

For the antimicrobial assay, bacterial strains were grown on Mueller-Hinton Agar (MHA, Pronadisa Hispanalab) while *C. albicans* was grown on Sabouraud Dextrose Agar + Chloramphenicol (SDA, Merck). Bacterial and yeast inocula reached microbial densities in the range of 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup>cfu/mL.

## 2.9. Antimicrobial activity

Two different techniques were used to test the anti-microbial activity: the paper disc diffusion and the dilution agar method. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the later method.

### *Paper-disc diffusion method*

Paper discs (6 mm in diameter) saturated with a 40 mg/mL solution of plant extract were applied to the surface of agar plates that were previously seeded by spreading 0.1 mL of culture overnight. The plates were incubated overnight at the appropriate temperature (see above), and the diameter of the resulting zone of inhibition was measured in millimeters. The results indicated in Table 3 and in the text represent the net zone of inhibition including the diameter (6 mm) of the paper disk. The scale of measurement was the following (disk diameter included) : > 20 mm zone of inhibition is strongly inhibitory; < 20–12 mm zone of inhibition is moderately/mildly inhibitory; and <12 mm is not inhibitory. All the data collected for each assay are the averages of three determinations.

### *Dilution-agar method*

A dilution agar method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC). Stock solutions were obtained by dissolving extracts in dimethylsulfoxide (DMSO 1%). Serial dilutions were made to obtain concentrations ranging from 0 to 4000 µg/mL of unsaponifiable, methanolic and aqueous extracts. Each mixture was added to Mueller–Hinton agar for bacteria and Sabouraud dextrose agar with Chloramphenicol for yeast (cooled to 45– 50°C) (Cowan, 1999; Lennette and Balows, 1985). Two controls were included in this test. The Petri dishes contained a sterile solution of DMSO and the culture medium, respectively. The experiments were performed in triplicate. After incubation at 37°C for 24h for bacteria and at 30°C for 48h for the yeast.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Fatty acids of the leaves, stems and roots from *D. crinitus*

Fatty acids from the leaves, stems and roots, their retention indexes and their relative abundance

are given in Table 1; the components are listed in the order of elution on the Rtx-1 column. 25 acid constituents were identified from leaf, stem and root extracts amounting to 84.1%, 85.7% and 86.6% of the total acid fraction, respectively (Table 1). The three fractions were qualitatively similar. However, propanoic acid (0.9%) was reported only in the stem extract and 15 methyl hexadecanoic acid (0.6%) in the root extract. The leaf, stem and root extracts were characterized by high contents of saturated fatty acids with lauric acid (17.9%, 17.5% and 18.1%, respectively) as the major compound followed by palmitic acid (16.8%, 14.3% and 10.7%, respectively), myristic acid (10.2%, 14.5% and 16.1%, respectively), behenic acid (7.2%, 9.1% and 6.5%, respectively), and stearic

acid (3.2%, 2.7% and 1.8%, respectively). The other main compounds were unsaturated fatty acids: - linolenic acid (12.5%, 13.8% and 14.6%, respectively), 9-hexadecenoic acid (5.9%, 4.1% and 4.6%, respectively), and cis-11-eicosenoic acid (5.4%, 2.5% and 1.6%, respectively).

### 3.2. Unsaponifiable fraction of leaves, stems and roots from *D. crinitus*

The combined analysis (GC and GC-MS) of *D. crinitus* unsaponifiable fractions revealed the presence of 33 components: 33 in leaf fraction, 29 in stem fraction and 15 in root fraction accounting for 91.5%, 92.8% and 91.4% of the total composition, respectively (Table 2). Even if aliphatic compounds

Table 1  
Fatty acids of leaf, stem and root extracts from *D. crinitus*  
(proportion w/w expressed according to the total fatty acids)

N <sup>a</sup>	Acid components	<i>I<sub>r</sub></i> <sup>b</sup>	<i>I<sub>a</sub></i> <sup>c</sup>	Leaves <sup>d</sup>	Stems <sup>d</sup>	Roots <sup>d</sup>
1	Propanoic (C <sub>3</sub> : 0)	618	611	–	0.9	–
2	Enanthic (heptanoic, C <sub>7</sub> : 0)	1006	1005	0.2	0.2	0.1
3	Undecanoic (C <sub>10</sub> : 0)	1407	1406	0.8	0.7	1.1
4	Lauric (dodecanoic, C <sub>12</sub> : 0)	1501	1508	17.9	17.5	18.1
5	Tridecyclic (tridecanoic, C <sub>13</sub> : 0)	1608	1605	0.3	0.9	0.4
6	Dodecanoic 2-hydroxy (C <sub>12</sub> : 0)	1627	1619	0.8	0.1	0.3
7	Myristic (tetradecanoic, C <sub>14</sub> : 0)	1708	1708	10.2	14.5	16.1
8	Farnesyl(3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienoic, C <sub>15</sub> : 3)	1765	1770	Tr	0.3	0.2
9	12-Methyl tetradecanoic (C <sub>15</sub> : 0)	1771	1777	0.1	0.2	0.3
10	(Z) Methyl pentadec-10-enoic (C <sub>15</sub> : 1)	1786	1787	0.4	TR	0.1
11	Pentadecanoic (C <sub>15</sub> : 0)	1808	1806	0.4	0.8	0.6
12	Tetradecanoic 2-hydroxy (C <sub>14</sub> : 0)	1835	1826	0.2	0.1	0.3
13	Palmotoleic (9-Hexadecenoic, C <sub>16</sub> : 1)	1895	1889	5.9	4.1	4.6
14	Palmitic (hexadecanoic, C <sub>16</sub> : 0)	1908	1910	16.8	14.3	10.7
15	15-Methyl hexadecanoic (C <sub>17</sub> : 0)	1974	1970	–	–	0.3
16	Margaric (heptadecanoic, C <sub>17</sub> : 0)	2008	2006	0.3	0.4	0.4
17	Linoleic (9,12-octadecadienoic, C <sub>18</sub> : 2)	2083	2072	12.5	13.8	14.6
18	Linolenic (9,12,15-octadecatrienoic, C <sub>18</sub> : 3)	2081	2081	0.5	0.8	7.1
19	Oleic ((Z)-octadecenoic, C <sub>18</sub> : 1)	2106	2084	0.4	0.7	0.7
20	Stearic (octadecanoic, C <sub>18</sub> : 0)	2109	2108	3.2	2.7	1.8
21	Nonadecanoic (C <sub>19</sub> : 0)	2209	2207	0.3	0.4	0.1
22	Arachidonic (5,8,11,14-eicosatetraenoic, C <sub>20</sub> : 4)	2217	2216	0.1	0.2	tr
23	Cis 11-eicosenoic (C <sub>20</sub> : 1)	2248	2247	5.4	2.5	1.6
24	Arachidic (eicosanoic, C <sub>20</sub> : 0)	2311	2312	0.2	0.5	0.6
25	Behenic (docosanoic, C <sub>22</sub> : 0)	2511	2509	7.2	9.1	6.5
<i>Total identified</i>				<i>84.1</i>	<i>85.7</i>	<i>86.6</i>

<sup>a</sup> Order of elution are given on a polar column (Rtx-1). <sup>b</sup> Retention indexes of literature of corresponding esters on the apolar column (*I<sub>r</sub>*) (Jennings and Shibamoto. 1980; König and al.. 2001). <sup>c</sup> Retention indexes of corresponding esters on the apolar Rtx-1 column (*I<sub>a</sub>*). <sup>d</sup> Relative percentages (%) on the a polar column (Rtx-1); tr = trace (< 0.1%).

Table 2  
Chemical composition of unsaponifiable fractions of leaves stems and roots from *D. crinitus*

N <sup>a</sup>	Components	I <sub>l</sub> <sup>b</sup>	I <sub>a</sub> <sup>c</sup>	Leaves <sup>d</sup>	Stems <sup>d</sup>	Roots <sup>d</sup>	Identification
1	Nonane	900	900	0.2	Tr	0.9	RI, MS
2	$\alpha$ - pinene	936	931	0.4	–	–	RI, MS
3	Sabinene	973	966	0.6	–	–	RI, MS
4	$\beta$ -pinene	978	971	0.1	–	–	RI, MS
5	Myrcene	987	981	0.3	–	–	RI, MS
6	Decane	1000	1000	tr	0.1	0.1	RI, MS <sup>e</sup>
7	p-Cymene	1015	1012	0.2	0.1	–	RI, MS
8	Limonene	1020	1021	0.9	1.1	–	RI, MS
9	(E)- $\beta$ -Ocimene	1041	1037	0.5	0.9	–	RI, MS
10	$\gamma$ -terpinene	1051	1049	1.6	0.8	–	RI, MS
11	$\alpha$ -Terpinolene	1082	1079	0.4	0.2	–	RI, MS
12	Undecane	1100	1100	5.5	8.5	4.1	RI, MS
13	Decanal	1188	1187	1.8	2.2	2.3	RI, MS
14	Tridecane	1300	1300	tr	0.1	0.8	RI, MS
15	Undecanol	1367	1368	0.3	0.2	–	RI, MS
16	Dodecanal	1389	1390	3.2	2.8	16.7	RI, MS
17	Isocaryophyllene	1407	1416	0.6	0.5	–	RI, MS
18	Dodecanol	1474	1474	30.2	35.4	36.2	RI, MS
19	Germacrene-D	1479	1472	0.1	0.1	–	RI, MS
20	Pentadecane	1500	1500	4.2	3.3	4.7	RI, MS
21	Dodecyl acetate	1606	1606	2.5	1.9	3.7	RI, MS
22	$\alpha$ -bisabolol	1673	1667	tr	Tr	–	RI, MS
23	Heptadecane	1700	1700	3.8	2.6	0.2	RI, MS
24	Hexadecanal	1814	1826	1.1	1.8	0.3	RI, MS
25	Nonadecane	1900	1900	0.1	0.2	0.1	RI, MS
26	Heptadecanol	1968	1965	7.1	9.5	1.2	RI, MS
27	Eicosane	2000	2000	0.4	0.1	–	RI, MS
28	Phytol-(Z)	2080	2074	0.7	0.8	–	RI, MS
29	Heneicosane	2100	2100	tr	0.2	–	RI, MS
30	Phytol-(E)	2107	2105	1.1	0.7	–	RI, MS
31	Tricosane	2300	2300	9.9	7.1	10.5	RI, MS
32	Pentacosane	2500	2500	13.1	11.2	9.8	RI, MS
33	Neophytadiene	1830	1836	0.6	0.4	–	RI, MS
	<i>Total identified</i>			<i>91.5</i>	<i>92.8</i>	<i>91.4</i>	
	Aliphatic			83.4	87.2	91.4	
	Monoterpenes			5	3.1	–	
	Diterpenes			2.4	1.9	–	
	Sesquiterpenes			0.7	0.6	–	

<sup>a</sup> Order of elution are given on a polar column (Rtx-1). <sup>b</sup> Retention indexes of literature on the apolar column (*I*) (Jennings and Shibamoto. 1980; König and al., 2001). <sup>c</sup> Retention indexes on the apolar Rtx-1 column (*I*<sub>a</sub>). <sup>d</sup> Relative percentages (%) on the apolar column (Rtx-1); tr = trace (<0.1%).

were in high abundance in the three fractions, these were qualitatively and quantitatively different. Indeed, the leaf and stem fractions were strongly dominated by aliphatic compounds (83.4% and 87.2% respectively), monoterpene (5% and 3.1%),

diterpenes (2.4% and 1.9%) and sesquiterpenes (0.7% and 0.6%) respectively. Moreover, the monoterpene hydrocarbon family exhibited qualitative and quantitative differences in their composition. The  $\gamma$ -terpinene was identified as the major components of



the leaf fraction (1.6%) were associated with significant amounts of limonene (0.9%), sabinene (0.6%), (E)- $\beta$ -ocimene (0.5%),  $\alpha$ -pinene (0.4%),  $\alpha$ -terpinolene (0.4%), myrcene (0.3%) and *p*-cymene (0.2%); whereas the major components of stem fraction were limonene (1.1%), (E)- $\beta$ -ocimene (0.9%),  $\gamma$ -terpinene (0.8%) followed by  $\alpha$ -terpinolene (0.2%) and *p*-cymene (0.1%). Moreover, the aliphatic component of the leaf and stem was strongly dominated by dodecanol (30.2% and 35.4% respectively) associated with significant amounts of heptadecanol (7.1% and 9.5% respectively), undecane (5.5% and 8.5% respectively), pentadecane (4.2% and 3.3% respectively), heptadecane (3.8% and 2.6% respectively), dodecanol (3.2% and 2.8% respectively) and dodecyl acetate (2.5% and 1.9% respectively). Conversely, the root fraction was characterized by a high amount of aliphatic compounds (91.4%) and no terpenic compounds have been reported. The major components of this extract were dodecanol (36.2%),

tricosane (10.5%) and pentacosane (9.6%). Finally, this fraction was also characterized by aldehyde compounds (19.3%) and dodecyl acetate (3.7%).

### 3.3. Antibacterial activity

The in vitro antibacterial activities of root, leaf and stem unsaponifiable, methanolic and aqueous extracts of *D. crinitus* against the employed bacteria were qualitatively and quantitatively assessed by the presence or absence of inhibition zones. As shown in Table 3, the root, leaf and stem unsaponifiable extracts exhibited inhibitory effects against the tested bacterial pathogens. *C. albicans*, *S. aureus* and *B. cereus* were found to be the most inhibited pathogens by the unsaponifiable extracts with their respective diameter zones of inhibition of 30 (roots, leaves and stems), 18 (leaves) and 14 (roots) mm. The rest of the bacterial strain (*E. coli*) showed no

Table 3  
Antimicrobial activity of unsaponifiable, methanol and water extracts from *D. crinitus*.

Microorganisms	Inhibition zone (mm)								
	Unsaponifiable Extracts			Methanolic Extracts			Aqueous Extracts		
	Root	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem
<i>Gram-positive bacterium</i>									
<i>Bacillus cereus</i>	14	8	11	14	15	10	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	18	9	13	11	11	–	–	–
<i>Gram-negative bacterium</i>									
<i>Escherichia coli</i>	8	8	9	14	13	15	–	–	–
<i>Yeast</i>									
<i>Candida albicans</i>	30	30	30	13	16	15	–	–	–

Table 4  
Minimum Inhibitory Concentrations MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) of unsaponifiable, methanol and water extracts from *D. crinitus*.

Microorganisms	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	Unsaponifiable Extracts			Methanolic Extracts			Aqueous Extracts		
	Root	Leaf	Stem	Root	Leaf	Stem	Root	leaf	Stem
<i>Gram-positive bacterium</i>									
<i>Bacillus cereus</i>	250	255	255	500	500	500	>3000	>3000	>3000
<i>Staphylococcus aureus</i>	136	122.1	122.1	800	800	800	>3000	>3000	>3000
<i>Gram-negative bacterium</i>									
<i>Escherichia coli</i>	126	111.5	111.5	1600	1800	1750	>3000	>3000	>3000
<i>Yeast</i>									
<i>Candida albicans</i>	76.2	46.5	46.2	400	400	400	>2000	>2000	>2000

inhibition, with diameter of zones of inhibition ranging from 8 to 9 mm (Table 3).

Also the methanolic extracts exerted potential effects of antibacterial activity against the tested bacteria. However, the roots, leaves and stems exhibited inhibitory effects against *C. albicans* with diameters of zones of inhibition from 13, 16 and 15 mm respectively, *E. coli* (14, 13 and 15 mm respectively), *B. cereus* (14, 15 and 10 mm respectively) and *S. aureus* (13, 11 and 11 mm respectively). However, aqueous extracts exhibited no effect of antibacterial activity against of the bacterial pathogens tested.

### 3.4. Minimum inhibitory concentrations (MIC)

As shown in Table 4, the most promising results were obtained from the unsaponifiable extract which not only had the lowest MIC value (46.5, 56.2 and 76.2  $\mu\text{g/mL}$  for leaf, stem and root extracts respectively) against *C. albicans*, but also inhibited the growth of other micro-organisms. The unsaponifiable extract of leaves, stems and roots also shows a strong antimicrobial effect against *E. coli* with an MIC of 111.5, 111.1 and 126  $\mu\text{g/mL}$  respectively and *S. aureus* with a MIC of 122.1, 122.1 and 136  $\mu\text{g/mL}$  respectively and average activity on the *B. cereus* with a MIC of 255, 255 and 250  $\mu\text{g/mL}$  respectively (Table 4). Using the dilution agar method technique, root, leaf and stem methanolic extracts of *D. crinitus* showed antimicrobial properties with MIC values ranging from 500 to 1800  $\mu\text{g/mL}$  for bacteria and 400  $\mu\text{g/mL}$  for *C. albicans*. The root, leaf and stem aqueous extracts showed no inhibition towards any of the microorganisms assayed up to the value of 3000  $\mu\text{g/mL}$  for bacteria and 2000  $\mu\text{g/mL}$  for *C. albicans*.

The unsaponifiable extracts of roots, leaves and stems evaluated in this work have different varieties of phytochemicals that could be considered responsible for their antimicrobial activity. Although they usually occur as complex mixtures, their activity can generally be accounted for in terms of their major components. The antimicrobial activity of the unsaponifiable extracts of roots, leaves and stems could be due to the investigated strain sensitivity to  $\alpha$ -pinene, sabinene, limonene and the other lighter components present in unsaponifiable extracts (Magiatis *et al.*, 1999; Oussou *et al.*, 2008; Oussou *et al.*, 2004).

## 4. CONCLUSIONS

The leaves, stems and roots of *D. crinitus* were characterized by the presence of fatty acids. It appears that all parts of the plant were rich in saturated fatty acids with lauric acid (17.9% for leaves, 17.5% for stems and 18% for roots) as the major compound. In all extracts, lauric acid is accompanied by fatty acids with long chain (from  $\text{C}_3$  to  $\text{C}_{22}$ ). The unsaponifiable fraction of leaves and stems were characterized by aliphatic constituent products and monoterpene

hydrocarbons. Sesquiterpenic compounds were also present but in small amounts.

The antimicrobial properties of the unsaponifiable, methanolic and aqueous extracts (leaves, stems and roots) were tested on four microorganism species. The root, leaf and stem unsaponifiable and methanol extracts were active against *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* bacteria strain which are deemed very dangerous and very difficult to eliminate.

To the best of our knowledge, the composition of fatty acid and unsaponifiable extracts and antimicrobial activity of *D. crinitus* have not been reported before and therefore our results can be evaluated as the first report about the antimicrobial properties and the chemical compositions of fatty acids and unsaponifiable fractions.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Prof. M. Bouazza of the Botanical Laboratory, Biology Department, Aboubekr Belkaïd University for the identification of the vegetable matter.

## REFERENCES

- Adams RP. 2001. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Allured Publishing, Carol Stream.
- Ashraf M, Sandra PJ, Saeed, T, Bhatti MK. 1979. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part XXXI. Wild *Daucus carota* (carrot) seed oil. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* **22**, 258–259.
- Benecke R, Reichold K, Kessel, M, Schmidt W. 1987. Essential oil content and composition of the seeds of various cultivars of *Daucus carota* L. ssp. sativus (Hoffm.) Arcang. *Pharmazie* **42**, 256–259.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 564–582.
- Gilani AH, Shaheen E, Saeed SA, Bibi S, Irfanullah SM, Faizi S. 2000. Hypotensive action of coumarin glycosides from *Daucus carota*. *Phytomedicine* **7**, 423–426.
- Guido F, Pier Luigi C, Simonetta M, Rosa B. 2007. Composition of the essential oil of *Daucus gingidium* L. ssp. gingidium. *Food Chemistry* **103**, 1237–1240
- Hilal SH, ElShamy AM, Haggag MY. 1977. A study of the volatile and fixed oils of the fruits of *Daucus carota* L. var. boissieri. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **16**, 509–520.
- Jennings W, Shibamoto T. 1980. *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography*. Jovanovitch HB. (Ed.), Academic Press, New-York.
- Joulain D, König WA. 1998. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. EB-Verlag, Hamburg.
- Khanna KR, Sharma SO, Singh A. 1989. *The essential oil from the leaves of Daucus carota L. var. sativa*. Acta 11th Int. Congr. Essent. Oils, Fragr. Flav.
- Kivçak B, Mert T. 2001. Quantitative determination of tocopherol in *Arbutus unedo* L. by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia* **72**, 656–661.
- König WA, Hochmuth DH, Joulain D. 2001. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of*

- MassFinder 2.1*. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
- Kumarasamy Y, Nahar L, Byres M, Delazar A, Sarker S D. 2005. The assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota* L.) seeds. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* **5**, 61–72.
- Lennette FM, Balows A. 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. Hansler WJ, Shadomy HJ. Eds, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Magiatis P, Melliou E, Skattounis AL, Chinou I, Mitaku S. 1999. *Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var chia*. In: Book of abstracts, 2000 years of natural products research - past present and future, Amsterdam, Leiden University, 622.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. 1994. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th ed., Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Palisade, Newfield.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. 1988. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, 4th ed. Wiley-Interscience, New York.
- Meshcheryuk GI, Timchuk KS, Chelovskaya, LN. 1983. Essential oil from the above-ground part of *Daucus carota* grown in Moldavia. *Rastitel'nye Resursy* **19**, 218–224.
- Metcalfe LD, Schmitz AA. 1961. Rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. *Anal Chemistry* **33**, 363–364.
- National Institute of Standards and Technology. 1999. NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT.
- National Institute of Standards and Technology. 2005 NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database (<http://webbook.nist.gov/chemistry>). Gaithersburg, MD.
- Nicolle C. 2004. Lyophilized carrot ingestion lowers lipemia and beneficially affects cholesterol metabolism in cholesterol-fed C57BL/6J mice. *European Journal of Nutrition* **43**, 237–245.
- Nigam SS, Radhakrishnan C. 1963. Chemical examination of the essential oil from the seeds of *Daucus carota*. *Perfumery and Essential Oil Records* **54**, 87–92.
- Oussou KR, Yolou S, Boti JB, Guessend KN, Kanko C, Ahibo C, Casanova J. 2008. Etude chimique et activité Anti-diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research* **24**, 94–103.
- Oussou KR, Kanko C, Guessend N, Yolou S, Koukoua G, Dosso M, N'Guessan YT, Figueredo G, Chalchat JC. 2004. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. *Comptes Rendus Chimie* **7**, 1081–1086.
- Paolini J, Costa J, Bernardini AF. 2005. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. corsicum (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A* **1076**, 170–178.
- Perineau F, Ganou L, Gaset A. 1991. Manufacture of carrot seed essential oil. *Industries Alimentaires et Agricoles* **108**, 357–366.
- Pinilla MG, Alonso MJP, Negueruela AV. 1995. Volatile constituents from fruits of *Daucus carota* L. ssp. gummifer Hooker fil. *Journal of Essential Oil Research* **7**, 433–435.
- Quezel P, Santa S. 1963. *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Edition CNRS, Tome II, 661–662.
- Saad HEA, ElSharkawy SH, Halim AF. 1995. Essential oils of *Daucus carota* ssp. maximus. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **70**, 79–84.
- Sáenz Laín C. 1981. Research on *Daucus* L. (Umbelliferae), *Anales Jard. Bot. Madrid*, **37**, 494.
- Stahl E. 1964. Chemical breeds in medicinal plants. III. The different composition of ethereal oils of the fruit of cultivated and wild carrots (*Daucus carota*). *Archives des Pharmacie* **64**, 500–511.
- Talwar YP, Nigam MC, Harida KL. 1963. Essential oil of *Daucus carota* seed. *Indian Oil and Soap Journal* **28**, 249–251.
- Toulemonde B, Paul F, Beauverd D. 1987. Composition of the essential oil of carrot seeds (*Daucus carota* L.). *Parfumes, Cosmétiques, Aromes* **77**, 65–69.
- Van Den Dool H, Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* **11**, 463–471.

Recibido: 9/12/09  
Aceptado: 22/1/10



ISSN: 2231-3354  
Received on: 12-07-2012  
Revised on: 17-07-2012  
Accepted on: 23-07-2012  
DOI: 10.7324/JAPS.2012.2710

## Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus crinitus* Desf., from Algeria

Amel Bendiabdellah, Mohammed El Amine Dib, Nawel Meliani, Nassim Djabou, Hocine Allali and Boufeldja Tabti

### ABSTRACT

The presence of natural antioxidant in plants is well known. Plant phenolics constitute one of the major groups of components that act as primary antioxidant free radical terminators. This paper reports the antioxidative activity of methanolic and water extract of *Daucus crinitus* Desf. Phytochemical screening of the crude extracts of stems/leaves revealed the presence of different kind of chemical groups such as tannin, flavonoids, phenolic acids and coumarins. The amounts of total phenolics and flavonoids in the solvent extracts (methanol and water extract) were determined spectrometrically. From the analyses, methanolic extract had the highest total phenolic content (130.19 µg GA/mg extract) and antioxidant activity (89.82 %) using DPPH method. Increasing the concentration of the extracts resulted in increased ferric reducing antioxidant power for both extracts tested. Finally, a relationship was observed between the antioxidant activity potential and total phenolic and flavonoid levels of the extract.

**Keywords:** *Daucus crinitus* Desf., Solvent extract, Phytochemical screening, Antioxidant activity, DPPH, Reducing power.

### INTRODUCTION

In the last years, interest in medicinal plants as an alternative to synthetic drugs is more and more increasing, particularly against oxidative stress. Phenolic compounds are the main agents that can donate hydrogen to free radicals and thus break the chain reaction of lipid oxidation at the first initiation step (Agraval, 1989). This high potential of phenolic compounds to scavenge radicals may be explained by their phenolic hydroxyl groups (Havsteen, 2002). Polyphenolic compounds are also known for their ability to prevent fatty acids from oxidative decay (Fecka *et al.*, 2007). The oxidation is caused by the rancidity of unpreserved aliments rich in unsaturated fatty acids (Li *et al.*, 2008). Furthermore, many synthetic antioxidant components (BHA and BHT) have shown toxic and/or mutagenic effects; therefore, plant antioxidants are suggested as an interesting alternative. Numerous studies exhibited a strong relationship between total phenolic content and antioxidant activity in fruits, vegetables, and medicinal plants (Dorman *et al.*, 2003; Velioglu *et al.*, 1998). Flavonoid constituents possess a wide spectrum of chemical and biological activities, including radical scavenging properties (Shimoi *et al.*, 1996). Indeed, Shimoi *et al.* (1996) reported that plant flavonoids that show antioxidant activity in vitro also function as antioxidants in vivo. Malkowski (2006) showed the role of these compounds in the defense mechanism against oxidative stress from oxidizing agents and free radicals.

Amel Bendiabdellah, Mohammed El Amine Dib, Nawel Meliani, Djabou Nassim, Hocine Allali, Boufeldja Tabti  
Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaid BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.

**For Correspondence**  
Mohammed El Amine Dib  
Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaid BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.  
Tel./Fax: +213 43286530

Several studies had been conducted to evaluate the correlation between phenolic compounds and antioxidant activity (Yen and Hsieh, 1998; Gülçin *et al.*, 2003). The antioxidative properties of some vegetables and fruits are partly due to the low molecular weight phenolic compounds, which are known to be potent as antioxidants (Wang *et al.*, 1999). *Daucus crinitus* desf. is characterized by the presence of many subspecies that colonize the sands and cliffs (Quezel and Santa, 1963). In Algeria, this species is currently used in folk medicine as a tonic and against the coldness. A survey conducted by herbalists identified that, in folk medicine, a drink made from the roots of *D. crinitus* is used in decoction to expel the placenta after childbirth. However, all reports do not make reference to the antioxidative properties of *D. crinitus*. The aim of this work is to evaluate the antioxidative properties of the extracts of *D. crinitus*. Additionally, the total phenolic and flavonoid contents of methanolic and water extracts have been determined.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material

The aerial parts (stems/leaves) from *D. crinitus* were collected on November 2010, in Bensekrane [260 m, 35°04'N 1°13'O] forests near Tlemcen, Algeria.

### Preparation of the extracts

The air-dried sample (leaves/stems) (20 g) was extracted by using a Soxhlet extractor for 5 h, containing methanol under reflux conditions (250 mL). The residue was then extracted by boiling water (300 mL). Solvent was removed with a rotary evaporator to obtain the extract in the yield of 5.3% (w/w). The water extract was dried in a freeze-drier to obtain the extract in a yield of 9.8% (w/w).

### Phytochemical prospecting.

The phytochemical tests to detect the presence of heterosides, saponins, tannins, flavonoids, steroids, triterpenes, coumarins, quinones, organic acids and alkaloids were performed according to the method described by Matos (1997). The tests were based on the visual observation of a change in color or formation of precipitate after the addition of specific reagents.

### Determination of total phenolic contents

The concentration of phenolics in plant extracts was determined using spectrophotometric method (Slinkard and Singleton, 1977). Methanolic solution of the extract in the concentration of 1 mg/ml was used in the analysis. The reaction mixture was prepared by mixing 0.5 mL of methanolic solution of extract, 2.5 mL of 10% Folin-Ciocalteu's reagent dissolved in water and 2.5 mL 7.5% NaHCO<sub>3</sub>. Blank was concomitantly prepared, containing 0.5 mL methanol, 2.5 ml 10% Folin-Ciocalteu's reagent dissolved in water and 2.5 mL of 7.5% of NaHCO<sub>3</sub>. The samples were thereafter incubated in a thermostat at 45 °C for 45 min. The absorbance was determined using spectrophotometer at  $\lambda_{\max} = 765$  nm. The samples were prepared in

triplicate for each analysis and the mean value of absorbance was obtained. The same procedure was repeated for the standard solution of gallic acid and the calibration line was construed. Based on the measured absorbance, the concentration of phenolics was read (mg/ml) from the calibration line; then the content of phenolics in extracts was expressed in terms of gallic acid equivalent ( $\mu\text{g GA/mg extract}$ ).

### Determination of total flavonoids contents

Total flavonoid contents were determined using the Dowd method as adapted by Quettier *et al.*, 2000. One milliliter of 2% aluminium trichloride (AlCl<sub>3</sub>) in methanol was mixed with the same volume of extracts (200  $\mu\text{g}$ ). The absorption at 430 nm was measured after 10 min against a blank sample consisting of 1 mL methanol without AlCl<sub>3</sub>. The concentrations of flavonoid compounds expressed as  $\mu\text{g}$  quercetin equivalent per mg of extract were calculated according to the standard quercetin graph. All experiments were carried out in triplicate, and quercetin equivalent values were reported as  $X \pm \text{SD}$  of triplicates.

## ANTIOXIDANT ACTIVITY

### Radical scavenging activity

The free radical-scavenging activities of essential oil and solvent extracts were measured using DPPH as described by Hatano *et al.*, 1988. Used as reagent, DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) obviously offers a convenient and accurate method for titrating the oxidizable groups of natural or synthetic antioxidants. Fifty microliters of various concentrations of the solvents extracts were added to 5 mL of a 0.005% (w/v) methanol solution of DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature the absorbance was read against a blank at 517 nm. Inhibition of the free radical, DPPH, in percent (I %) was calculated according to the formula:

$$I (\%) = 100. (A_0 - A_s)/A_0$$

where  $A_0$  is the absorbance of the control (containing all reagents except the test compound), and  $A_s$  is the absorbance of the tested sample. The actual decrease in absorbance induced by the tested sample (change of color from deep-violet to light yellow) was compared to that of the positive control ascorbic acid. The IC<sub>50</sub> value represented the concentration of extract that causes 50% inhibition was determined. Experiments were carried out in triplicate and the mean value was recorded.

### Reducing power

The reducing power of roots and stems/leaves was determined as per the reported method of Oyaizu (1986). Different concentrations of extract (100–1000  $\mu\text{g/mL}$ ) in 1ml of methanol were mixed with phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferrocyanide (2.5 mL, 1%). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. A portion (2.5 mL) of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 mL) was



mixed with distilled water (2.5 mL) and FeCl<sub>3</sub> (0.5 mL, 0.1%) and the absorbance was measured at 700 nm and compared with standards. Increased absorbance of the reaction mixture indicated increased reducing power.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Phytochemical prospecting

With the increase of various diseases such as cancer, cardiovascular diseases atherosclerosis and inflammatory injuries, alternative natural products of plants could be of interest. Some plant extracts and phytochemicals are known to have antioxidant properties, which could be of great importance in the therapeutic treatments. In the last years, various studies have been conducted in different countries, demonstrating the efficacy of this type of treatment (Capecka *et al.*, 2005). Table 1 shows the presence of various compounds such as tannins, flavonoids, phenolic acids and coumarins. Through phytochemical prospecting of the extracts, it was possible to determine the presence of diverse classes of secondary metabolites that show a wide variety of biological activities. polyphenols are known to be useful in the treatment of inflamed or ulcerated tissues and they have remarkable activity in cancer prevention and anticancer (Barreiros *et al.*, 2006; Okuda *et al.*, 1989). Flavonoids have been shown to exhibit their actions through effects on membrane permeability, and by inhibition of membrane-bound enzymes such as the ATPase and phospholipase A2 (Li *et al.*, 2003), and this property may explain the mechanisms of antioxidative action of *D. crinitus*.

**Table 1:** Phytochemical prospection of extracts of *D. crinitus*.

Extracts	Metabolites					
	1	2	3	4	5	6
<b>Methanol</b>						
Stems/leaves	+	+	+	+	-	-
<b>Water</b>						
Stems/leaves	+	+	+	-	-	-

1: tannins; 2: flavononols; 3: phenolic acids; 4: coumarins; 5: saponins; 6: alkaloids; +: presence; -: absence.

### Assays of total phenolics and flavonoids from solvent extracts

The amounts of total phenolics in the extracts were determined spectrometrically according to the Folin-Ciocalteu procedure and calculated as gallic acid equivalent. The amounts of total phenols found in the plant extracts are shown in Table 2. The results showed that the methanolic extract has higher total phenol components than the water extract. The total phenolics and contents of the methanolic and water extracts of *D. crinitus* were  $130.19 \pm 5$  and  $89.80 \pm 3$   $\mu\text{g GA/mg}$  extract respectively. Similarly, the methanolic extract was found to be richer in flavonoids ( $86.72 \pm 4$   $\mu\text{g GA/mg}$  extract) than the water extract ( $49.77 \pm 2$   $\mu\text{g GA/mg}$  extract).

**Table 2:** Total phenol and flavonoid contents of *D. crinitus* solvent extracts.

Solvent extract	Total polyphenol content ( $\mu\text{g GA/mg}$ extract)	Total flavonoid content ( $\mu\text{g quercetin/mg}$ extract)
Methanolic extract of stems/leaves	$130.19 \pm 5$	$86.72 \pm 4$
Water extract of stems/leaves	$89.80 \pm 3$	$49.77 \pm 2$

Values expressed are means  $\pm$  SD of three parallel measurements.

## ANTIOXIDANT PROPERTIES

### Radical scavenging activity

The antioxidant activity of the extracts was determined by the DPPH test system. Table 3 demonstrates DPPH scavenging activity, expressed in percentage, caused by different concentrations of solvent extracts from *D. crinitus*. The weakest radical scavenging activity (20.54%) was exhibited by the water extract of 0.01 mg/mL, whereas the strongest activity (89.82%) was exhibited by the methanolic extract at a concentration of 0.2 mg/mL. The next highest activity (80.56%) was for the water extract at a concentration of 1.4 mg/mL. As shown in Table 2, the antioxidant activity of extracts increased with an increase in their concentrations. At higher concentrations, the antioxidant activity of extracts was closer to the scavenging effect of ascorbic acid. For instance, at 0.08 mg/mL, the scavenging activity of ascorbic acid was around 97.84%, and a methanolic extract solution of 0.2 mg/mL had a scavenging activity of 89.82%. The same value was obtained for the water extract at a concentration of 1.4 mg/mL. Therefore, DPPH scavenging activity is usually presented by the IC<sub>50</sub> value. Concentrations of the antioxidant providing 50% inhibition of DPPH in the test solution (IC<sub>50</sub>) were calculated and presented in Table 2. The methanolic extract of *D. crinitus* had the highest radical scavenging activity with the lowest IC<sub>50</sub> value of 0.068 mg/mL. This was higher than the water extract with an IC<sub>50</sub> value of 0.64 mg/mL.

**Table 3:** DPPH radical-scavenging of solvent extracts from *D. crinitus* at different concentrations.

Sample	Antioxidant activities	0.01	0.02	0.7	1.4
Water	Extract concentration (mg/mL)				
	Scavenging effect on DPPH (%)	20.54	26.47	53.80	80.56
	DPPH IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				0.64
Methanol	Extract concentration (mg/mL)	0.04	0.06	0.08	0.2
	Scavenging effect on DPPH (%)	35.08	46.00	57.74	89.82
	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/mL)				0.068
Ascorbic acid	Extract concentration (mg/mL)	0.04	0.05	0.06	0.08
	Scavenging effect on DPPH (%)	39.40	51.03	68.57	97.84
	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/mL)				0.048

### Reducing power

Figure 1 indicates the values of the Antioxidant activity of the methanolic and water extracts. The measurement of the Antioxidant activity of the ferric ions by the extracts of *D. crinitus* was evaluated in ascorbic equivalent of Acid used to establish a curve of reference. Fig. 1 depicts the reducing power of the extracts from *D. crinitus*. Both extracts showed the presence the reductive effects, which increased with an increase in concentration. However, the methanolic extract was more potent on reducing power compared to water extract. Actually, reducing

power is a very important aspect for the estimation of the antioxidant activity (Ksouri *et al.*, 2008). Therefore, the antioxidant activity of plant extracts might be due to the reduction of superoxide anion, inactivation of free radicals or complexation with metal ions or combination of the three. This good antioxidant activity is attributed to the presence of natural antioxidants such as phenolic compounds in *D. crinitus*. However, it is extremely important to point out that there is a positive correlation between the antioxidant activity potential and the amount of phenolic compounds in the extracts. Moreover, as reported in literature data (Bellakhdar, 1997), the antioxidant activity of extracts could be attributed to its relatively high content of the phenolic compounds.

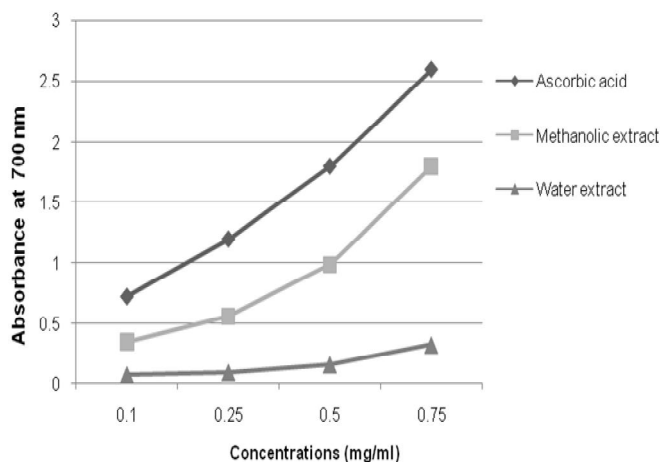


Fig. 1: Reducing power of methanolic and water extract of *D. crinitus*

## CONCLUSIONS

This study affirms the *in vitro* antioxidant potential of solvent extracts of *D. crinitus*, with results comparable to those of the standard compounds such as gallic acid and can therefore be proposed as new potential sources of natural additives for the food and/or pharmaceutical industries. However, the components responsible for the antioxidant activities of the extracts were not identified and further work should be conducted to isolate and identify these bioactive compounds.

## REFERENCES

Agrawal, P.K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Studies in Organic Chemistry, vol. 39. Elsevier (1989). p. 564.  
 Barreiros, A.L.B.S., David, J.M. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. Quim Nova. 2006; 29:113-23.  
 Bellakhdar, J. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis press (1997).

Capecka, E., Mareczek, A., Lejas, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. Food Chemistry. 2005; 93: 223-226.

Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. J. Agric. Food Chem. 2003; 51: 4563-4569.

Fecka, I., Raj, D., Krauze-Baranowska, M. Quantitative determination of fourwater-soluble compounds in herbal drug from Lamiaceae using different chromatographic techniques. Chromatographia. 2007; 66: 87-93.

Gülçin, I., Oktay, M., Kırgeççi, E., Küfrevio lu, I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food. Chem. 2003; 83: 371-382.

Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging affects. Chem. Pharm. Bull. 1988; 36: 1090-2097.

Hausteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem Pharm. 1983; 32:1141-1148.

Havsteen, B.H. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. Pharmacol. Ther. 2002; 96: 67-202.

Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdely, C. Influence of biological, environmental, and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. CR Biol. 2008; 331: 865-873.

Li, H.B., Wong, C.C., Cheng, K.W., Chen, F. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. Food Sci. Technol. 2008; 41: 385-390.

Matkowski, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – a review. Biotechnol. Adv. 2008; 26: 548-560.

Matos, F.J.A. In: Introdução a fitoquímica experimental. 2e ed., Fortaleza: Edicoes UFC (1997).

Okuda, T., Yoshiba, T., Hatano, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. Planta Med. 1989; 55:117-22.

Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japan J Nutr. 1986; 44: 307-315.

Quertier, D.C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M.C., Cayin, J.C., Bailleul, F. and TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. Journal of ethnopharmacology. 2000; 72: 35-42.

Quezel, P., Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris. (1963) p. 671.

Shimoi, K., Masuda, S., Shen, B., Furugori, B., Kinai, N. Radioprotective effect of antioxidant plant flavonoids in mice. Mutat. Res. 1996; 350: 153-161.

Slinkard, K., Singleton, V.L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Vitic. 1977; 28: 49-55.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetable and grain products. J Agric. Food Chem. 1998; 46: 4113-4117.

Wang, H., Nair, M.G., Straburg, G.M., Booren, A.M., Gray, J.I. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). J. Agric. Food. Chem. 1999; 47: 840-844.

Yen, G.C., Hsieh, C.L. Antioxidant activity of extracts from *Du-Zhong* (*Eucoma ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. J. Agric. Food. Chem. 1998. 46: 3952-3957.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Biological activities and volatile constituents of *Daucus muricatus* L. from Algeria

Amel Bendiabdellah<sup>1</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>1</sup>, Nassim Djabou<sup>1,2</sup>, Hocine Allali<sup>1</sup>, Boufeldja Tabti<sup>1</sup>, Alain Muselli<sup>2\*</sup> and Jean Costa<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** In order to find new bioactive natural products, the antimicrobial and antioxidant activities of essential oil components extracted from the separated organs of the Algerian medicinal and aromatic plant *Daucus muricatus* L. were studied.

**Results:** The chemical composition of essential oils obtained by hydrodistillation (HD) was investigated using Gas Chromatography–Retention Indices (GC–RI) and GC–Mass Spectrometry (GC–MS). Two types of essential oils were produced by *D. muricatus*: (i) The oil from roots is mainly composed by nonterpenic oxygenated compounds (59.8 g/100 g), and (ii) the aerial part oils (i.e., the leaves, stems, flowers, and umbels) was mainly composed by terpenic hydrocarbon compounds (62.3–72.2 g/100 g). The chemical composition of the volatile fraction isolated from different organs of *Daucus muricatus* was studied by HS–SPME/GC–RI and GC–MS after optimization of Solid Phase MicroExtraction parameters. For all organs studied, the main volatiles emitted by the plant were hydrocarbon compounds (60.7–82.2 g/100 g). Only quantitative differences between the volatiles of the separated organs studied were observed. In addition, the activity of the oil of *D. muricatus* against eight bacterial strains and one yeast was investigated. The oil from roots revealed active against *S. aureus*, while the essential oil obtained from the aerial parts was active against the yeast *C. albicans*.

**Conclusions:** *Daucus muricatus* essential oil seems be a promising source of natural products with potential antimicrobial activity.

**Keywords:** *Daucus muricatus*. L, Essential oils, HS–SPME, GC/MS, Antimicrobial and antioxidant activities

## Background

*Daucus* is a genus belonging to the Apiaceae family and consists of about 600 species that are widely distributed around the world. In Algeria, the *Daucus* genus is represented by more than 27 species living in dry and uncultivated areas [1], and they are mostly found from Tlemcen to Mascara [1,2]. The most prevalent of the species is *Daucus carota* L. (carrot) reported with eight subspecies throughout Algeria [1]. *Daucus muricatus* L., synonym of *Artemisia muricata* L., *Caucalis muricata* L., and *Platyspermum muricatum* Hoffm., is widely distributed in Algeria, Spain, Portugal, Corsica, Sardinia, Sicily, Italy, the Aegean Islands, and Turkey [2]. *Daucus muricatus* is an annual plant 30–50 cm high, dark green,

bristling at the base, with a stem thickened at the nodes and branches spreading erect. The leaves are soft and lanceolate in their periphery in segments cut into narrow strips with white flowers. The umbels opposite the leaves at the end are contracted, the fruit are large, elliptical and compressed, armed with spines expanded and confluent at the base [1,2]. Several investigations deal with the chemical composition of essential oils of the *Daucus* species [3–27]. While no study has investigated *D. muricatus* essential oils, most of them have reported the chemical composition of essential oils from *D. carota* and its subspecies [3,4,6–16,20,22,23,25–27]. However, only three studies have reported the chemical composition of essential oils from *Daucus* species from Algeria. The first reported the chemical composition of the essential oil of *D. reboudii* Coss. [17], and the other two reported the chemical composition of the oil from *D. crinitus* Desf. [18,19]. Previous reports showed that

\* Correspondence: muselli@univ-corse.fr

<sup>2</sup>UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, Université de Corse, BP 52, 20250, Corte, France

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



the chemical composition of *Daucus* species was more dominated by monoterpene hydrocarbon compounds such  $\alpha$ -pinene and sabinene [3,4,10,14,15], and occasionally by phenylpropanoids compounds such as apiol, myristicin, and isochavicol [3,14-16]. Several studies recently investigated the biological activity of *Daucus* essential oils [6,10,12,19,20]. However, there remain many species and subspecies of *Daucus* that have not yet been examined.

As part of our ongoing chemical investigation of the essential oils from the Algerian *Daucus* genus [18] and our search for active natural products to fight nosocomial infections, we investigated for the first time the chemical composition and biological activities of *Daucus muricatus* L. through the study of: (i) the volatile components of *D. muricatus* roots, leaves, stems, flowers, and umbels extracted by hydrodistillation and by solid phase microextraction (SPME) using gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), (ii) the antibacterial activity of *D. muricatus* essential oil against nine species of microorganisms involved in nosocomial infections using paper disc diffusion and agar dilution methods.

## Results and discussion

### Essential oil chemical composition

GC-RI and GC-MS analysis of *D. muricatus* essential oils obtained from the roots, stems, leaves, flowers, and umbels that accounted for 92.8, 94.7, 94.5, 95.4, and 95.7 g/100 g of the oils, respectively and allowed the identification of 99 compounds. Their retention indices, yields, and relative concentrations expressed in g/100 g of essential oil are shown in Table 1. Among these, 39 monoterpenes, 32 sesquiterpenes, 22 nonterpenic compounds, three diterpenes, two phenylpropanoids, and one  $C_{13}$ -isopropenoid were identified. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC-retention indices with those of our laboratory-produced "Arômes" library, with the exception of nine components that were identified by comparison with spectral data and retention indices from the literature (see Table 1). Two types of essential oils were produced by *D. muricatus*. The root oils are mainly composed by oxygenated compounds (59.8 g/100 g), and the aerial part oils (i.e., the leaves, stems, flowers, and umbels) were dominated by the occurrence of hydrocarbon compounds (62.3-72.2 g/100 g). The main components of root oil were nonterpenic aliphatic compounds that accounted for 56.7 g/100 g, such as eicosane (18.6 g/100 g), undecan-2-one (10.2 g/100 g), and tridecanol (6.4 g/100 g). Conversely, the main components of aerial organs of *D. muricatus* were monoterpene hydrocarbons (52.0-58.5 g/100 g). For all organs studied, limonene (21.9-24.0 g/100 g) and  $\alpha$ -pinene (9.9-21.8 g/100 g)

were the main components. Their relative abundances were followed by that of sabinene (4.7-8.1 g/100 g) in stems, leaves and flowers, and trans-sabinyl acetate in umbels (12.1 g/100 g). On moving from the bottom to the top of the plant, we noted that the relative concentrations of nonterpenic compounds decreased as follows: 56.7 g/100 g in the roots, 12.5 g/100 g in the stems, 7.7 g/100 g in the leaves, 4.0 g/100 g in the flowers, and then 3.6 g/100 g in the umbels.

### HS-SPME analysis

The volatiles emitted from the *D. muricatus* roots, leaves, stems, umbels, and flowers were investigated using HS-SPME under optimized parameters. The optimization of the HS-SPME sampling parameters was conducted using fresh plant material based on the sum of the total peak areas obtained using GC-FID. The maximum sum of the total peak area was acquired for an equilibrium and extraction temperature of 70°C, an equilibrium time of 60 min, and an extraction time of 30 min. The GC-RI and GC-MS analysis identified 78 components: 42 monoterpenes, 18 nonterpenic compounds, 16 sesquiterpenes, and two phenylpropanoids (Table 2). Identification of 74 components was conducted by comparing their EI-MS and retention indices with those in our laboratory-produced "Arômes" library, and four components were identified by comparing their EI-MS data and their apolar retention indices with those reported in the literature and in commercial libraries. Regarding the organ contribution to the aromatic plant fingerprint, it should be noted that the volatile constituents were more abundant in the leaves than in the other parts of the plant. Our analysis showed that the chemical composition of the HS fractions obtained from different organs was qualitatively similar but differed by the relative amounts of the main components. Relative to *D. muricatus* oil, the main volatiles emitted by plant were hydrocarbon compounds (60.7-82.2%) for all organs studied. More precisely, the sum of hydrocarbon monoterpenes (33.6%-64.1%) and hydrocarbon nonterpenic compounds (6.4%-25.5%) was higher than that of oxygenated compounds, which never accounted for more than 23.9 g/100 g. The main volatile components of roots were terpinolene (10.2%), bornyl acetate (9.7%), p-cymene (9.1%),  $\alpha$ -pinene (8.7%), and undecane (7.2%). The relative amounts of terpinolene (0.4%-1.3%) and p-cymene (3.1%-3.4%) were lower in the aerial organs, and the main volatile emitted by leaves, flowers and umbels was limonene (30.6%, 19.1%, and 28.1%, respectively). In the stems, limonene (13.3%) was present in lower amounts than undecane (16.9%), which was identified as a major component. In addition, undecane was produced in appreciable amounts in leaves, flowers, and umbels (6.1%, 3.6%, and 7.4%, respectively). They were

**Table 1 Composition of the essential oils of *D. muricatus* (roots, leaves, stems, flowers and umbels)**

N°	Components <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	Aerial parts	Separated organs <sup>e</sup>					Identification <sup>f</sup>
						Stems	Leaves	Flowers	Umbels	Roots	
1	Nonane	900	898	899	1.0	0.5	1.3	1.1	0.3	-	RI, MS
2	$\alpha$ -Thujene	932	923	1011	0.6	tr	0.2	0.7	0.1	-	RI, MS
3	$\alpha$ - Pinene	936	931	1016	16.7	9.9	18.9	14.3	21.8	0.5	RI, MS
4	Camphene	950	944	1056	0.3	0.2	0.2	0.2	0.8	tr	RI, MS
5	Thuja-2,4 (10) diene	946	945	1085	tr	0.2	0.1	tr	-	-	RI, MS
6	Sabinene	973	967	1111	18.9	5.1	4.7	8.1	4.6	0.2	RI, MS
7	$\beta$ -pinene	978	970	1102	2.5	2.1	1.8	2.8	1.4	0.1	RI, MS
8	Myrcene	987	980	1152	1.8	2.1	2.3	1.6	2.6	-	RI, MS
9	$\alpha$ -Phellandrene	1002	997	1140	0.6	0.5	0.4	0.6	0.2	-	RI, MS
10	$\alpha$ -Terpinene	1013	1008	1158	1.1	1.1	1.1	1.5	0.8	0.1	RI, MS
11	p-Cymene	1015	1012	1147	1.3	4.4	1.4	0.9	1.4	0.1	RI, MS
12	Limonene	1025	1022	1195	14.2	22.6	21.3	24.0	21.9	0.3	RI, MS
13	(Z)- $\beta$ -Ocimene	1029	1025	1215	0.1	0.1	0.1	tr	0.2	tr	RI, MS
14	$\gamma$ -Terpinene	1051	1049	1239	2.6	2.4	1.6	3.1	1.1	tr	RI, MS
15	trans-Sabinene hydrate	1053	1052	1438	0.2	0.1	0.1	0.3	tr	-	RI, MS
16	Nonan-2-one	1070	1073	1392	0.1	0.6	0.1	tr	0.1	0.3	RI, MS
17	p-Cymenene	1075	1077	1420	0.6	0.7	0.1	tr	tr	0.1	RI, MS
18	Terpinolene	1082	1079	1292	0.3	0.6	0.3	0.7	0.2	0.1	RI, MS
19	Linalool	1083	1085	1392	0.1	tr	0.4	0.3	0.2	-	RI, MS
20	Undecane	1100	1100	1098	0.6	2.1	1.9	0.4	0.9	0.1	RI, MS
21	Limonene-1,2-epoxide	1117	1119	1446	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.9	RI, MS
22	trans-Pinocarveol	1126	1120	1632	0.3	0.7	0.1	0.2	0.2	0.2	RI, MS
23	trans-2-Nonenal	1135	1133	1525	0.2	1.2	0.4	0.1	0.2	1.1	RI, MS
24	Pinocarvone	1137	1135	1520	0.1	0.4	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
25	Borneol	1150	1149	1670	0.1	0.2	0.1	tr	0.1	tr	RI, MS
26	Cryptone	1160	1159	1642	0.2	0.5	0.3	0.1	0.3	0.2	RI, MS
27	Terpinen-4-ol	1164	1160	1563	2.7	1.1	0.8	3.1	0.8	1.7	RI, MS
28	Decan-2-one	1176	1170	1503	0.1	0.8	0.3	0.2	0.1	0.2	RI, MS
29	$\alpha$ -Terpineol	1176	1177	1685	0.2	0.3	0.1	0.1	tr	tr	RI, MS
30	Myrtenol	1178	1182	1763	tr	0.5	0.1	0.1	0.2	0.7	RI, MS
31	Decanal	1188	1185	1481	tr	0.8	0.1	0.1	tr	0.2	RI, MS
32	Dodecane	1200	1199	1201	tr	0.2	0.1	tr	0.1	0.3	RI, MS
33	Citronellol	1213	1211	1724	0.1	0.1	0.1	tr	-	tr	RI, MS
34	Carvone	1214	1215	1749	tr	0.2	0.1	tr	-	tr	RI, MS
35	Pulegone	1215	1216	1602	tr	0.1	tr	tr	-	-	RI, MS
36	p-Anisaldehyde	1218	1219	2049	tr	0.6	tr	tr	0.3	-	RI, MS
37	Geraniol	1235	1235	1799	0.1	0.1	0.1	0.2	-	tr	RI, MS
38	trans-Myrtenol	1240	1236	1858	tr	0.1	0.2	0.2	0.5	-	RI, MS
39	cis-Chrysanthenyl acetate	1253	1242	1548	0.3	2.2	0.5	tr	0.1	0.2	RI, MS
40	$\alpha$ -Terpinen-7-al	1257	1256	1763	0.1	0.2	0.2	0.4	0.3	tr	RI, MS
41	Thymol	1267	1264	2149	tr	0.1	0.1	0.1	-	0.6	RI, MS
42	Bornyl acetate	1270	1266	1536	0.2	0.6	0.2	0.1	0.4	0.9	RI, MS
43	Undecan-2-one	1273	1270	1579	0.3	3.9	0.5	0.3	0.8	10.2	RI, MS
44	trans-Sabinyl acetate	1278	1271	1650	2.6	1.5	0.7	0.2	12.1	3.1	RI, MS, Ref1
45	Carvacrol	1278	1278	2224	tr	0.2	0.4	tr	0.1	0.5	RI, MS
46	Undecan-2-ol	1287	1285	1723	0.1	0.3	0.1	tr	-	1.2	RI, MS

**Table 1 Composition of the essential oils of *D. muricatus* (roots, leaves, stems, flowers and umbels) (Continued)**

47	Myrtenyl acetate	1332	1320	1701	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	0.3	RI, MS
48	$\delta$ -Elemene	1340	1337	1535	0.2	0.5	1.7	0.1	0.2	-	RI, MS
49	Geranyl acetate	1362	1360	1715	tr	0.2	tr	2.3	-	0.2	RI, MS
50	Undecanol	1363	1365	1820	0.2	0.6	1.1	1.2	0.1	0.3	RI, MS
51	$\alpha$ -Copaene	1379	1377	1488	0.2	0.6	0.5	0.2	0.5	-	RI, MS
52	$\beta$ -Bourbonene	1379	1383	1496	tr	0.4	0.3	0.2	0.1	-	RI, MS
53	$\beta$ -Elemene	1389	1390	1570	0.3	0.3	0.1	0.2	0.5	-	RI, MS
54	Dodecanal	1389	1395	1673	tr	0.1	0.1	0.2	tr	1.9	RI, MS
55	Aristolene	1418	1420	1553	0.1	tr	0.1	0.3	0.1		RI, MS
56	trans-Caryophyllene	1424	1422	1586	1.8	0.6	3.8	2.4	2.1	0.3	RI, MS
57	Geranyl acetone	1429	1426	1842	0.1	0.4	0.2	0.3	0.4	0.1	RI, MS
58	$\beta$ -Copaene	1430	1430	1579	tr	0.1	0.1	tr	0.4	-	RI, MS
59	$\alpha$ -Humulene	1455	1450	1655	0.4	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5	RI, MS
60	$\beta$ -Ionone	1468	1460	1902	0.5	0.2	0.1	0.8	0.4	-	RI, MS
61	Dodecanol	1472	1468	1754	0.2	0.2	0.2	tr	0.1	3.7	RI, MS
62	$\gamma$ -Muuroolene	1473	1471	1667	0.1	0.9	0.3	0.1	-	-	RI, MS
63	Germacrene D	1479	1476	1665	1.5	0.2	1.6	1.4	2.9	1.5	RI, MS
64	trans- $\beta$ -Bergamotene	1480	1475	1598	tr	tr	tr	0.1	tr	0.8	RI, MS
65	6-epi-Shyobunone	1481	1480	1855	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	RI, MS
66	$\gamma$ -Humulene	1483	1487	1682	0.2	0.4	0.2	0.4	0.1	-	RI, MS
67	Bicyclogermacrene	1494	1490	1706	0.4	0.4	0.3	0.2	0.2	-	RI, MS
68	$\alpha$ -Muuroolene	1496	1498	1710	0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	-	RI, MS
69	Shyobunone	1500	1501	1897	0.1	0.5	0.5	0.4	0.2	0.1	RI, MS
70	$\delta$ -Cadinene	1520	1515	1715	0.8	0.2	0.6	0.6	1.7	0.5	RI, MS
71	E- $\alpha$ -Bisabolene	1531	1526	1733	0.6	0.8	1.6	0.4	1.2	0.2	RI, MS
72	Isochavicol isobutyrate	1541	1538	2136	5.3	1.2	2.2	6.7	1.6	2.3	RI, MS
73	Germacrene B	1552	1555	1794	0.2	0.6	0.2	0.2	0.8	tr	RI, MS, Ref1
74	1,5-Epoxy-salvial-4(14)-ene	1561	1561	1903	0.1	0.7	0.4	0.5	0.4	3.6	RI, MS
75	Spathulenol	1572	1564	2091	0.5	1.2	1.4	0.3	0.6	-	RI, MS
76	Caryophyllene oxide	1578	1582	1943	tr	0.1	0.3	0.1	tr	0.5	RI, MS
77	Tridecanol	1580	1586	2034	-	tr	tr	tr	tr	6.4	RI, MS, Ref2
78	Viridiflorol	1590	1586	2071	0.1	0.9	0.3	0.5	0.2		RI, MS
79	Copaborneol	1592	1595	2142	0.5	0.8	0.3	1.5	0.1	1.4	RI, MS
80	Guaia-6,10(14)-diene-4 $\beta$ -ol	1610	1609	2119	1.1	2.5	2.1	6.6	0.5	0.9	RI, MS, Ref1
81	epi-Cubenol	1621	1623	2046	0.2	0.3	0.2	0.4	0.3	0.9	RI, MS
82	Cubenol	1630	1631	2001	0.5	0.2	0.2	0.3	tr	tr	RI, MS
83	$\tau$ -Muurolol	1633	1635	2156	0.5	0.7	0.3	0.6	0.7	1.4	RI, MS
84	$\alpha$ -Cadinol	1643	1644	2212	0.5	0.7	0.5	0.6	0.3	0.9	RI, MS
85	Isochavicol 2-methyl butyrate	1651	1654	2256	0.1	0.3	0.2	0.2	-	0.4	RI, MS
86	(Z)- $\alpha$ -Santalol	1669	1665	2306	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	-	RI, MS
87	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	1671	1672	2346	0.1	0.3	0.2	0.1	0.5	1.3	RI, MS
88	(E,Z)-Farnesol	1685	1680	2313	tr	0.2	0.1	0.1	0.1	3.1	RI, MS
89	Heptadecane	1700	1699	1698	tr	0.3	0.3	0.1	0.1	0.5	RI, MS
90	Tetradecanoic acid	1761	1756	2651	tr	0.1	0.2	0.2	-	1.7	RI, MS, Ref2
91	Neophytadiene	1807	1806	1920	0.1	0.2	1.7	0.1	0.1	1.3	RI, MS, Ref1
92	Diisobutyl ester	1826	1826	2525	0.2	0.1	0.4	tr	tr	0.9	RI, MS, Ref2
93	6,10,14-Trimethylpentadecanone	1845	1842	2125	0.2	0.1	0.4	tr	0.1	1.8	RI, MS, Ref2
94	Hexadecanoic acid	1951	1956	2821	0.1	0.2	tr	tr	0.2	3.1	RI, MS, Ref1

**Table 1 Composition of the essential oils of *D. muricatus* (roots, leaves, stems, flowers and umbels) (Continued)**

95	Eicosane	2000	2000	1998	tr	0.1	tr	tr	0.2	18.6	RI, MS
96	(Z)-Phytol	2080	2085	2611	0.2	0.2	0.8	0.1	0.3	-	RI, MS
97	(E)-Phytol	2114	2119	2568	0.3	0.2	1.9	tr	0.1	-	RI, MS
98	Tricosane	2300	2302	2299	0.1	0.2	tr	tr	0.1	1.5	RI, MS
99	Pentacosane	2500	2498	2501	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	2.7	RI, MS
Total identification g/100g					90.9	93.7	93.6	98.7	95.3	90.1	
Essential oil yield% (w/w)					0.2	0.04	0.03	0.09	0.12	0.02	
Monoterpene hydrocarbons					61.6	52.0	54.5	58.5	57.1	1.5	
Oxygenated monoterpenes					8.2	10.2	5.3	9.2	16.5	9.1	
Sesquiterpene hydrocarbons					7.2	6.6	12.2	7.5	11.4	3.8	
Oxygenated sesquiterpenes					4.4	9.6	7.0	12.3	4.3	14.4	
Phenylpropanoids					5.4	2.2	2.5	7.0	1.9	3.3	
Oxygenated diterpenes					0.5	0.4	2.7	0.1	0.4	-	
Diterpenes hydrocarbons					0.1	0.2	1.7	0.1	0.1	1.3	
Non-terpenic compounds					3.5	12.5	7.7	4.0	3.6	56.7	

a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1), b Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from König et al., 2001., c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa), d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp), e Quantification was carried out using RFs relative to tridecane as internal standard, g/100 g: concentration expressed in g/100 g of essential oil are given on the apolar column except for components with identical RIa (concentrations are given on the polar column), tr = trace (<0.05 g/100 g), f RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; Ref1.; compounds identified from literature data König et al., 2001, Ref2.; compounds identified from literature data NIST Chemistry WebBook.

accompanied by  $\alpha$ -pinene, which accounted for 8.1% in stems and always more than 13.1% in leaves, flowers and umbels. With these hydrocarbon compounds, we noted the occurrence of trans-sabinyl acetate, which had a relatively higher concentration in umbels (9.6%) than in the other aerial organs (2.6%–3.8%). The chemical differences observed between the essential oils and the volatile fractions extracted using HD and SPME, respectively, can be explained by the fact that the first technique is based on the liquid quasi-total extraction of plant volatiles, and the latter technique is controlled by a solid/gas equilibrium step. During hydrodistillation, the most volatile and water soluble compounds are lost in the gaseous phase and in the hydrolate, respectively, whereas, with HS extraction, it is the fiber affinity of each compound that monitors the sampling of the volatiles. As a consequence, it should be noted that 23 compounds (1a–1e, 5a, 8a, 9a, 13a, 14a, 19a, 20a, 21a, 22a, 22b, 27a, 27b, 29a, 38a, 47a, 51a, 54a, and 65a) were only identified in the volatile fractions extracted using HS–SPME.

#### Antimicrobial activity (assay disk)

Preliminary screening of the antimicrobial activity in vitro of the essential oils from *D. muricatus* species against nine pathogenic microorganisms were studied using the filter paper disc agar-diffusion technique. The results showed variation in the antimicrobial properties of the plant essential oil (Table 3). The essential oil showed strong activity (inhibition zone >20 mm), moderate activity (inhibition zone <20–12 mm), and no inhibition (zone <12 mm). The highest activity (diameter of

inhibition zone 22 mm) was demonstrated against *S. aureus* by the essential oil of the root, while the lowest (diameter of inhibition zone 6 mm) was demonstrated against *E. coli* by oil from the aerial parts. Other hand, *C. albicans*, *B. cereus* and *L. monocytogenes* were also prone to growth inhibition with diameter zones of inhibition ranging from 12 to 16 mm. Rest of the bacterial strains (*B. subtilis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* and *E. coli*) showed no inhibition, with diameter of zones of inhibition ranging from 8 to 10 mm (Table 3).

#### Minimum inhibitory concentrations (MIC)

The in-vitro antibacterial activities of essential oil from the roots and aerial parts of *D. muricatus* against the employed bacteria were assessed qualitatively and quantitatively by the presence or absence of inhibition zones. The noted antibacterial and antifungal effects of the two are presented in Table 3. In general, the roots oil showed higher activity against bacteria than oil of aerial parts. The most prominent inhibitory action of roots oil was observed against *S. aureus* with a MIC of 0.8  $\mu$ g/ml. However, *B. cereus* and *L. monocytogenes* showed moderate activity with MIC values of 65  $\mu$ g/ml. As for the antifungal effect, the aerial parts oil was found to be effective against the pathogenic yeast *C. albicans* (MIC = 45  $\mu$ g/ml) and an average activity antimicrobial on the *B. cereus* and *L. monocytogenes* with a MIC of 250  $\mu$ g/ml. It should be noted that the highest tested concentration (6000  $\mu$ g/ml) of had no effect on other growth of microorganisms. Various chemical compounds isolated by hydrodistillation of oils from *D. muricatus*

**Table 2 Chemical composition of *D. muricatus* volatile fractions extracted by HS-SPME**

N°	Components <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	Aerial parts	Separated organs <sup>e</sup>				
					Stems	Leaves	Flowers	Umbels	Roots
1a	Heptane	700	700	2.6 ± 0.07	7.9 ± 0.28	1.3 ± 0.11	1.1 ± 0.15	0.3 ± 0.04	0.2 ± 0.01
1b	3-Methyl butanol	709	705	0.3 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01
1c	3-Methyl-pentan-2-ol	754	760	0.4 ± 0.14	0.4 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.5 ± 0.09	0.4 ± 0.01	0.7 ± 0.01
1d	Hexanal	780	771	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.06	1.4 ± 0.07
1	Nonane	900	898	0.5 ± 0.07	0.5 ± 0.02	1.1 ± 0.22	0.4 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01
1e	Artemisiatriene	923	921	0.2 ± 0.01	-	-	0.3 ± 0.06	0.1 ± 0.01	-
2	α-Thujene	932	923	0.1 ± 0.01	-	0.1 ± 0.01	0.5 ± 0.04	0.1 ± 0.01	-
3	α-Pinene	936	931	13.2 ± 0.74	8.1 ± 0.36	16.1 ± 0.89	13.1 ± 0.97	15.5 ± 1.1	8.7 ± 0.14
4	Camphene	950	944	0.2 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.08	0.4 ± 0.01
5a	Butyl butyrate	970	966	0.2 ± 0.01	-	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01
6	Sabinene	973	967	2.9 ± 0.21	1.4 ± 0.14	2.3 ± 0.45	6.5 ± 0.33	1.5 ± 0.46	0.3 ± 0.01
7	β-Pinene	978	970	0.9 ± 0.06	0.7 ± 0.02	1.2 ± 0.56	1.1 ± 0.51	1.1 ± 0.13	1.6 ± 0.21
8	Myrcene	987	980	2.9 ± 0.13	1.5 ± 0.14	3.2 ± 0.21	2.9 ± 0.12	3.9 ± 0.66	0.1 ± 0.01
8a	Yomogi alcohol	991	981	0.4 ± 0.07	0.7 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.05	-
9	α-Phellandrene	1002	997	1.5 ± 0.13	-	3.1 ± 0.16	2 ± 0.29	1.1 ± 0.29	-
9a	3-Carene	1010	1005	0.1 ± 0.01	-	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.01
10	α-Terpinene	1013	1008	0.8 ± 0.06	-	0.3 ± 0.01	2.8 ± 0.22	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01
11	p-Cymene	1015	1012	3.2 ± 0.32	3.4 ± 0.12	3.1 ± 0.51	3.4 ± 0.51	3.2 ± 0.11	9.1 ± 0.76
12	Limonene	1025	1022	22.4 ± 1.28	13.3 ± 0.56	30.6 ± 0.99	19.1 ± 0.77	28.1 ± 0.82	6.9 ± 0.35
13	(Z)-β-Ocimene	1029	1025	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.01
13a	(E)-β-Ocimene	1041	1031	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.01
14	γ-Terpinene	1051	1049	3.2 ± 0.09	4.1 ± 0.54	2.5 ± 0.22	5.1 ± 0.55	1.3 ± 0.35	1.2 ± 0.01
14a	Octanol	1063	1052	0.3 ± 0.01	tr	0.6 ± 0.01	0.4 ± 0.08	0.3 ± 0.05	-
16	Nonan-2-one	1070	1073	0.6 ± 0.07	0.7 ± 0.02	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.08	0.6 ± 0.09	0.2 ± 0.01
17	p-Cymenene	1075	1077	0.3 ± 0.06	-	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.06	0.7 ± 0.03	3.1 ± 0.13
18	Terpinolene	1082	1079	0.7 ± 0.06	0.6 ± 0.01	0.9 ± 0.07	1.3 ± 0.23	0.4 ± 0.01	10.2 ± 0.86
19	Linalool	1083	1085	1.4 ± 0.08	3.2 ± 0.28	0.5 ± 0.01	1.1 ± 0.29	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.01
19a	α-Thujone	1089	1086	0.5 ± 0.04	1.8 ± 0.09	tr	0.5 ± 0.02	0.4 ± 0.02	0.1 ± 0.01
20	Undecane	1100	1100	8.9 ± 0.76	16.9 ± 0.89	6.1 ± 0.38	3.6 ± 0.14	7.4 ± 0.69	7.2 ± 0.26
20a	3-Octyl acetate	1113	1103	1.8 ± 0.12	0.7 ± 0.06	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01
21a	Camphor	1123	1119	1.1 ± 0.07	2.9 ± 0.16	0.7 ± 0.01	0.6 ± 0.06	0.2 ± 0.01	0.5 ± 0.01
22	trans-Pinocarveol	1126	1120	0.4 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.4 ± 0.01	0.6 ± 0.02	0.1 ± 0.01
22a	Citronellal	1129	1130	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.05	-
22b	cis-Verbenol	1132	1132	0.1 ± 0.01	-	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	-
24	Pinocarvone	1137	1135	0.1 ± 0.01	-	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.7 ± 0.01
25	Borneol	1150	1149	0.5 ± 0.08	0.9 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.01	-
26	Cryptone	1160	1159	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.08	0.4 ± 0.01	0.7 ± 0.09	3.8 ± 0.11
27	Terpinene-4-ol	1164	1160	1.4 ± 0.18	2.1 ± 0.43	0.9 ± 0.06	1.8 ± 0.36	1.1 ± 0.15	0.1 ± 0.01
27a	Myrtenal	1172	1163	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.02
27b	Estragole	1175	1169	1.1 ± 0.09	1.1 ± 0.58	1.3 ± 0.29	1.7 ± 0.12	0.6 ± 0.08	-
29	α-Terpineol	1176	1177	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.04	0.4 ± 0.08	0.4 ± 0.03	0.5 ± 0.01	0.2 ± 0.01
29a	Verbenone	1184	1178	0.3 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01	-
31	Decanal	1188	1185	0.1 ± 0.01	-	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	-
33	Citronellol	1213	1211	1.1 ± 0.14	1.1 ± 0.22	1.1 ± 0.33	0.9 ± 0.06	1.5 ± 0.23	0.1 ± 0.01
34	Carvone	1214	1215	0.7 ± 0.07	1.1 ± 0.09	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.02	0.1 ± 0.01
35	Pulegone	1215	1216	0.3 ± 0.01	0.8 ± 0.02	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01	-

**Table 2 Chemical composition of *D. muricatus* volatile fractions extracted by HS-SPME (Continued)**

37	Geraniol	1235	1235	0.2 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.8 ± 0.05
38	trans-Myrtanol	1240	1236	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.3 ± 0.01	-
38a	Geranial	1244	1239	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	tr	-
39	cis-Chrysanthenyl acetate	1253	1242	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	-
42	Bornyl acetate	1270	1266	0.6 ± 0.05	1.2 ± 0.11	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.06	0.6 ± 0.04	9.7 ± 0.55
43	Undecan-2-one	1273	1270	0.6 ± 0.08	0.8 ± 0.04	0.6 ± 0.08	0.4 ± 0.03	0.5 ± 0.01	0.3 ± 0.01
44	trans-Sabinyl acetate	1278	1271	5.1 ± 0.47	3.8 ± 0.26	2.6 ± 0.12	3.5 ± 0.38	9.6 ± 0.53	
47a	Neryl acetate	1342	1335	2.0 ± 0.31	2.4 ± 0.36	3.4 ± 0.65	1.3 ± 0.35	0.9 ± 0.1	0.3 ± 0.01
48	δ-Elemene	1340	1337	0.3 ± 0.02	0.7 ± 0.06	0.3 ± 0.05	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01
49	Geranyl acetate	1362	1360	0.1 ± 0.01	tr	tr	0.2 ± 0.01	tr	0.2 ± 0.01
50	Undecanol	1363	1365	0.1 ± 0.01	tr	tr	tr	tr	1.9 ± 0.01
51	α-Copaene	1379	1377	0.7 ± 0.01	1.1 ± 0.12	0.4 ± 0.02	0.6 ± 0.03	0.9 ± 0.08	0.4 ± 0.01
51a	Daucene	1380	1379	0.5 ± 0.02	0.9 ± 0.08	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.7 ± 0.06
54	Dodecanal	1389	1395	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	1.3 ± 0.01
54a	Tetradecane	1400	1399	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	tr	-
56	trans-Caryophyllene	1424	1422	2.3 ± 0.23	1.4 ± 0.13	3.1 ± 0.25	3.8 ± 0.26	1.2 ± 0.15	1.9 ± 0.18
58	β-Copaene	1430	1430	0.3 ± 0.02	0.4 ± 0.01	0.6 ± 0.05	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.01
59	α-Humulene	1455	1450	0.4 ± 0.05	-	0.1 ± 0.01	0.9 ± 0.08	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
61	Dodecanol	1472	1468	tr	tr	tr	tr	tr	3.4 ± 0.28
62	γ-Murolene	1473	1471	1.3 ± 0.13	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.01	1.5 ± 0.42	1.9 ± 0.21	4.3 ± 0.16
63	Germacrene D	1479	1476	0.4 ± 0.04	0.5 ± 0.06	0.2 ± 0.01	0.4 ± 0.02	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01
64	trans-β-Bergamotene	1480	1475	tr	tr	tr	tr	tr	0.5 ± 0.03
65	6-epi-Shyobunone	1481	1480	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	-
65a	β-Selinene	1486	1481	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.03	0.5 ± 0.02
69	Shyobunone	1500	1501	0.1 ± 0.01	tr	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.7 ± 0.01
70	δ-Cadinene	1520	1515	0.6 ± 0.04	0.5 ± 0.01	0.3 ± 0.04	0.1 ± 0.01	1.3 ± 0.16	0.9 ± 0.07
71	(E)-α-Bisabolene	1531	1526	1.1 ± 0.31	0.5 ± 0.02	1.4 ± 0.12	0.9 ± 0.1	1 ± 0.45	0.4 ± 0.01
72	Isochavicol isobutyrate	1541	1538	0.3 ± 0.05	tr	0.3 ± 0.01	0.9 ± 0.06	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.1
76	Caryophyllene oxide	1578	1582	0.2 ± 0.01	-	0.1 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.7 ± 0.01
77	Tridecanol	1580	1586	tr	tr	tr	tr	tr	1.1 ± 0.07
87	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	1671	1672	tr	-	tr	tr	tr	0.6 ± 0.01
89	Heptadecane	1700	1699	0.4 ± 0.13	-	1.3 ± 0.65	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	-
Total identification (%)				97.8	95.4	99.1	94.3	97.6	90.6
GC-FID Total area 10 <sup>5</sup>				103	22	154	108	107	68
Monoterpene hydrocarbons				52.9	33.6	64.1	59.3	57.8	42.8
Oxygenated monoterpenes				20.6	25.6	14.4	16	20.5	17.6
Sesquiterpene hydrocarbons				8.1	5.8	7.2	8.7	7.2	10.4
Oxygenated sesquiterpenes				0.4	-	0.3	0.7	0.4	2.0
Phenylpropanoids				0.3	-	0.3	0.9	0.1	0.1
Non-terpenic compounds				15.5	30.4	12.8	8.7	11.6	17.7

<sup>a</sup> Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). Numbers correspond to those in Table 1. The volatile components identified exclusively from the HS-fractions were affected by a letter, b Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from König *et al.*, 2001., c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa), d Percentages (means of three analyses) obtained by GC-FID (on RTX-1: apolar column) under optimized HS-SPME parameters: temperature: 70°C, equilibrium time: 120 min; extraction time: 30 min.

have direct activity against many species of bacteria, such as terpenes and a variety of aliphatic hydrocarbons (alcohols, aldehydes and ketones). The lipophilic character of their hydrocarbon skeleton and the hydrophilic character of their functional groups are of main

importance in the antimicrobial action of essential oils components. Therefore, a rank of activity has been proposed as follows: phenols > aldehydes > ketones > alcohols > esters > hydrocarbons [28]. The activity of the roots oil could be explained at least partially by its



**Table 3 Antimicrobial activity of *D. muricatus* essential oil**

Microorganisms	Disc diffusion assay (mm)		MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Roots	Aerial parts	Roots	Aerial parts
<b>Gram-positive bacterium</b>				
<i>B. subtilis</i>	9	8	> 6000	> 6000
<i>L. monocytogenes</i>	14	13	65	250
<i>B. cereus</i>	15	12	65	250
<i>S. aureus</i>	22	10	8	> 6000
<i>P. aeruginosa</i>	9	10	> 6000	> 6000
<i>E. faecalis</i>	10	8	> 6000	> 6000
<b>Gram-negative bacterium</b>				
<i>K. pneumoniae</i>	9	8	> 6000	> 6000
<i>E. coli</i>	8	6	> 6000	> 6000
<b>Yeast</b>				
<i>C. albicans</i>	12	16	95	45

content of undecan-2-one (10.2%). This ketone was previously proved to have antimicrobial and nematicidal activity [29,30]. The higher activity of the roots oil compared to the aerial parts oil could be attributed to this fact. Another major class of this oil, aliphatic alcohols was, likewise, previously reported as an antimicrobial compound and was reported to possess strong to moderate activities against several bacteria [31].

### Conclusion

Volatiles isolated from separated organs of *D. muricatus* by HS-SPME and hydrodistillation were investigated using GC-RI and GC-MS. Concerning the essential oils, oil from *D. muricatus* roots was mainly composed of oxygenated compounds, while oil from aerial parts (i.e., the leaves, stems, flowers, and umbels) was dominated by hydrocarbon compounds. Moreover, the study of the volatiles sampled by HS-SPME showed that the chemical composition of the HS fractions obtained from different organs was qualitatively similar but differed by the relative concentrations of the main components. It is interesting to note that the sample preparation method impacted quantitatively on the GC profile of *D. muricatus* volatiles. The antimicrobial properties of *D. muricatus* essential oils tested on nine microorganisms species showed that oil from roots was active against *S. aureus*, while essential oil obtained from aerial parts was active against the yeast *C. albicans*.

### Experimental

#### Plant material and oil isolation

Separated organs (stems, leaves, flowers, umbels and roots) from *D. muricatus* were collected in Bensekrane forest area (North West of Tlemcen, Algeria) [287 m, 35 °07'N 1 °22'O] on September 2009. Voucher

specimens were deposited in the herbarium of the Tlemcen University Botanical Laboratory (Voucher number: UBL 128.09). A portion of each organ was stored at 4°C for eventual further studies. The oils were isolated by hydrodistillation (400–450 g of plant per sample) for 6 h using a Clevenger-type apparatus [32] according to the European Pharmacopoeia and yielded 0.02% for roots and 0.03–0.12% for aerial parts w/w of oil.

#### HS-SPME conditions

The single organs of *D. muricatus* (stems, leaves, flowers, umbels and roots separately) were cut roughly with scissors (1–2 cm long) before subjection to HS-SPME. The SPME device (Supelco) coated with divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, 30  $\mu\text{m}$ ) was used for extraction of the plant volatiles. Optimization of conditions was carried out using fresh organs of the plant (1 g in a 20 mL vial) and based on the number and the sum of total peak areas measured on GC-FID. Temperature, equilibration time and extraction time were selected after nine experiments combining four temperatures (30, 50, 70 and 90°C), four equilibration times (20, 40, 60 and 80 min) and three extraction times (15, 30 and 45 min). After sampling, SPME fibre was inserted into the GC and GC-MS injection ports for desorption of volatile components (5 min), both using the splitless injection mode. Before sampling, each fibre was reconditioned for 5 min in the GC injection port at 260°C. HS-SPME and subsequent analyses were performed in triplicate. The coefficient of variation ( $1.6\% < CV < 17.8\%$ ) calculated on the basis of total area obtained from the FID-signal for the samples indicated that the HS-SPME method produced reliable results.

#### Gas chromatography

GC analyses were carried out using a Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and a fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL/min); the injection volume was 0.2  $\mu\text{L}$ . Retention indices (RI) of the compounds were determined from a software from Perkin-Elmer. Component relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors.

#### Gas chromatography-mass spectrometry

Samples were analyzed with a Perkin-Elmer Turbo mass detector (quadrupole), coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with the fused-silica capillary

columns Rtx-1 and Rtx-Wax (ion source temperature 150°C; energy ionization 70 eV). EI mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1 s). Other GC conditions were the same as described under GC except split 1/80.

#### Component identification

Identification of the components was based (i) on the comparison of their GC retention indices (RI) on non polar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data [33,34]; and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries [33-35] and comparison of spectra with those of our personal library.

#### Component quantification

Quantification of essential oil components was expressed using relative concentration in g/100 g of essential oil. The procedure included the calcul of FID response factors (RFs) relative to an internal standard. We carried out a methodology reported in the literature [36] and improved in our laboratory [37]. The application of this analytical procedure allowed the determination of the oil component relative concentrations expressed in g/100 g of essential oil. Relative amounts of individual components obtained during HS-SPME experiments, were calculated on the basis of their GC peak areas on the Rtx-1 capillary column, without FID response factor correction.

#### Bacterial and yeast strains and media

The bacterial strains used in this study, i.e. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* (Gram positive), *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* (gram negative) were isolated at the Medical Reanimation Department of the Hospital University Center of Tlemcen in Algeria. The yeast *Candida albicans* was isolated at the Dermatology Department of the same hospital. Bacterial strains preserved in nutrient agar at 4°C, were revived in nutrient solution and incubated at 37 ± 1°C during 18 to 24 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL BHIB (Brain Heart Infusion Broth, pronadisa Hispanalab). *C. albicans* preserved at 4°C in the Sabouraud agar supplemented with chloramphenicol was revived in nutrient solution and incubated at 30 ± 1°C during 24 to 48 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL sterile physiological water. For antimicrobial assay, bacterial strains were grown on Mueller-Hinton Agar (MHA, Pronadisa Hispanalab) while *C. albicans* was grown on Sabouraud Dextrose Agar + chloramphenicol (SDA, Merck). Bacterial and yeast inoculate reached microbial densities in the range 106 to 107 cfu/mL.

#### Antimicrobial activity

##### *Paper-disc diffusion method*

Antibacterial activities of essential oil from root and all aerial parts of the plant were assessed using the paper disk agar diffusion method according to Rios [38]. Absorbent disks (Whatman disk 6-mm diameter) were impregnated with 20 µl of oil, to concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup>, and then placed on the surface of inoculated plates (90 mm) and incubated at 37°C for 24 h. Negative controls were prepared using a disk impregnated with the same solvent as that used to dissolve the plant oils. Antimicrobial activity was assessed by measuring the inhibition zone. All the tests were performed in triplicate.

##### *Dilution-agar method*

A dilution agar method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC). Stock solutions were obtained by dissolving extracts in dimethylsulfoxide (DMSO 1%). Serial dilutions were made to obtain concentrations ranging from 0 to 100 µg mL<sup>-1</sup> of the essential oil. Each mixture was added to Mueller–Hinton agar for bacteria [39,40]. The Petri dishes contained a sterile solution of DMSO and the culture medium, respectively. After incubation at 37°C for 24 h for bacteria and at 30°C for 48 h for the yeast. The experiments were performed in triplicate.

#### Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

MAD performed in collection of plant material. MAD, ND and JMD performed the HD and HS-SPME extractions, obtained the essential oils and the volatiles fractions, as well as participated in the data analysis. MAD, HA, BT, AM and JC conceived the study and helped draft the manuscript. HA, BT, AM and JC performed the coordination of the study, worked on the data analysis and interpretation. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. M. Bouazza (Botanical Laboratory, Biology Department, Aboubekr Belkaid University) for the identification of the vegetable matter, and are indebted to the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) for providing a research grand of N.D., and the Ministère des Affaires Etrangères et Européennes throughout the research program "Partenariat Hubert Curien Tassili".

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen, Algérie. <sup>2</sup>UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, Université de Corse, BP 52, 20250, Corte, France.

Received: 27 January 2012 Accepted: 26 April 2012

Published: 30 May 2012

#### References

1. Quézel P, Santa S: *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales 1962–1963*. Paris: Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique.
2. Sáenz Laín C: *Research on Daucus L. (Umbelliferae)*. *Anal. Jard. Bot. Madrid* 1981, **37**:480–533.



3. Kula J, Izydorczyk K, Czajkowska A, Bonikowski R: **Chemical composition of carrot umbels oils from *Daucus carota* ssp. *sativus* cultivated in Poland.** *Flavour Fragr J* 2006, **21**:667–669.
4. Saad HEA, ElSharkawy SH, Halim AF: **Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*.** *Pharm Acta Helv* 1995, **70**:79–84.
5. Flamini G, Cioni PL, Maccioni S, Baldini R: **Composition of the essential oil of *Daucus gingidium* L. ssp. *gingidium*.** *Food Chem* 2003, **103**:1237–1240.
6. Jabrane A, Ben Jannet H, Harzallah-Skhiri F, Mastouri M, Casanova J, Mighri Z: **Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and 13C-NMR Spectroscopy, and in vitro Antibacterial Activity.** *Chem Biodivers* 2009, **6**:881–889.
7. Radulovic N, Đord-ević N, Stojanović-Radić Z: **Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota* – A comparison study.** *Food Chem* 2011, **125**:35–43.
8. Mazzoni V, Tomi F, Casanova J: **A daucane-type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil.** *Flavour Fragr J* 1999, **14**:268–272.
9. Mockute D, Nivinskiene O: **The sabinene chemotype of essential oil of seeds of *Daucus carota* L. ssp. *carota* growing wild in Lithuania.** *J Essent Oil Res* 2004, **16**:277–281.
10. Staniszevska M, Kula J, Wieczorkiewicz M, Kusewicz D: **Essential oils of wild and cultivated carrots—the chemical composition and antimicrobial activity.** *J Essent Oil Res* 2005, **17**:579–583.
11. Wu Y, Xu ZL, Li HJ, Meng XY, Bao YL, Li YX: **Components of essential oils in different parts of *Daucus carota* L.** *Chem Res Chin Univ* 2006, **22**:328–334.
12. Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Casanova J, Bolla JM, Berti L: **(E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oils against *Campylobacter jejuni*.** *J Agric Food Chem* 2007, **55**:7332–7336.
13. Castroviejo S: *Flora Ibérica*. Madrid: CSIC; 2003. vol. X: Real Jardín Botánico.
14. Danute M, Ona N: **The Sabinene Chemotype of Essential Oil of Seeds of *Daucus carota* L. ssp. *carota* Growing Wild in Lithuania.** *J Essent Oil Res* 2004, **16**:277–281.
15. Gonny M, Bradesi P, Casanova J: **Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using 13C-NMR spectroscopy.** *Flavour Fragr J* 2004, **19**:424–433.
16. Staniszevska M, Kula J: **Composition of the essential oil from wild carrot. L. ssp. *carota* growing in Poland.** *J Essent Oil Res* 2001, **13**:439–441.
17. Djarri L, Medjroubi K, Akkal S, Elomri A, Seguin E, Vêrité P: **Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss.** *Flavour Fragr J* 2006, **21**:647–649.
18. Dib MA, Djabou N, Desjobert JM, Allali H, Tabti B, Muselli A, Costa J: **Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation.** *Chem Central J* 2010, **4**:16.
19. Lanfranchi DA, Laouer H, El Kolli M, Prado S, Maulay-Bailly C, Baldovini N: **Bioactive Phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria.** *J Agric Food Chem* 2008, **58**:2174–2179.
20. Kilibarda V, Nanusevic N, Dogovic N, Ivanic R, Savin K: **Content of the essential oil of the carrot and its antibacterial activity.** *Pharmazie* 1996, **51**:777–778.
21. Smaili T, Zellaoui A, Cioni P-L, Flamini G: **A Myristicin-rich Essential Oil from *Daucus sahariensis* Growing in Algeria.** *Nat Prod Comm* 2011, **6**:883–886.
22. Marzouki H, Khaldi A, Falconieri D, Piras A, Marongiu B, Molicotti P, Zanetti S: **Essential Oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction.** *Nat Prod Comm* 2010, **5**:1955–1958.
23. Chizzola R: **Composition of the Essential Oil from *Daucus carota* ssp. *carota* Growing Wild in Vienna.** *J Essent Oil Bear Plant* 2010, **13**:12–19.
24. Baser Kemal HC, Kurkcuoglu M, Askun T, Tumen G: **Anti-tuberculosis Activity of *Daucus littoralis* Sibth. et Sm. (Apiaceae) From Turkey.** *J Essent Oil Res* 2009, **21**:572–575.
25. Maxia A, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L: **Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast.** *Fitoterapia* 2009, **80**:57–61.
26. Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro L: **Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity.** *J Ethnopharmacol* 2008, **119**:129–134.
27. Mojab F, Hamed A, Nickavar B, Javidnia K, Shaheed B: **Hydrodistilled Volatile Constituents of the Leaves of *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffman) Arcang. (Apiaceae) from Iran.** *J Essent Oil Bear Plant* 2008, **11**:271–277.
28. Kalemba D, Kunicka A: **Antibacterial and antifungal properties of essential oils.** *Curr Med Chem* 2003, **10**:813.
29. Benhadj FM, Marzouk B, Chraif I, Boukef K: **Analysis of tunisian *Ruta graveolens* L. oils from Jemmel.** *J Food Agr Environ* 2007, **5**:52–55.
30. Nikolettta G, Francesca N, Manconi, Leonti M, Maxia A, Caboni P: **Aliphatic Ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) Induce Paralysis on Root Knot Nematodes.** *J Agric Food Chem* 2011, **59**:322–332.
31. Kabelitz N, Santos PM, Heipieper HJ: **Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*.** *FEMS Microbiol Lett* 2003, **220**:223–227.
32. Conseil de l'Europe: *Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A.* Sainte Ruffine. 1996.
33. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*. Hamburg: Library of MassFinder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry; 2001.
34. *National Institute of Standards and Technology: NIST Chemistry WebBook*. Gaithersburg, MD: NIST Standard Reference Database; 2005 [http://webbook.nist.gov/chemistry].
35. Adams RP: *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing; 2001.
36. Costa R, Zellner BA, Crupi ML, Fina M, Valentino M, Dugo M, Dugo G, Mondello L: **Univ Messina, Fac Farm, Dipt Farm-Chim, Viale Annunziata, IT-98168 Messina, Italy. GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarhonanthus camphoratus* L.** *Flavour Fragr J* 2008, **23**:40–48.
37. Djabou N, Paolini J, Desjobert JM, Allali, Costa J, Muselli A: **Qualitative and quantitative analysis of volatile components of *Teucrium massiliense* L. Identification of 6-methyl-3-heptyl acetate as new natural product.** *Flavour Fragr J* 2010, **25**:475–487.
38. Rios JL, Recio MC, Villar A: **Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area.** *J Ethnopharmacol* 1987, **21**:139–152.
39. Cowan MM: **Plant products as antimicrobial agents.** *Clin Microbiol Rev* 1999, **12**:564–582.
40. Lennette FM, Balows A: **Manual of Clinical Microbiology.** In *American Society for Microbiology*. Edited by Hansler WJ, Shadomy HJ. Washington, DC; 1985.

doi:10.1186/1752-153X-6-48

Cite this article as: Bendiabdellah et al.: Biological activities and volatile constituents of *Daucus muricatus* L. from Algeria. *Chemistry Central Journal* 2012 **6**:48.

Publish with **ChemistryCentral** and every scientist can read your work free of charge

“Open access provides opportunities to our colleagues in other parts of the globe, by allowing anyone to view the content free of charge.”

W. Jeffery Hurst, The Hershey Company.

- available free of charge to the entire scientific community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
http://www.chemistrycentral.com/manuscript/

  
**ChemistryCentral**

## Preliminary phytochemical screening and antioxidant activities of solvent extracts from *Daucus aureus* Desf., from Algeria

Nassim Djabou, Nawel Meliani, Mohammed El Amine Dib\*, Amel Bendiabdellah, Hocine Allali, Boufeldja Tabti

Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.

\*Corresponding Author: Mohammed El Amine Dib

### Abstract

The present study was to estimate preliminary photochemical evaluation and in vitro antioxidant of aerial parts extracts of *Daucus aureus* by using both solvents like ethanol and water. Preliminary phytochemical analysis reveals the presence of tannins, flavanoids, steroids and terpenoids. The extracts were screened for its potential antioxidant activity using DPPH free radical scavenging activity. The reducing power extract was also determined ascorbic acid was used as a standard and positive control for aerial parts analysis. Ethanol extract showed significant activity with DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical scavenging compared to standard antioxidant. However, increasing the concentration of the extracts resulted in increased ferric reducing antioxidant power for both extracts tested. From the analyses, ethanolic extract had the highest total phenolic content. Finally, a relationship was observed between the antioxidant activity potential and total phenolic and flavonoid levels of the extract. The results were concluded that extracts have a potential source of antioxidants of natural origin.

**Keywords:** *Daucus aureus* Desf., Solvent extract, Phytochemical screening, Antioxidant activity.

### Introduction

In the last years, interest in medicinal plants as an alternative to synthetic drugs is more and more increasing, particularly against oxidative stress. Many synthetic antioxidant components (BHA and BHT) have shown toxic and/or mutagenic effects; therefore, plant antioxidants are suggested as an interesting alternative. The antioxidative properties of some vegetables and fruits are partly due to the low molecular weight phenolic compounds, which are known to be potent as antioxidants (Wang et al., 1999). *Daucus* is used as antibacterial, stimulant (Emilio, 1994), antiseptic, carminative, diuretic, hepatoprotective (Bishayee et al., 1995), antisteroidogenic (Majumder et al., 1997) and anti-inflammatory (Porchezian et al., 2000). The substances in carrots have a diuretic effect; help to ease an irritated gastrointestinal system, and help resistance to cancer (Radulovic´ et al., 2011). A great number of species and sub-species of *Daucus* genus have been tested for their antioxidant and antimicrobial activities during the last decade; however, there are still many others species of *Daucus*, which were not yet examined. *Daucusaureus*Desf., belonging to section of *Chrysodaucus*Thell and is one of the 11 *Daucus* species growing in Algeria(SáenzLaín, 1981). To our knowledge, no work has dealt with the phytochemical screening and antioxidant activity of the solvent extracts of *D. aureus*.The aim of this work is to evaluate the antioxidative properties of the extracts of *D. aureus*. Additionally, the total phenolic and flavonoid contents of ethanolic and water extracts have been determined.

## Materials and Methods

### **Plant Material**

Aerial parts of *D. aureus* were collected at the flowering stage in July 2012. The plant material was botanically identified by Pr. NouryBenabadi (Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of University of Tlemcen Algeria). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen.

### **Preparation of the extracts**

The air-dried sample (20 g) was extracted by using a Soxhlet extractor for 5 h, containing ethanol under reflux conditions (250 mL). The residue was then extracted by boiling water (300 mL). Solvent was removed with a rotary evaporator to obtain the extract in the yield of 8.5 % (w/w). The water extract was dried in a freeze-drier to obtain the extract in a yield of 2.3 % (w/w).

### **Phytochemical prospecting**

The phytochemical tests to detect the presence of alkaloids, tannins, saponins, flavonoids, steroids, anthracenosides and coumarins were performed according to the method described by Kokate, (1994) and Harborne, (1998). The tests were based on the visual observation of color change or formation of a precipitate after the addition of specific reagents.

### **Determination of total phenolic contents: Prussian blue method:**

Total polyphenolic contents were determined by the Prussian Blue method described by Hagerman and Butler, (1994). Aliquots of the extract were made up to 1 mL with distilled water; after adding 3 mL of  $\text{FeCl}_3$  in 0.1N HCl, they were incubated for 10-15 min at room temperature. Subsequently, 3 mL of 8 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  were added to the samples, and after 20 min at room temperature, the optical density of the mixture was determined at 720 nm. Gallic acid was used as standard to construct a calibration curve.

### **Determination of antioxidant activity**

#### **1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity**

The antioxidant activity of the samples was determined by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging (Hatano et al. 1988). In test tubes, 0.25 ml of DPPH 0.8 mM in MeOH was added to accurately weighed aliquots of the extracts dissolved in 3.75 mL of MeOH, corresponding to concentration ranges of extract between 0.01 to 0.2 mg/mL. After mixing, the samples were maintained in the dark, at room temperature for 30 min. The absorbance at 517 nm was measured using a UV/Vis V-530 spectrophotometer and compared with a control without extract. A blank was prepared for each sample using methanol instead of the DPPH solution. Ascorbic acid was used as reference compound. Antioxidant activity was expressed as a percent inhibition of DPPH radical, and calculated from the equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100 [(\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control}]$$

$\text{IC}_{50}$  values were determined from the plotted graphs of scavenging activity against the concentration of the extracts. These values are defined as inhibitory concentration of the extract necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50% and are expressed in mg/ml. Triplicate measurements were carried out.

#### **Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)**

The total antioxidant capacity of sample was determined using a FRAP assay of Oyaizu, (1986). Different concentrations of extracts (0.10 and 0.15 mg/mL) in distilled water were mixed with 2.5 mL of phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 2.5 mL of potassium

## Results and Discussion

### **Phytochemical prospecting**

The phytochemical analysis conducted on *D. aureus* extract revealed the presence of tannins, flavonoids, steroids and saponins (Table 1). The total phenol content of the aqueous and ethanolic aerial parts extract was 1.75 and 2.79 %, respectively (Table 1). Through phytochemical prospecting of the extracts, it was possible to determine the presence of diverse classes of secondary metabolites that show a wide variety of biological activities. These phytochemical compounds are known to support bioactive activities in medicinal plants and thus responsible for the antioxidant activities of this plant extract used in this study.

**Antioxidant properties**

In this work the antioxidant activity was evaluated utilizing two spectrophotometric methods: (1) the scavenging effect on DPPH and (2) the Ferric reducing antioxidant power assay. The data concerning antioxidant activity of the extracts, expressed as IC<sub>50</sub> (mg/mL) are reported in Table 1 and compared with the activity of the known antioxidant, ascorbic acid.

The DPPH assay is based on redox reaction. DPPH is a stable free radical that potentially reacts with the compounds able to donate H<sup>+</sup>. From a mechanistic point of view, the efficiency of an antioxidant component in reducing DPPH largely depends on its hydrogen-donating ability, which is directly related to the number of phenolic hydroxyl moieties (Amensour et al., 2009). The weakest radical scavenging activity (14.41 %) was exhibited by the water extract of 0.3 mg/mL, whereas the strongest activity (56.23 %) was exhibited by the ethanolic extract at a concentration of 0.8 mg/mL. The next highest activity (56.25 %) was for the water extract at a concentration of 2.1 mg/mL. Therefore, DPPH scavenging activity is usually presented by the IC<sub>50</sub> value. Concentrations of the antioxidant providing 50% inhibition of DPPH in the test solution (IC<sub>50</sub>) were calculated and presented in Table 2. The ethanolic extract of *D. aureus* (IC<sub>50</sub> = 0.65 mg/mL) were more effective than aqueous extract (IC<sub>50</sub> = 1.83 mg/mL ) (Table 2).

The reducing capacity of the extracts, another significant indicator of antioxidant activity was also found to be appreciable. In the reducing power assay, the presence of antioxidants in the sample would result in the reduction of Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> by donating an electron. The measurement of the Antioxidant activity of the ferric ions by the extracts of *D. aureus* was evaluated in ascorbic equivalent of Acid used to establish a curve of reference. Fig. 1 depicts the reducing power of the extracts from *D. aureus*. Both extracts showed the presence the reductive effects, which increased with an increase in concentration. However, the ethanolic extract was more potent on reducing power compared to water extract. Actually, reducing power is a very important aspect for the estimation of the antioxidant activity (Ksouriet al., 2008). The reducing properties are generally associated with the presence of reductones whose antioxidant action is based on breaking of the free radical chain by donating one hydrogen atom. Reductones also react with certain precursor of peroxide, thus preventing peroxide formation. The data indicate that the ethanolic and aqueous extracts may be due to presence of polyphenol, which may act similar to reductones by donating the electrons and reacting with free radicals to convert them to more stable product and terminate free radical chain reaction (Gupta and Verma, 2011). However, it is extremely important to point out that there is a positive correlation between the antioxidant activity potential and the amount of phenolic compounds in the extracts (Bellakhdar, 1997).

Table 1: Phytochemical prospection and total phenolic Contents of solvent extracts of *D. aureus* aerial parts

Extracts	Metabolites							Total Phenolic Contents % Prussian Blue Method
	1	2	3	4	5	6	7	
Ethanol	+	+	+	-	-	-	-	2.79
Water	+	+	+	-	-	-	-	1.75

1: tannins; 2: flavononols; 3:steroids; 4: coumarins; 5: alkaloids;  
6 :saponins; 7 : anthracenodides ; +: presence; -: absence.

Table 2: DPPH radical-scavenging of solvent extracts from *D. aureus* at different concentrations.

Extracts	Antioxidant activities				
Aqueous	Extract concentration (mg/mL)	0.3	0.5	1.1	2.1
	Scavenging effect on DPPH (%)	14.41	26.47	31.74	56.25
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)				1.83
Ethanolic	Extract concentration (mg/mL)	0.2	0.3	0.6	0.8
	Scavenging effect on DPPH (%)	20.08	36.00	47.72	56.23
	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/mL)				0.65
Ascorbic acid	Extract concentration (mg/mL)	0.04	0.05	0.06	0.08
	Scavenging effect on DPPH (%)	39.40	51.03	68.57	97.84
	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/mL)				0.048

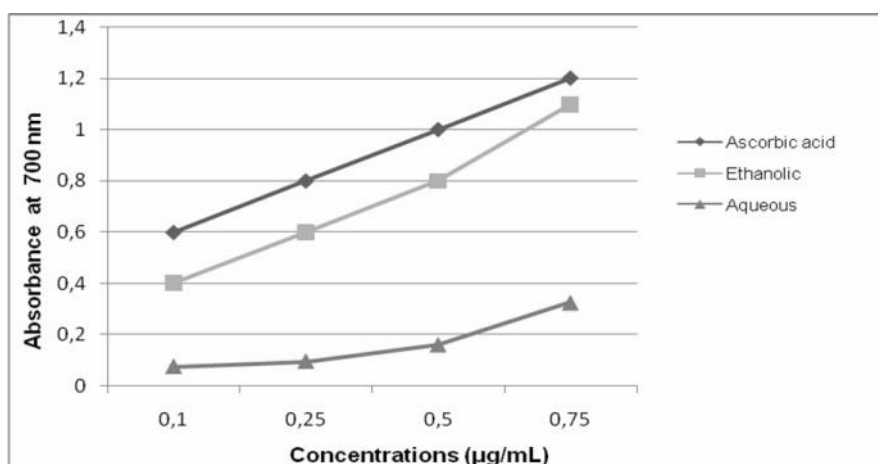


Figure 1: Reducing power of ethanolic and water extract of *D. aureus*

### Conclusions

The results of the present study led us to the inference that the plant extract possess modest medicinal and antioxidant properties. Although the extract is reported to contain a range of phytochemical components, it is difficult to ascribe these observed activities to any specific group of compounds. The observed antioxidant activities were believed to be due to the presence of phytochemical actives like tannins and flavonoids identified in both solvent extracts in the present investigation. Further study is necessary for isolation and characterization of the active antioxidants, which can be used to treat various oxidative stress-related diseases.

### References

- Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Perez-Alvarez JA, Fernandez-Lopez J, 2009. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat Prod Commun.*4: 819-824.
- Bellakhdar J, 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Ibis press.
- Bishayee A, Sarkar A, Chatterjee M, 1995. Hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. *Ethnopharmacology.* 47: 69-74.
- Emilio LG, 1994. The daucane (carotane) class of sesquiterpenes. *Phytochem.* 37: 597-632.
- Gupta C, Verma R, 2011. Visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content and antioxidant activity of three common vegetable. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2(1): 175-182.
- Hagerman AE, Butler LG, 1994. Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Meth Enzymol.*234: 429-433.
- Harborne JB, 1998. *Phytochemical Methods.* Chapman Hall, London, p 60-66.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T, 1988. Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging affects. *Chem Pharm Bull.* 36: 1090-2097.
- Kokate CK, 1994. *Practical Pharmacognosy.* Vallabh Prakashan, New Delhi, p. 107-113.
- Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C, 2008. Influence of biological, environmental, and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *CR Biol.* 331: 865-873.
- Majumder PK, Dasgupta S, Mukhopadhyaya RK, Majumdar UK, Gupta M, 1997. Anti-steroidogenic activity of the petroleum ether extract (fatty acids) of carrot (*Daucus carota* L.) seeds in mouse ovary. *Ethnopharmacology.* 57: 209-212.
- Oyaizu M, 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan J Nutr.* 44: 307-315.
- Porchezian E, Ansari SH, Ali M, 2000. Analgesic and anti-inflammatory activity of volatile oil from *Daucus carota* L. seed. *Indian J. Nat. Prod.* 16: 24-26.
- Radulovic N, Đord-ević N, Stojanovic´-Radic´ Z, 2010. Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota*– A comparison study. *Food Chem.*125: 35-43.
- SáenzLain C, 1981. Research on *Daucus* L (Apiaceae), *Anales del Jardín Botánico de Madrid.* 37: 481-533.
- Wang H, Nair MG, Straburg GM, Booren AM, Gray JI, 1999. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J. Agric. Food. Chem.* 47: 840-844.

## Research Article

# Antibacterial Activity of *Daucus crinitus* Essential Oils along the Vegetative Life of the Plant

Amel Bendiabdellah,<sup>1</sup> Mohammed El Amine Dib,<sup>1</sup> Nawel Meliani,<sup>1</sup> Alain Muselli,<sup>2</sup>  
Djabou Nassim,<sup>1</sup> Boufeldja Tabti,<sup>1</sup> and Jean Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd, BP 119, Tlemcen 13000, Algeria

<sup>2</sup>Laboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134, Université de Corse, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France

Correspondence should be addressed to Mohammed El Amine Dib; [a\\_dibdz@yahoo.fr](mailto:a_dibdz@yahoo.fr)

Received 9 June 2012; Accepted 15 July 2012

Academic Editor: Serkos A. Haroutounian

Copyright © 2013 Amel Bendiabdellah et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The essential oils from the aerial parts of *Daucus crinitus* Desf. were analyzed at three developmental stages (early vegetative, early flowering, and full flowering). Oil yield was found to vary depending on the stage of development, and the highest content of oil (0.15% w/w) was obtained at full flowering. The chemical composition of essential oils studied by GC and GC-MS showed a total of 71 compounds: 27 aliphatic compounds, 18 sesquiterpene hydrocarbons, 9 hydrocarbons monoterpene, 5 oxygenated monoterpenes, 5 phenolic compounds, 4 oxygenated sesquiterpenes, 2 oxygenated diterpenes, and 01 diterpene hydrocarbons. Whatever the analyzed stage, phenolic compounds were the most abundant group. Their level significantly increased during ripening and varied from 36.4 to 82.1%. Antimicrobial activities of oils were tested on four different microorganisms. The oils of various phenological stages showed high activity against *Candida albicans* (30 mm) and *Staphylococcus aureus* (11–28 mm) bacteria strains which are deemed very dangerous and very difficult to eliminate. Thus, they represent an inexpensive source of natural antibacterial substances that may potentially be used in pathogenic systems.

## 1. Introduction

In the last years, interest in medicinal plants as an alternative to synthetic drugs is more and more increasing, particularly against microbial agents because of the growth of antibiotic resistance. Essential oils of various species of edible and medicinal plants, herbs, and spices constitute a wide source of natural biologically active agents [1]. Their components have many applications in ethnomedicine, food, beverages, preservation, cosmetics as well as in the fragrance and pharmaceutical industries [2–4]. For a long time, plants from the Apiaceae family have been used as spices or drugs, particularly due to their essential oils. A dozen important herbal medicinal products from this botanic family are described in some pharmacopoeias, having antiseptic, expectorant, diuretic, carminative, vasodilator, or spasmolytic actions [5]. Variation in chemical composition of essential oils may be due to many factors, such as the genetic factors, phenological

stages, the environmental conditions, and the pedoclimatic conditions. Antimicrobial activity of an essential oil is attributed mainly to its major components, although the synergistic or antagonistic effect of one minor compound of the mixture has to be considered [6]. Therefore, antimicrobial and other biological activities may vary, based on the variations in the chemical composition [7, 8]. *Daucus crinitus* Desf. is characterized by the presence of many subspecies that colonize the sands and cliffs [9]. A survey conducted by herbalists identified that, in folk medicine, a drink made from the roots of *D. crinitus* is used in decoction to expel the placenta after childbirth, as a tonic and coldness. From a chemical point of view, *D. crinitus* has been only the subject of two studies on the chemical composition of essential oil. The aerial parts oil were characterized by isochavicol isobutyrate, octyl acetate,  $\alpha$ -pinene, and isochavicol 2-methylbutyrate [10, 11]. However, roots oil was mainly composed of aliphatic compounds [10]. In fact, during ontogenesis a number of



transformations occur, revealed by morphological changes and variability of physiological processes [12]. The aim of this research is to study the essential oil compositions of aerial parts of *D. crinitus* during three vegetative stages and its coherence with antibacterial activity in order to find new bioactive natural products.

## 2. Material and Methods

**2.1. Plant Material.** *D. crinitus* were collected in Chelaida forest area (at about 8 km northeast of Tlemcen, Algeria). Stems/leaves essential oils used for the comparative study were obtained from wild plants collected at the end of March (early vegetative), at mid-May (early flowering), and at the end of July (full flowering).

**2.2. Essential Oil Extraction.** *D. crinitus* essential oils were isolated by hydrodistillation (400–450 g of dried plant per sample) for 6 h using a Clevenger-type apparatus [13] according to the European Pharmacopoeia.

**2.3. Gas Chromatography Analysis (GC).** GC analyses were carried out using a Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL/min); the injection volume was 0.2 μL. Retention indices (RIs) of the compounds were determined relative to the retention times of the series of n-alkanes (C<sub>5</sub>–C<sub>30</sub>) with linear interpolation, using the Van den Dool and Kratz equation and software from Perkin-Elmer [14]. Relative amounts of individual components were calculated on the basis of their GC peak areas on two capillary Rtx-1 and Rtx-Wax columns, without FID response factor correction.

**2.4. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis.** Samples were analyzed with a Perkin-Elmer Turbo mass detector (quadrupole), coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with the fused-silica capillary columns Rtx-1 and Rtx-Wax (ion source temperature 150°C; energy ionization 70 eV). EI mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1 s). Other GC conditions were the same as described under GC except split 1/80.

**2.5. Component Identification.** Identification of the components was based on (i) the comparison of their GC retention indices (RIs) on nonpolar columns, determined relatively by the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data [15–20]; (ii) computer matching with commercial mass spectral libraries [17–22] and comparison of spectra with those of our personal library. Relative amounts of individual

TABLE 1: Plant material, dates, vegetative cycle and oil yields of *D. crinitus*.

Harvest dates	Vegetative cycle	Essential oil yield (%)	Temperature (°C)
28/03/2009	Early vegetative	0.02	16
16/05/2009	Early flowering	0.05	28
28/07/2009	Full flowering	0.15	37

components were calculated on the basis of their GC peak areas on the capillary Rtx-1 columns, without FID response factor correction.

### 2.6. Antimicrobial Activity

**2.6.1. Test Microorganisms.** *Bacillus cereus* (ATCC 11778, gram positive), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925, gram positive), *Escherichia coli* (ATCC 9847, gram negative), and *Candida albicans* (IPP 444) microorganism strains were employed for determination of antimicrobial activity. Bacterial strains preserved in nutrient agar at 4°C were revived in nutrient solution and incubated at 37 ± 1°C during 18 to 24 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL OF BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Pronadisa Hispanalab). *C. albicans* preserved at 4°C in the Sabouraud agar supplemented with chloramphenicol was revived in nutrient solution and incubated at 30 ± 1°C during 24 to 48 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL of sterile physiological water. For antimicrobial assay, bacterial strains were grown on Mueller-Hinton Agar (MHA, Pronadisa Hispanalab) while *C. albicans* was grown on Sabouraud Dextrose Agar + Chloramphenicol (SDA, Merck). Bacterial and yeast inocula reached microbial densities in the range 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> cfu/mL.

**2.6.2. Evaluation of Antimicrobial Activity.** The essential oil (5 μL) was applied on the paper discs (the disc diameter was 6 mm). Then disc papers were placed in the inoculated plates. After 24 h of incubation at 37°C, the diameters of growth inhibition zones were measured.

## 3. Results and Discussion

**3.1. Chemical Characterization.** The variation of the essential oil yield of aerial parts of *D. crinitus* with the three growth stages is shown in Table 1. A significant change in essential oil yield was observed during the different growth stages. During the early-vegetative stage, the essential oil yield was of 0.02%. At the early-flowering stage, the essential oil yield increased and reached 0.05%. At full-flowering stages, the essential oil yield increased significantly to reach 0.15% (Table 1).

Variation in oil yield can be attributed to many factors, such as the genetic factors, the developmental stage, the extraction method, and the pedoclimatic conditions [23, 24]. It seems that oil yield during plant growth is particularly sensitive to environmental conditions (light, nutrient availability, and day length) [25, 26].

All three oils were analyzed by GC and GC-MS and their chemical compositions are presented in Table 2, 18 sesquiterpene hydrocarbons, 9 hydrocarbons monoterpene, 5 oxygenated monoterpenes, 5 phenolic compounds, 4 oxygenated sesquiterpenes, 2 oxygenated diterpenes, and 01 diterpene hydrocarbons. However, in the early-vegetative stage 56 components accounting for 93.8% of the total composition were identified. The most abundant chemical groups of this oil were aliphatic compounds (49.9%), phenolic compounds (36.4%), sesquiterpene hydrocarbons (4.3%), and oxygenated sesquiterpenes (2.1%). The main aliphatic compounds components were decanol (10.4%), heptadecane (9.8%), dodecanal (6.3%), pentadecane (5.4%), undecane (4.0%), followed by decanal (2.7%), hexadecane (1.8), hexadecanoic acid (1.5%), and hexadecanal (1.1%). However, isochavicol isobutyrate (26.4%) and isochavicol 2-methyl butyrate (7.9%) were the major constituent of phenolic compounds. The terpenic compounds were represented only by  $\alpha$ -humulene (1.9%), geranyl butyrate (1.2%), and  $\alpha$ -cedrol (1.2%). Regarding the early-flowering stage, the composition of essential oil is similar from a qualitative point of view with that observed in the early-vegetative stage, characterized by high percentage of phenolic compounds (54.0%) but with a slight difference in oil composition. We noted the presence of zizaene (2.3%), caryophyllene oxide (2.1%), bornyl acetate (2.1%), and myrcene (1.4%). On the other hand, the oil produced in full-flowering stage was characterized by isochavicol isobutyrate (76.1%), isochavicol 2-methyl butyrate (5.4%), myrcene (1.9%), zizaene (3.1%), limonene (1.5%), and dodecyl pentanoate (1.3%).

A comparison of chemical compositions of *D. crinitus* essential oils obtained from three stages of development shows significant differences. Phenolic compounds were the most abundant components identified in aerial parts of *D. crinitus*. The amount of isochavicol isobutyrate significantly increased to early-flowering and full-flowering stages (41.4% and 76.1%, resp.). Relative to early-vegetative stage, the fraction of terpenic hydrocarbons was increased, mainly due to an increase of zizaene, myrcene, and limonene percentages in the full-flowering and early-flowering stages. However, fraction of aliphatic compounds was higher at the early-vegetative stage (49.9% of total oil, resp.), while its level decreased to 19.6% at the early-flowering stage and then to 3.6% at the full-flowering stage. According to our results, it seems that chemical composition of *D. crinitus* essential oil varied significantly with the physiological stage of the plant. Along the vegetative life of the plant, *D. crinitus* produces three essential oils which differed by the percentage of their class compounds. (Figure 1).

**3.2. Antimicrobial Activity.** Moreover, the antibacterial activity of essential oil of the three vegetative stages was assessed by disc diffusion assay. The results indicated in Table 3 and in the paper represent the net zone of inhibition including the diameter (6 mm) of the paper disk. Biological activity was affected to essential oil as follows: strong activity: inhibition zone >20 mm, moderate activity: inhibition zone <20–12 mm and no inhibition: zone <12 mm. As shown in Table 3, the

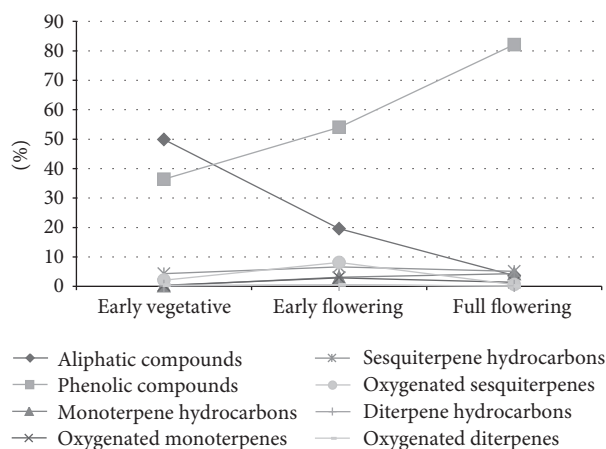


FIGURE 1: Percentage variation of the main *D. crinitus* classes of compounds throughout the vegetative cycle.

diameters of the inhibition zones of the studied essential oils ranged from 6 to 30 mm with the highest inhibition zone values observed against the medically important pathogens *C. albicans* (30 mm) and *S. aureus* (28 mm). *C. albicans* is a microbe responsible for most clinical yeast infections, for example, in mouth infections. However, in early-flowering and full-flowering stages, the essential oils have a strong antibacterial activity against *S. aureus* with diameters of inhibition zones of 21 and 28 mm, respectively. The other bacterial strains (*E. coli* and *B. cereus*) showed no inhibition, with diameters of inhibition zones ranging from 6 to 10 mm (Table 3).

From all the used species, *S. aureus* is one of the most common of the gram-positive bacteria that causes food poisonings. Its source is not the food itself but the humans who contaminate foods after they have been processed [27]. These observations may be attributed to the nature of biologically active components. Indeed, various chemical compounds have direct activity against many species of bacteria, such as terpenes and a variety of aliphatic hydrocarbons (alcohols, aldehydes, and ketones). The lipophilic character of their hydrocarbon skeleton and the hydrophilic character of their functional groups are of main importance in the antimicrobial action of essential oils components. Therefore, a rank of activity has been proposed as follows: phenols > aldehydes > ketones > alcohols > esters > hydrocarbons [28]. For example, some essential oils containing phenolic structures are highly active against a broad spectrum of microorganisms [28, 29]. The importance of the hydroxyl group has been confirmed [30, 31]. Aldehydes are known to possess powerful antimicrobial activity. It has been proposed that an aldehyde group conjugated to a carbon-to-carbon double bond is a highly electronegative arrangement, which may explain their activity [32], suggesting a proportional increase of the antibacterial activity with electronegativity [33, 34]. Aliphatic alcohols were reported to possess strong-to-moderate activities against several bacteria. The activity increased with the length of the carbon chain [35]. Terpenic compounds have also shown antimicrobial properties



TABLE 2: Chemical compositions of *D. crinitus* essential oils (%) during three developmental stages.

$N^{a}$	Components <sup>b</sup>	$I_1^c$	$I_a^d$	I	II	III
1	Nonane	900	900	tr	—	—
2	$\alpha$ -pinene	936	931	—	0.6	0.5
3	Sabinene	973	966	—	0.1	tr
4	$\beta$ -pinene	978	971	—	0.1	tr
5	Myrcene	987	981	—	1.4	1.9
6	Decane	1000	1000	tr	0.1	0.1
7	p-cymene	1015	1012	—	0.1	0.1
8	1,8 Cineole	1024	1020	—	0.6	0.5
9	Limonene	1025	1026	—	0.6	1.5
10	(E)- $\beta$ -ocimene	1041	1037	—	0.1	0.1
11	$\gamma$ -terpinene	1051	1049	tr	0.1	0.1
12	1-Octanol	1061	1056	0.1	tr	tr
13	2-Methyl-Decane	1068	1065	—	tr	0.1
14	Nonanal	1076	1074	0.2	0.1	tr
15	$\alpha$ -Terpinolene	1082	1079	0.2	tr	0.1
16	Linalool	1086	1086	0.2	tr	0.1
17	Undecane	1100	1100	4.0	0.1	tr
18	2-Ethyl-hexyl acetate	1144	1149	0.2	0.4	0.1
19	Terpinen-4-ol	1164	1161	0.1	0.1	0.1
20	Decanal	1188	1187	2.7	0.5	0.2
21	Dodecane	1200	1198	0.2	tr	tr
22	Decanol	1263	1259	10.4	2.1	0.7
23	Nonanoic acid	1263	1263	0.1	tr	tr
24	Bornyl acetate	1270	1269	0.1	2.1	0.7
25	Undecanal	1290	1280	0.4	0.2	tr
26	Tridecane	1300	1300	0.4	tr	tr
27	n-Octyl isobutyrate	1329	1325	tr	tr	0.2
28	Neryl acetate	1342	1336	—	0.1	tr
29	Decanoic acid	1347	1348	0.6	0.2	tr
30	Benzyl 2-methyl butyrate	1360	1352	0.6	0.2	tr
31	Undecanol	1367	1367	0.8	0.4	0.1
32	$\alpha$ -copaene	1379	1386	0.1	0.1	tr
33	$\beta$ -Bourbonene	1386	1376	—	0.1	0.1
34	Dodecanal	1389	1390	6.3	7.3	0.2
35	Tetradecane	1400	1403	0.3	tr	tr
36	Longifolene	1411	1409	0.1	0.1	tr
37	$\alpha$ -Santalene	1422	1415	0.1	0.4	0.4
38	$\beta$ -Caryophyllene	1420	1424	0.1	tr	tr
39	Dauca-3,8-diene	1428	1426	0.1	tr	tr
40	trans- $\alpha$ -Bergamotene	1432	1431	0.2	tr	tr
41	(E)- $\beta$ -Farnesene	1448	1449	—	tr	tr
42	$\alpha$ -Humulene	1456	1451	1.9	0.5	tr
43	Zizaene	1456	1463	—	2.3	3.1
44	Dodecanol	1472	1470	2.7	0.5	0.4
45	$\alpha$ -Curcumene	1473	1474	0.1	0.4	0.4
46	Germacrene-D	1479	1478	0.2	tr	tr
47	$\beta$ -Selinene	1486	1480	0.1	tr	tr
48	Zingiberene	1489	1483	tr	tr	0.1
49	Pentadecane	1500	1500	5.4	1.1	0.1
50	$\gamma$ -Cadinene	1516	1513	0.1	0.1	tr
51	Geranyl butyrate	1534	1530	1.2	2.1	0.5

TABLE 2: Continued.

$N^{\text{a}}$	Components <sup>b</sup>	$I_l^{\text{c}}$	$I_a^{\text{d}}$	I	II	III
52	Isochavicol isobutyrate	1546	1541	26.4	41.4	76.1
53	(Z)-3-Hexenyl benzoate	1545	1557	0.8	0.3	tr
54	Dodecanoic acid	1554	1560	0.6	0.4	tr
55	Caryophyllene oxide	1576	1572	0.6	2.1	0.1
56	Dodecyl acetate	1585	1580	—	0.4	0.1
57	Hexadecane	1600	1599	1.8	1.9	0.2
58	$\alpha$ -Cedrol	1603	1596	1.2	5.0	0.1
59	Isochavicol 2-methyl butyrate	1651	1648	7.9	11.3	5.4
60	$\alpha$ -Bisabolol	1672	1667	0.1	0.9	0.2
61	Heptadecane	1700	1700	9.8	2.9	0.1
62	Benzyl benzoate	1730	1723	0.7	0.8	0.6
63	Tetradecanoic acid	1761	1756	0.1	0.3	0.1
64	Hexadecanal	1782	1787	1.1	0.5	0.1
65	Lactarazulene	1796	1792	tr	0.5	0.1
66	Neophytadiene	1807	1807	0.1	0.5	0.1
67	Phytone	1833	1835	0.2	0.1	0.2
68	Dodecyl pentanoate	1843	1840	0.2	0.1	1.3
69	Isophytol	1946	1944	—	tr	0.1
70	Hexadecanoic acid	1951	1949	1.5	0.1	tr
71	(E) Phytol	2114	2102	0.4	0.5	tr
	Total			93.8	95.3	97.4
	Aliphatic compounds			49.9	19.6	3.7
	Phenolic compounds			36.4	54	82.1
	Monoterpene hydrocarbons			0.2	3.1	4.3
	Oxygenated monoterpenes			0.4	2.9	1.4
	Sesquiterpene hydrocarbons			4.3	6.6	5.1
	Oxygenated sesquiterpenes			2.1	8.1	0.6
	Diterpene hydrocarbons			0.1	0.5	0.1
	Oxygenated diterpenes			0.4	0.5	0.1

<sup>a</sup>Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). <sup>b</sup>Retention indices of literature on the apolar column (IRI<sub>a</sub>). <sup>c</sup>Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI<sub>a</sub>). tr: trace, (<0.05%). Vegetative cycle—I: early vegetative; II: early flowering; III: full flowering.

TABLE 3: Antimicrobial activity of the essential oils of aerial parts of *D. crinitus*.

Microorganisms	Diameters of inhibition (mm)		
	Early vegetative	Early flowering	Full flowering
Gram-positive bacterium			
<i>Bacillus cereus</i>	8	11	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	21	28
Gram-negative bacterium			
<i>Escherichia coli</i>	10	8	6
Yeast			
<i>Candida albicans</i>	30	30	30

that appear to have strong-to-moderate antibacterial activity against Gram-positive bacteria and against pathogenic fungi, but in general, weaker activity was observed against Gram-negative bacteria [36, 37]. Secondly there is some evidence that minor components have a critical part to play in antibacterial activity, possibly by producing a synergistic effect between other components. This has been found to be the case for sage [38], some species of *Thymus* [39] and oregano [40].

#### 4. Conclusions

In conclusion, CG and CG-MS analysis showed that oils of *D. crinitus* are rich in phenolic compounds, whereas terpenic compounds showed marked variation with plant growth stage and the maximum amounts were detected during full-flowering stage. However, phenolic and aliphatic compounds were the main components during the early-vegetative stage. Bioassay screening of oils showed strong activity against

*C. albicans* and *S. aureus*. The results of the current study have shown that *D. crinitus* essential oil is potentially a good source of antimicrobial compounds and support the traditional medicinal application of this plant.

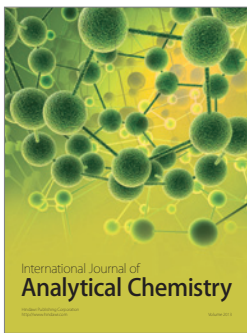
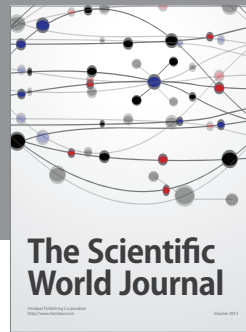
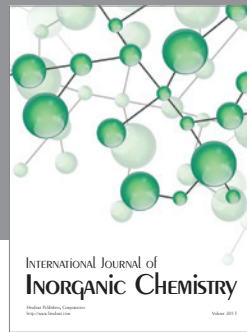
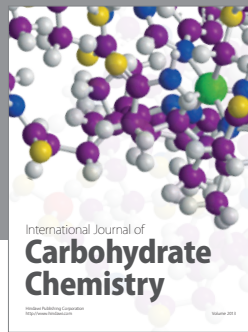
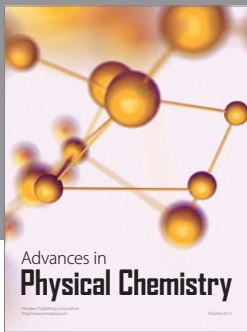
## Acknowledgment

The authors are indebted to the Ministère des Affaires Étrangères et Européennes throughout the research program "Partenariat Hubert Curien Tassili." The authors wish to thank the editor for the review of this revision and the consideration for publication in the journal. They appreciate the efforts for this paper.

## References

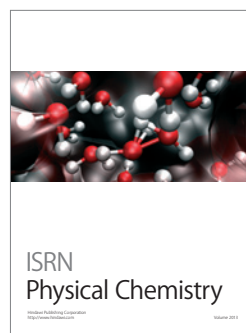
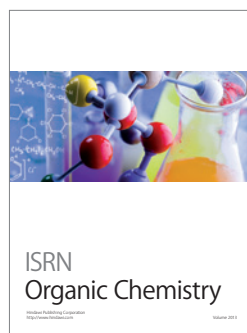
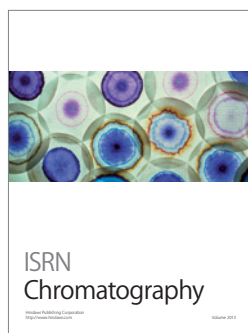
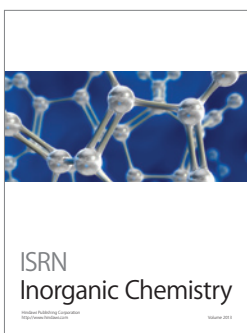
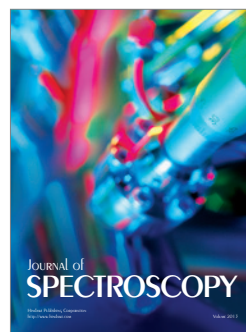
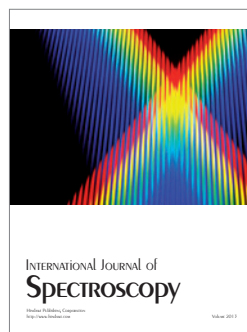
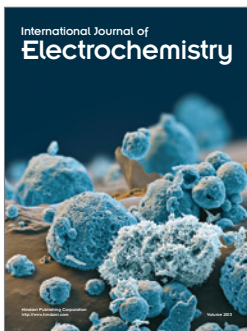
- [1] G. J. E. Nychas, C. C. Tassou, and P. Skandamis, "Antimicrobials from herbs and spices," in *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*, S. M. Roller, Ed., pp. 176–200, CRC Press, Woodhead Publishers, New York, NY, USA, 2003.
- [2] D. A. Saude-Guimaraes and A. R. Faria, "Natural compounds with anti-*Trypanosoma cruzi* activity," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 17, pp. 455–465, 2007.
- [3] F. Q. Oliveira, B. Gobira, C. Guimarães, J. Batista, M. Barreto, and M. Souza, "Plants species indicated in odontology," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 17, no. 3, pp. 466–476, 2007.
- [4] H. D. M. Coutinho, J. G. M. Costa, E. O. Lima, V. S. Falcao-Silva, and J. P. Siquiera Jr., "Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine," *Chemotherapy*, vol. 54, pp. 328–330, 2008.
- [5] H. Ekiert, "Medicinal plant biotechnology: the Apiaceae family as the example of rapid development," *Pharmazie*, vol. 55, no. 8, pp. 561–567, 2000.
- [6] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004.
- [7] N. Chorianopoulos, E. Kalpoutzakis, N. Aliannidis, S. Mitaku, G. J. Nychas, and S. A. Haroutounian, "Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 26, pp. 8261–8267, 2004.
- [8] A. Y. Leung and S. Foster, *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2nd edition, 1996.
- [9] P. S. Quezel and S. Santa, *Nouvelle Flore D'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*, CNRS, Paris, France, 1963.
- [10] M. El Amine Dib, N. Djabou, J. M. Desjobert et al., "Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. headspace solid phase microextraction as alternative technique to hydrodistillation," *Chemistry Central Journal*, vol. 4, no. 1, article 16, 2010.
- [11] D. A. Lanfranchi, H. Laouer, M. E. L. Kolli, S. Prado, C. Maulay-Bailly, and N. Baldovini, "Bioactive phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 4, pp. 2174–2179, 2010.
- [12] A. C. Tavares, M. J. Gonçalves, C. Cavaleiro et al., "Essential oil of *Daucus carota* subsp. *Halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, no. 1, pp. 129–134, 2008.
- [13] Conseil de l'Europe, *Pharmacopée Européenne*, Maisonneuve S.A, Sainte-Ruffine, France, 1996.
- [14] H. Van Den Dool and K. P. Dec, "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 11, pp. 463–471, 1963.
- [15] W. Jennings and T. Shibamoto, *Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles By Glass-Capillary Gas Chromatograph*, Academic Press, New York, NY, USA, 1980.
- [16] National Institute of Standards and Technology, "NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database," Gaithersburg, MD, 2005, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.
- [17] W. A. König, D. H. Hochmuth, and D. Joulain, *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of MassFinder 2. 1*, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, 2001.
- [18] National Institute of Standards and Technology, *NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, PC Version 1. 7*, Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Conn, USA, 1999.
- [19] F. W. McLafferty and D. B. Stauffer, *Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM Version 3. 10d*, Wiley Registry of Mass Spectral Data, Palisade, Newfield, NY, USA, 6th edition, 1994.
- [20] F. W. Mc Lafferty and D. B. Stauffer, *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, Wiley-Interscience, New York, NY, USA, 4th edition, 1988.
- [21] R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components By Gaz Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, Allured Publishing, Carol Stream, Ill, USA, 2001.
- [22] D. Hochmuth, *Mass Spectral Library "Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils"*, Library of MassFinder 3. 0, Hamburg, Germany, 2006.
- [23] N. S. Sangwan, A. H. A. Farooqi, F. Shabih, and R. S. Sangwan, "Regulation of essential oil production in plants," *Plant Growth Regulation*, vol. 34, no. 1, pp. 3–21, 2001.
- [24] N. S. Kim and D. S. Lee, "Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry," *Journal of Separation Science*, vol. 27, no. 1-2, pp. 96–100, 2004.
- [25] G. Circella, C. Franz, J. Novak, and H. Resch, "Influence of day length and leaf insertion on the composition of marjoram essential oil," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 10, no. 6, pp. 371–374, 1995.
- [26] M. Skoula, J. E. Abbes, and C. B. Johnson, "Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 28, no. 6, pp. 551–561, 2000.
- [27] J. P. Rauha, S. Remes, M. Heinonen et al., "Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 56, no. 1, pp. 3–12, 2000.
- [28] D. Kalemba and A. Kunicka, "Antibacterial and antifungal properties of essential oils," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 10, pp. 813–829, 2003.
- [29] M. Güllüce, M. Sökmen, D. Daferera et al., "In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L.," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 14, pp. 3958–3965, 2003.
- [30] H. J. D. Dorman and S. G. Deans, "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, no. 2, pp. 308–316, 2000.

- [31] B. M. Lawrence, "A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries," in *New Crops*, J. Janick and J. E. Simon, Eds., pp. 620–627, Wiley, New York, 1993.
- [32] V. Moleyar and P. Narasimham, "Antifungal activity of some essential oil components," *Food Microbiology*, vol. 3, no. 4, pp. 331–336, 1986.
- [33] N. Kurita, M. Miyaji, and R. Kurane, "Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants," *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 43, no. 11, pp. 2365–2371, 1979.
- [34] N. Kurita, M. Miyaji, R. Kurane, and Y. Takahara, "Antifungal activity of components of essential oils," *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 45, no. 4, pp. 945–952, 1981.
- [35] N. Kabelitz, P. M. Santos, and H. J. Heipieper, "Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 220, no. 2, pp. 223–227, 2003.
- [36] T. Hada, A. Shiraishi, S. Furuse et al., "Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*," *Natural Medicines*, vol. 57, no. 2, pp. 64–67, 2003.
- [37] B. Tepe, D. Daferera, M. Sökmen, M. Polissiou, and A. Sökmen, "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 5, pp. 1132–1137, 2004.
- [38] M. Marino, C. Bersani, and G. Comi, "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 67, no. 3, pp. 187–195, 2001.
- [39] N. Lattaoui and A. Tantaoui-Elaraki, "Individual and combined oils," *Rivista Italiana EPPOS*, vol. 13, pp. 13–19, 1994.
- [40] N. Paster, M. Menasherov, U. Ravid, and B. Juven, "Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain," *Journal of Food Protection*, vol. 58, no. 1, pp. 81–85, 1995.



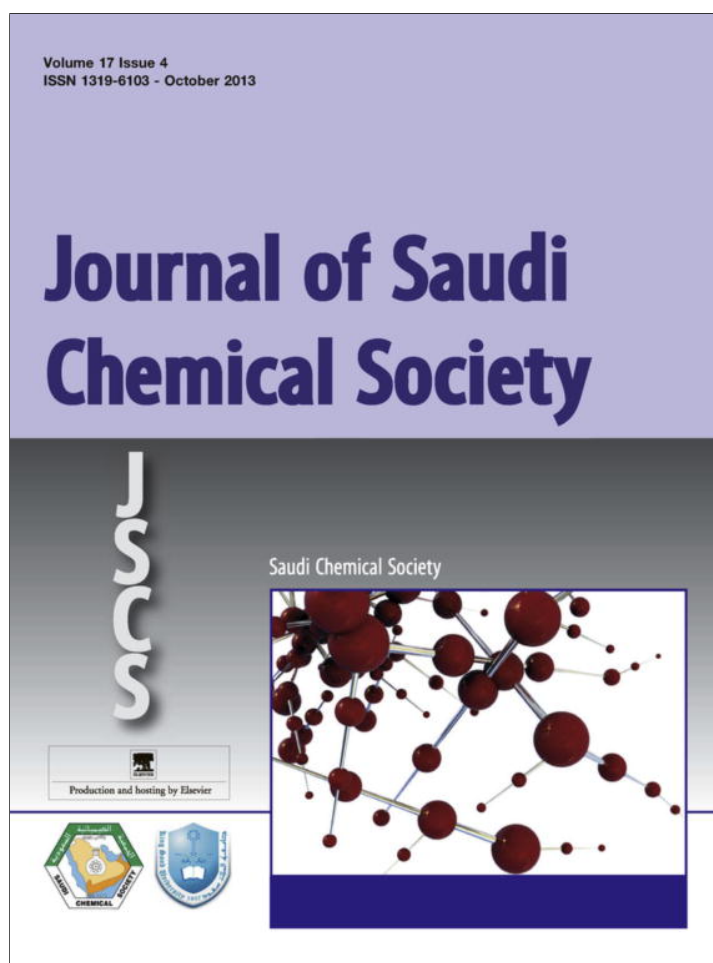
**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>





Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

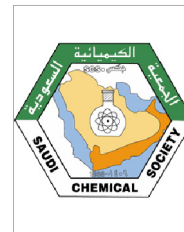
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



King Saud University  
Journal of Saudi Chemical Society

www.ksu.edu.sa  
www.sciencedirect.com



## ORIGINAL ARTICLE

# Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L.

Mohamed El Amine Dib \*, Hocine Allali, Amel Bendiabdellah, Nawel Meliani, Boufeldja Tabti

Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaid BP 119, Tlemcen 13000, Algeria

Received 11 February 2011; accepted 2 May 2011

Available online 6 May 2011

## KEYWORDS

*Arbutus unedo* L.;  
Phytochemical screening;  
Water and methanol extract;  
Phenolic fractions;  
Antimicrobial activity

**Abstract** In this study, antimicrobial activities of water and methanol extract, and three phenolic fractions of the roots of *Arbutus unedo* L. were investigated. Poor antibacterial activity against both *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was shown with water and methanol extract. However moderate antibacterial activity was shown by water extract and phenolic fractions against *Escherichia coli* and *S. aureus*, respectively. The phytochemical screening of roots of *A. unedo* revealed the presence of quinones, anthraquinones reducteurs compounds, anthocyanins, tannins and flavonoids. Quantitative analysis showed that the roots were strongly dominated by anthocyanins compounds (3.65 mg g<sup>-1</sup>) followed by total flavonoids (0.56 mg g<sup>-1</sup>) and flavones & flavonols (0.17 mg g<sup>-1</sup>).

© 2011 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

## 1. Introduction

In the Mediterranean region and North Africa, *Arbutus unedo* L. is traditionally used as an alternative medicine for its

\* Corresponding author. Tel.: +213 554378192; fax: +213 43286530.

E-mail address: a\_dibdz@yahoo.fr (M.E.A. Dib).

1319-6103 © 2011 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

Peer review under responsibility of King Saud University.  
doi:10.1016/j.jscs.2011.05.001



Production and hosting by Elsevier

biological properties. The fruit has antiseptic, diuretic and laxative effects, and the leaves have astringent, urinary tract antiseptic, anti-diarrheal and depurative properties (Ziyyat et al., 1997; Kivçak and Mert, 2001; Pabuçcuoglu et al., 2003; Mariotto et al., 2008; Afkir et al., 2008). Ziyyat and Boussairi, 1998 and Ziyyat et al., 2002 showed that an aqueous extract of *A. unedo* exhibited antihypertensive (Haouari et al., 2007) and vasorelaxant properties (Rosato et al., 2001). Furthermore, an *in vitro* study indicated that diethylether and ethyl acetate extracts of *A. unedo* leaves have an anti-aggregating effect on human platelets (Redondo et al., 2005a,b). This effect is likely mediated by its antioxidant activity, which may inhibit protein tyrosine phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> influx into platelets (Redondo et al., 2005a,b; Oliveira et al., 2009). Several compounds have been isolated from *A. unedo*, including aromatic acids, iridoids, monoterpenoids, phenylpropanoids, sterols and triterpenoids (Carcache-Blanco et al.,

2006). For example, Ayaz et al., 2000 detected lactic, malic, suberic and fumaric acids. Phytochemical studies have shown that the leaf extract contains phenolic antioxidant compounds, such as flavonoids (quercetin, isoquercetin, kaempferol, hyperoside and rutin) (Mazza and Miniati, 1993; Males et al., 2006), tannins, phenolic glycosides, anthocyanins, gallic acid derivatives, (+)-catechin and (+) catechin gallate (Fiorentino et al., 2007). Also several compounds have been isolated from the roots of *A. unedo* such as (+)-catechin, (+) catechin gallate and a number of phenolic compounds were also identified by GC-MS such benzeneacetic acid 4-hydroxy, caffeic acid, gallic acid, protocatechic acid and bis(2-ethylhexyl) phthalate (Dib et al., 2010). Therefore, the aim of the present work was: (i) to do a primary phytochemical screening of the main secondary metabolites classes and determined the polyphenols content contained in the root extract, (ii) to examine the antimicrobial activity of water and methanol extract, and three phenolic fractions from *A. unedo* on selected bacterial pathogens.

## 2. Experimental

### 2.1. Plant materials

Samples of *A. unedo* roots were collected in Terni Forest (about 20 km South of Tlemcen, Algeria; altitude, 1190 m; 34° 49'N, 1° 19'E) in September 2008. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Tlemcen University Botanical Laboratory (voucher no. Er 09.08). A portion of each sample was stored at 4 °C for future studies.

### 2.2. Preparation of the extracts

#### 2.2.1. Methanol extract

Roots were placed into the extractor of a Soxhlet. The extraction was carried out by using solvents of increasing polarity starting from hexane, dichloromethane, and methanol. At the end of the extraction the methanol extract was concentrated by evaporation.

#### 2.2.2. Water extract

The water extract was prepared by cold maceration of 150 g of roots in 500 ml of distilled water for 48 h. Then the extract was filtered, concentrated, and dried *in vacuo*.

### 2.3. Phytochemical screening

#### 2.3.1. Qualitative analysis

The phytochemical tests to detect the presence of tannins, flavonoids, anthocyanins, saponins, coumarines, quinones, anthraquinones, reducteurs compounds and alkaloids were performed according to the method described by Kokate, 1994 and Harborne, 1998. The tests were based on the visual observation of color change or formation of a precipitate after the addition of specific reagents. The results for the extracts studied are shown in Table 1.

#### 2.3.2. Quantitative analysis

The total flavonoids, anthocyanins and flavones & flavonols contents were determined spectrophotometrically using the Neu reagent (2-aminoethyl-diphenyl borate). This reagent is

**Table 1** Phytochemicals detected in extracts of roots of *A. unedo*.

Compounds groups	Water extract	Methanol extract
Quinones	+	+
Reducteurs compounds	+	–
Anthocyanins	+	–
Anthraquinones	+	+
Flavonoids	+	+
Tannins	+	+
Alkaloids	–	–
Saponins	–	–
Coumarins	–	–

Key: + = present; – = absent

**Table 2** Chromatographic features of phenolic fractions of roots.

Physical aspect	Sample weight (g)	Column chromatography		
		Compounds	Weight (g)	Yield (%)
Red solid	1.5	Fr-1	0.16	10.66
		Fr-2	0.59	39.33
		Fr-3	0.38	25.33

based on method Dohou et al., 2003 and Lebreton et al., 1967 that is a colorimetric method. All tests were carried out in triplicate.

#### 2.3.3. Isolation and extraction of polyphenols fractions

100 g of roots were crushed and extracted with 850 ml of water, 360 ml of methanol, then 650 ml of acetone at room temperature during 24 h. After filtration, acetone and methanol were removed *in vacuo*. The aqueous phase was extracted twice with 150 ml of methylene chloride in order to eliminate pigments and lipids and then lyophilized. The dry powder obtained was extracted four times with 150 ml of ethyl acetate. The combined organic layers were subsequently dried on MgSO<sub>4</sub>. Filtration and concentration *in vacuo* yielded 1.65 g of a red solid (0.55% yield). A part (1.50 g) of crude extract was solubilised in a mixture MeOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) and subjected to column chromatography through silica gel (65 g). Elution with 50% methanol/water (v/v) containing 0.1% (v/v) acetic acid gave three fractions Fr-1, Fr-2 and Fr-3 accounting for 10.66%, 39.33%, 25.33% of the whole extract, respectively, all being mixtures (Table 2).

#### 2.4. Antimicrobial assay (disk diffusion assay)

The bacterial strains were used to assess the antimicrobial properties of the test samples, two Gram-negative strains: *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and one Gram-positive *S. aureus* (ATCC 25923). Bacterial strains preserved in nutrient agar at 4 °C, were revived in nutrient solution and incubated at 37 ± 1 °C during 18–24 h. 0.1 ml of each culture was added to 10 ml BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Pronadisa Hispanalab). For antimicrobial assay, bacterial strains were grown on Mueller-Hinton Agar (MHA, Pronadisa



Hispanalab). Bacterial inocula reached microbial densities in the range  $10^6$ – $10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>.

### 2.5. Antimicrobial activity

Two different techniques were used to test the anti-microbial activity: the paper disc diffusion and the dilution agar method. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the later method.

#### 2.5.1. Paper disc diffusion method

Paper discs (6 mm in diameter) saturated with 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  solution of plant extract were applied to the surface of agar plates that were previously seeded by spreading of 0.1 ml overnight culture. The plates were incubated overnight at the appropriate temperature (see above) and the diameter of the resulting zone of inhibition was measured in millimeters. The results indicated in Table 3 and in the text represent the net zone of inhibition including the diameter (6 mm) of the paper disk. The scale of measurement was the following (disk diameter included): >20 mm zone of inhibition is strongly inhibitory; <20–12 mm zone of inhibition is moderately/mildly inhibitory and <12 mm is no inhibitory. All the data collected for each assay are the average of three determinations.

#### 2.5.2. Dilution agar method

A dilution agar method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC). Stock solutions were obtained by dissolving extracts in dimethylsulfoxide (DMSO 1%). Serial dilutions were made to obtain concentrations ranging from 0 to 800  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for methanol and water extracts and phenolic fractions. Each mixture was added to Mueller–Hinton agar for bacteria (Cowan, 1999; Lennette et al., 1985). The Petri dishes contained a sterile solution of DMSO and the culture medium, respectively, after incubation at 37 °C for 24 h. The experiments were performed in triplicate.

## 3. Results

### 3.1. Phytochemical screening

With the increase in the incidence of resistance to antibiotics, alternative natural products of plants could be of interest. Some plant extracts and phytochemicals are known to have antimicrobial properties, which could be of great importance in the therapeutic treatments. In the last years, various studies have been conducted in different countries, demonstrating the efficacy of this type of treatment (Coutinho et al., 2008). Table 1 shows the presence of various compounds such quinones, anthraquinones, reducteurs compounds, anthocyanins,

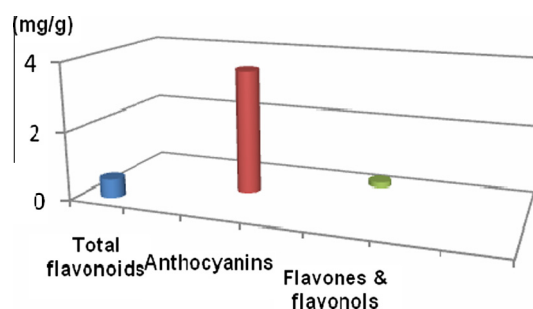


Figure 1 Total polyphenols contents (mg g<sup>-1</sup>) of roots.

flavonoids and tannins. However alkaloids, saponins and coumarins were not detected. Through phytochemical prospecting of the extracts, it was possible to determine the presence of diverse classes of secondary metabolites that show a wide variety of biological activities such as antimicrobial (Djipa et al., 2000; Esquenazi et al., 2002), antioxidant (Barreiros and David, 2006), antitumor and antiophidic (Okuda et al., 1989). The result of total flavonoids, anthocyanins, flavones and flavonols contents determined spectrophotometrically is shown in Fig. 1. The roots of *A. unedo* were strongly dominated by anthocyanin compounds (3.65 mg g<sup>-1</sup>) followed by total flavonoids (0.56 mg g<sup>-1</sup>) and flavones & flavonols (0.17 mg g<sup>-1</sup>).

### 3.2. Antimicrobial activity (assay disk)

Preliminary screening of the antimicrobial activity in vitro of methanol and water extract, and three phenolic fractions of roots was studied against three pathogen microorganisms using the filter paper disc agar diffusion technique. The disc diffusion assay was only used as an indication of anti-microbial activity since the amount of extract or fractions that adhered to the disc was not quantitatively determined. The results showed variation in the antimicrobial properties of plant extracts (Table 3). *E. coli* was found to be the most inhibited pathogen by the water extract with a diameter of zone of inhibition from 30 mm. The Fr-2 and Fr-3 exerted also potential effect of antibacterial activity against *S. aureus* with diameters of zones of inhibition from 20 and 22 mm, respectively. The methanol extract was active against *S. aureus* (15 mm). However, Fr-1 fraction exhibited no effect of antibacterial activity against of the bacterial pathogens tested (Table 3).

### 3.3. Minimum inhibitory concentrations (MIC)

The antibacterial activities of both extracts and phenolic fractions of *A. unedo* against the employed bacteria were

Table 3 Antimicrobial activity of extracts and phenolic fractions from the roots.

Microorganisms	Inhibition zone (mm)				
	Extract		Fractions		
	Water	Methanol	Fr-1	Fr-2	Fr-3
<i>E. coli</i>	30	15	i	i	i
<i>P. aeruginosa</i>	9	i	i	13	16
<i>S. aureus</i>	12	11	i	20	22

**Table 4** Minimal inhibitory concentration (MIC) ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) of root extracts and phenolic fractions.

Microorganisms	(MIC $\mu\text{g ml}^{-1}$ )				
	Extracts		Fractions		
	Water	Methanol	Fr-1	Fr-2	Fr-3
<i>E. coli</i>	200	600	> 800	> 800	> 800
<i>P. aeruginosa</i>	> 800	> 800	> 800	800	500
<i>S. aureus</i>	> 800	> 800	> 800	400	200

qualitatively and quantitatively assessed by the presence or absence of inhibition zones.

As shown in Table 4, water and methanol extract of roots are effective against *E. coli*. (minimum inhibitory concentration [MIC] = 200 and 600  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Fr-3 exhibited activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa* with an MIC of 200 and 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectively. Fr-2 was active against *S. aureus* with an MIC of 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . However Fr-1 shows no inhibition toward any of the microorganisms assayed (Table 4).

#### 4. Discussion and conclusion

The water and methanol extract of roots of *A. unedo* evaluated in this work has different varieties of phytochemicals that could be considered as responsible for the antimicrobial activity. Although they usually occur as complex mixtures, their activity can generally be accounted for in terms of their major components. The antimicrobial activity of the phenolic fractions could be due to the investigated strain sensitivity to tannins, flavonoids and the other phenolic components. (Djipa et al., 2000; Esquenazi et al., 2002). The tannin components of epicatechin and catechin demonstrated strong antimicrobial activity against bacteria and fungi (Ho et al., 2001). Flavonoids are synthesized by plants in response to microbial infection (Dixon et al., 1983) and are effective against a broad range of microorganisms. This study confirms that the roots of *A. unedo* contain high amounts of polyphenol compounds. The phenolic compounds are commonly found in the plant kingdom, and they have been reported to have multiple biological effects including antimicrobial activity. In conclusion, poor antibacterial activity against both *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria was shown with water and methanol extract. However moderate antibacterial activity was shown by water extract and both fractions (Fr-2 and Fr-3) against *E. coli* and *S. aureus*, respectively.

#### References

Afkir, S.T., Nguiefack, B., Aziz, M., Zoheir, J., Cuisinaud, G., Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Lahlou, S., Ziyat, A., 2008. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats, part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* L. in L-NAME-induced hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* 116, 288–295.

Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanen, M., 2000. Sugar, nonvolatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoides*) fruits. *J. Food Compos. Anal.* 13, 171–177.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., 2006. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim. Nova* 29, 113–123.

Carcache-Blanco, E.J., Cuendet, M., Park, E.J., Su BN Rivero-Cruz, J.F., Farnsworth, N.R., Pezzotu, J.M., Kinghorn, A.D., 2006. Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Nat. Prod. Res.* 20, 327–334.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Siqueira Jr., J.P., Lima, E.O., 2008. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (Suppl.), 670–675.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564–582.

Dib, M.A., Djabou, N., Allali, H., Tabti, B., 2010. Identification of phenolic compounds and antimicrobial activity of roots of *Arbutus unedo* L. *Asian J. Chem.* 22 (5), 4045–4053.

Dixon, R.A., Dey, P.M., Lamb, C.J., 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 55, 61–69.

Djipa, C.D., Delmee, M., Quentin-Leclercq, J., 2000. Antimicrobial activity of bark extract of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 71, 307–313.

Dohou, N., Yamni, Y., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A., Gmira, N., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 142, 61–78.

Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., et al., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn (Palmae) husk fiber extract. *Res. Microbiol.* 53, 647–652.

Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., Monaco, P., 2007. Polyphenol from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 809–811.

Haouari, M., Lopez, J.J., Mekhfi, H., Rosado, J.A., Salido, G.M., 2007. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* L. extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacol.* 113, 325–331.

Harborne, J.B., 1998. *Phytochemical Methods*. Chapman Hall, London, pp 60–66.

Ho KY, T., sai, C.C., Huang, J.S., Chen, C.P., Lin, T.C., Lin, C.C., 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 187–191.

Kivçak, B., Mert, T., 2001. Quantitative determination of tocopherol in *Arbutus unedo* L. by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia* 72, 656–661.

Kokate, C.K., 1994. *Practical Pharmacognosy*. Vallabh Prakashan, New Delhi, pp. 107–113.

Lebreton, P., Jay, M., Voirin, B., 1967. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Anal. Chim. (Paris)* 49 (7), 375–383.

Lennette, F.M., Balows, A., 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. In: Hansler, W.J., Shadomy, H.J. (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC.

Males, Z., Plazibat, M., Vundac, V.B., Zuntar, I., 2006. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree—*Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm.* 56, 245–250.

Mariotto, S., Esposito, E., Di Paola, R., Ciampa, A., Mazzon, E., Carcereri de Parti, A., Darra, E., Vincenzo, E., Cucinotta, G., Caminiti, R., Suzuki, H., Cuzzocrea, S., 2008. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol. Res.* 57, 110–124.

Mazza, G., Miniati, E., 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., 1989. Ellagi tannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med.* 55, 117–122.

Oliveira, I., Valentao, P., Lopes, R., Andrade, P.B., Bento, A., Seabra, R., Pereira, J.A., 2009. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stems. *Microchem. J.* 92, 129–134.

- Pabuçcuoglu, A., Kivçak, B., Bas, M., Mert, T., 2003. Antioxidant activity of *Arbutus unedo* L. leaves. *Fitoterapia* 74, 597–599.
- Redondo, P.C., Ben-Amor, N., Salido, G.M., Bargeti, A., Pariente, J.A., Rosado, J.A., 2005a.  $\text{Ca}^{2+}$  independent activation of Burton's tyrosine kinase is required for store-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human platelets. *Cell. Signal.* 17, 1011–1121.
- Redondo, P.C., Jardin, I., Hernandez-Cruz, J.M., Pariente, J.A., Salido, G.M., Rosado, J.A., 2005b. Hydrogen peroxide and peroxynitrite enhance  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and aggregation in platelet from type 2 diabetic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 779–789.
- Rosato, J.A., Porras, T., Conde, M., Sage, S.O., 2001. Cyclic nucleotides modulate store-mediated calcium entry through the activation of protein-tyrosine phosphatases and altered actin polymerization in human platelets. *J. Biol. Chem.* 276, 15666–15675.
- Ziyyat, A., Boussairi, E., 1998. Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L; in spontaneously hypertensive rats. *Phytother. Res.* 12, 110–113.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 58, 45–54.
- Ziyyat, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Tahri, A., Legssyer, A., Hoerter, J., Fischmeister, R., 2002. *Arbutus unedo* induces endothelium dependent relaxation of the isolated rat aorta. *Phytother. Res.* 16, 572.



**Daucus carota ssp. hispanicus Gouan. essential oils:  
Chemical variability and fungitoxic activity**

Journal:	<i>Journal of Essential Oil Research</i>
Manuscript ID:	TJEO-2013-0350
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	21-Oct-2013
Complete List of Authors:	Dib, Mohammed El Amine; Université de Tlemcen, Bendiabdellah, Amel; University Tlemcen, Costa, Jean; University of Corse, Paolini, Julien ; University of Corse, Muselli, Alain; University of Corse, Tabti, Boufeldja; University Tlemcen, Hassani, Fayçal; University Tlemcen,
Keywords:	Keyword 1, Keyword 2, Keyword 3

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 ***Daucus carota* ssp. *hispanicus* Gouan. essential oils: Chemical variability**  
4 **and fungitoxic activity**  
5  
6  
7

8 **Amel Bendiabdellah<sup>1</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>1,\*</sup>, Nassim Djabou<sup>1</sup>, Fayçal Hassani<sup>3</sup>,**  
9 **Julien Paolini<sup>1</sup>, Boufeldja Tabti<sup>1</sup>, Jean Costa<sup>2</sup> and Alain Muselli<sup>2</sup>**  
10  
11

12  
13 <sup>1</sup>Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie,  
14 Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.

15  
16 <sup>2</sup>Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus  
17 Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France.

18  
19 <sup>3</sup>Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Département d'Ecologie &  
20 Environnement, Faculté SNV-STU, Université Aboubekr Belkaïd BP 119, Tlemcen 13000,  
21 Algérie.  
22  
23  
24

25  
26  
27 *\*Corresponding author-email address: [a\\_dibdz@yahoo.fr](mailto:a_dibdz@yahoo.fr)*  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Abstract

Chemical composition of Algerian *Daucus carota* ssp. *hispanicus* Gouan. essential oils have been investigated using GC/RI and GC-MS and their antibacterial and antifungal activities were tested for the first time. Chemical analysis allowed the identification of 68 compounds amounting to 92.3-98.5 % of aerial part essential oils and 8 components representing 97.4-99.4 % of root essential oils. Intra-species variations of the chemical composition of essential oils from ten Algerian sample locations were investigated using statistical analysis (PCA and CA). In addition, root essential oils of *D. carota* ssp. *hispanicus* were found to be strongly fungicidal and inhibitory to aflatoxin production.

**Keywords:** *Daucus carota* ssp. *hispanicus*; Essential oils; Phenylpropanoids; Chemical variability; Antimicrobial and antifungal activities; Aflatoxin inhibitors.

## Introduction

Beneficial plants are widely distributed all over the world, and they are rich sources of useful secondary metabolites often as compounds with therapeutic roles in defense against a wide array of pathogens including viruses, bacteria and fungi (1). According to the literature, *Aspergillus flavus* is common fungi that normally inhabit as saprobes in soils and on a wide variety of decaying organic matters. Besides being an etiological agent of systemic aspergillosis and allergic reactions, *A. flavus* has received major attention due to its ability to produce the carcinogenic aflatoxins (2). Search of natural sources for novel inhibitors of aflatoxin biosynthesis has been a subject of intense study and a variety of bioactive aflatoxin inhibitory compounds have been reported from medicinal plants (3). Chemical composition of the essential oils of *Daucus carota* was widely studied; according to geographical and botanical origins of samples: monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids have been reported as main component classes (Table 1) (4-24). In the present study, *D. carota* ssp. *hispanicus* essential oils from Algeria were investigated in order to determine its biological activity as well as its inhibitor potential of aflatoxin. For this purpose, the chemical composition of the essential oil obtained by hydrodistillation was firstly investigated using gas chromatography/Retention Indices (GC/RI) and GC-Mass Spectrometry (GC-MS). The essential oils of separated organs (roots, total aerial parts, leaves, stems and flowers) were also analysed and the intraspecies variations in root and aerial part essential oils from 10 sample locations were studied using statistical analysis. Correlations between the essential oil chemical compositions and environmental parameters of the sample locations were discussed. Secondly, the antibacterial and antifungal effects of *D. carota* ssp. *hispanicus* essential oils were tested against eight bacteria and two fungi involved in foodborne illness or considered as clinically-important pathogenic micro-organisms. Biological experiments were performed by means of paper disc diffusion method and minimum inhibitory concentration assays.

## EXPERIMENTAL

### *Plant material and Oil isolation*

The plant material (aerial parts and roots) were collected from 10 locations in Algeria, during July 2012. Leaves, stems and flowers were additionally harvested in location of Hafir (S9). The plant material was botanically identified by Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of University of Tlemcen Algeria. Voucher specimens were deposited with the herbarium of the University of Tlemcen. The fresh aerial parts, roots and separated organs (leaves, stems and flowers) were submitted to hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-



1  
2  
3 type apparatus according to the European Pharmacopoeia (39). The essential oil yields were  
4 expressed in % (w/dw) through the weight of dried plant material. Fresh plant material was  
5 dried during five days at room temperature; water content was close to 82.5 % of plant  
6 weight.  
7  
8

#### 9 10 11 *Gas chromatography*

12 GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a  
13 dual flame ionization detection system and two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22  
14 mm I.D., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax  
15 (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min  
16 and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were  
17 maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the  
18 carrier gas (1 mL/min); the injection volume was 0.2  $\mu\text{L}$ . Retention indices (RI) of the  
19 compounds were determined from Perkin-Elmer software..  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

#### 27 28 *Gas chromatography-mass spectrometry*

29 Samples were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass quadrupole analyzer, coupled to a  
30 Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with two fused-silica capillary columns Rtx-1 and  
31 Rtx-Wax (ion source temperature 150°C; energy ionization 70 eV). Electronic Impact (EI)  
32 mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1 s). Other GC  
33 conditions were the same as described under GC except split 1/80.  
34  
35  
36  
37  
38

#### 39 40 *Component identification and quantification*

41 Identification of the components was based (i) on the comparison of their GC retention  
42 indices (RI) on non-polar and polar columns, determined relative to the retention times of a  
43 series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature  
44 data (40, 41) and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries (40, 42-  
45 44) and comparison of spectra with those of in-house laboratory library. The quantification of  
46 the essential oils components was performed using methodology reported in literature [45]  
47 and adapted by our laboratory (46). Component quantification was carried out using peak  
48 normalization, including RFs, with an internal standard (tridecane: 0.7 g/100g), and expressed  
49 as normalized % abundances.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



### *Antimicrobial assays*

#### *Micro-organisms and culture conditions*

The essential oils of roots and aerial parts from *D. carota* ssp. *hispanicus* were tested against eight microorganisms, including Gram positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Gram negative *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 and two fungal microorganisms, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus flavus* MNHN 994294. The bacteria were cultivated in Brain Heart Infusion Broth (BHI) at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . *C. albicans* was cultivated in Sabouraud dextrose agar (DAS) at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ . The inoculi were prepared by the direct inoculation of colonies in 1 mL of sterile saline solution and adjusted to the 0.5 standard of the McFarland scale, corresponding to  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL for the bacteria and 2 to  $5 \times 10^6$  CFU/mL for fungal strains (47).

#### *Agar disk diffusion method*

The standard agar disk diffusion method (48) was used to evaluate the inhibitory spectrum of the essential oil against the micro-organisms analyzed in the present study. The bacterial inoculi were seeded on Mueller Hinton agar solidified in Petri dishes, in such a way as to produce uniform growth throughout the dish. Once the dishes were prepared, 6 mm-diameter discs of filter paper containing 10  $\mu\text{L}$  of the undiluted essential oil were pressed lightly against the surface of the agar. After 30 min at room temperature, the dishes were incubated in a bacteriological oven at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  for 24 h. For the cultures of *C. albicans*, incubation time was 48 h, at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and the substrate was Sabouraud dextrose agar. At the end of the test period, the diameter of the inhibition zone formed over the agar culture was measured in millimeters. All tests were conducted in triplicate and the inhibition zones formed in the experimental dishes were compared with those of the controls.

#### *Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)*

The MIC assays were performed by standard dilution methods (49). The MIC was defined as the lowest product concentration that prevented visible growth of bacteria. All tests were performed on Muller Hinton agar. Briefly, 30  $\mu\text{L}$  of 2-fold serial dilutions in DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma-Aldrich) was added to 15 mL of agar to obtain concentrations ranging from 0.1 to 5 mg/mL tested product. The resulting agar solutions were mixed at high speed for 15 s, immediately poured into sterile Petri dishes, and then allowed to set for 30 mn.

1  
2  
3 The plates were then spot inoculated by pipetting  $10^5$  CFU of the desired strain on the spot on  
4 the plates. A negative control was prepared without essential oil, using only DMSO.  
5 Gentamycin and Amphotericin B (Sigma-Aldrich) were used as positive controls. Inoculated  
6 plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h. After the incubation period, the plates were observed  
7 and recorded for the presence or absence of growth. Each test was repeated at least 3 times.  
8  
9  
10

### 11 *Antifungal assay*

#### 12 *Direct method*

13 Antifungal assay was performed by the agar medium assay (50). Yeast Extract Sucrose (YES)  
14 medium with different concentrations of essential oil (1.0, 2.0 and 4.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) were prepared  
15 by adding appropriate quantity of essential oils and Tween 80, to melted medium, followed by  
16 manual rotation of Erlenmeyer to disperse the essential oil in the medium. About 20 mL of the  
17 medium were poured into glass Petri-dishes (9 cm). Each Petri-dish was inoculated at the  
18 centre with a mycelial disc (6 mm diameter) taken at the periphery of *A. flavus* colonies  
19 grown on PDA for 48 h. Control plates (without essential oil) were inoculated following the  
20 same procedure. Plates were incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 7 days and the colony diameter was  
21 recorded each day. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest  
22 concentration of essential oil in which no growth occurred. The inhibited fungal discs of the  
23 oil treated sets were re-inoculated into the fresh medium, and revival of their growth was  
24 observed. Minimal Fungicide Concentration (MFC) is the lowest concentration at which no  
25 growth occurred on the plates. Diameter of fungal colonies of treatment and control sets was  
26 measured, and percentage inhibition (PI) of fungal growth was calculated according to  
27 following formula (51):  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

$$41 \quad \text{PI} = 1 - \frac{D_t}{D_c} \times 100$$

42  
43 Dt: the diameter of growth zone in the test plate; Dc: the diameter of growth zone in the  
44 control plate.  
45  
46  
47

#### 48 *Statistical analysis*

49 Chemical data analyses were performed using Principal Component Analysis (PCA) and  
50 Cluster Analysis (CA) (52). Both methods aim at reducing the multivariate space in which  
51 objects (oil samples) are distributed but are complementary in their ability to present results  
52 (53). Indeed, PCA provides the data for diagrams in which both objects (oil samples) and  
53 variables (oil components) are plotted while canonical analysis informs a classification tree in  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 which objects (sample regions) are gathered. PCA was carried out using function 'PCA' from  
4 the statistical R software. The variables (volatile components) have been selected using  
5 function from the statistical software. The Cluster Analysis produced a dendrogram (tree)  
6 using the Ward's method of hierarchical clustering, based on the Euclidean distance between  
7 pairs of oil samples.  
8  
9  
10

## 11 12 13 **Results and discussion**

### 14 *Sample locations*

15  
16 Roots and aerial parts of *D. carota* ssp. *hispanicus* were collected in 10 locations of Western  
17 Algeria. Information concerning the locations of harvest such as location names, latitudes,  
18 longitudes, nature of soils and climates were tabulated in Table 2. The locations of harvest  
19 were distributed on two areas differentiated according to the altitude, the nature of soils and  
20 the climates. Area 1 includes Kihal, Amieur, Besekrane and Saf-Saf (S1-S4), four middle-  
21 mountain locations (263-599 m) with calcareous soil rich in organic matter and dry climates.  
22 Area 2 includes Mansourah, Beni Boublene, Lalla Setti, Mafrouche, Hafir and Terny (S5-  
23 S10), six mountainous locations (907-1220 m) with mineral-rich soils and humid and cooler  
24 climates (25, 26).  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 *Chemical compositions of D. carota* ssp. *hispanicus* essential oils

34 The chemical compositions of essential oils from roots, total aerial parts, leaves, stems, and  
35 flowers of *D. carota* ssp. *hispanicus* harvested from Hafir (S9) were investigated by GC-RI  
36 and GC-MS analysis. 8, 68, 61, 53, 47 components accounted for 99.1 %, 97.4 %, 96.1 %, 95.0 %, 98.9 %  
37 were identified in the essential oils of roots, total aerial parts, leaves, stems,  
38 and flowers, respectively (Table 3). Their retention indices and normalized % abundances are  
39 shown in Table 3. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC-  
40 retention indices with those of our laboratory-produced "Arômes" library, with the exception  
41 of five components that were identified by comparison with spectral data and retention indices  
42 from the literature (Table 3). Among them, 28 sesquiterpenes, 20 monoterpenes, 14 aliphatics,  
43 5 phenolics and one diterpene compounds were identified. Phenylpropanoid is the dominant  
44 class of compounds of essential oils, they accounted for 67.2-96.9 %. However, two types of  
45 essential oils were produced by *D. carota* ssp. *hispanicus* according to the aerial or  
46 subterranean part of the plant. Apiole (80.3 %) was the ultra-major component followed by  
47 myristicin (16.6 %) in the root essential oils while myristicin (66.9-83.8 %) was the unique  
48 main component in from aerial part oils. On moving from the bottom to the top of the plant, it  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 is noteworthy that the normalized abundances of myristicin increased as follows: 16.6 % in  
4 the roots, 66.9 % in the stems, 80.2 % in the leaves and 83.8 % in the flowers. Terpenic  
5 compounds were very smaller in root essential oil (2.2 %) and they were higher (12.6-28.6%)  
6 in the aerial part essential oils. This compound class was mainly represented by germacrene D  
7 (2.9–6.4 %) and epiglobulol (1.2-5.1 %). Only few quantitative differences occurred between  
8 the chemical compositions of essential oils from separated organs (leaves, stems, and flowers)  
9 and those of aerial parts. Relative to the studies reported previously in the literature (Table 1),  
10 the chemical compositions of the essential oils from Algerian *D. carota ssp. hispanicus*  
11 exhibit singular originality. Aerial part essential oils were clearly different to those from  
12 others origins in which myristicin have never been reported. As myristicin (29.7 %) and  
13 dillapiole (46.6 %) were identified as main components in the root oil of *D. carota ssp.*  
14 *maritimus* from Tunisia, the root essential oil of Algerian *D. carota ssp. hispanicus* was  
15 different by the occurrence of apiole which was reported here, for the first time, as *D. carota*  
16 essential oil component.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

#### 28 *Chemical variability of D. carota ssp. hispanicus essential oils*

29 GC-RI and GC-MS analysis of *D. carota ssp. hispanicus* essential oils obtained from aerial  
30 parts and roots from 10 Algerian locations allowed to characterize 92.3-98.5 % and 97.4-99.4  
31 % of the oils, respectively (Table 4). Although the ten essential oils of aerial parts were  
32 qualitatively similar, there were few differences in the normalized % abundances of their  
33 main components: myristicin (62.9–86.2 %), epiglobulol (1.1-6.6 %), germacrene D (1.2-5.3  
34 %), apiole (1.1-4.1 %) and viridiflorol (0.5-2.3 %). About essential oils from roots, there are  
35 significant differences in the normalized % abundances of their main components. For  
36 instance, apiole ranged from 13.2 % to 81.3 % and myristicin ranged from 15.6 % to 83.4 %  
37 (Table 4). Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA; dendrograms) were  
38 applied to identify possible relationships between essential oil compositions and geographical  
39 origins of samples. The data presented in Figs. 1 and 2 were obtained from the correlation  
40 matrix and the standardized matrix linking essential oil compositions to sample locations. The  
41 distribution of the six discriminate compounds; (*Z*)- $\beta$ -ocimene, myristicin, germacrene D,  
42 epiglobulol, viridiflorol and apiol is illustrated in Fig. 1. As shown in Fig. 1 and Fig. 2, the  
43 principal factorial plane accounts for 83.32 % of the chemical variability of essential oil  
44 variance. The dendrogram and plot established using the first two axes suggests that there are  
45 two main clusters of *D. carota ssp. hispanicus* oils (Figs. 1 and 2). One cluster included all  
46 sample oils from aerial parts and the other cluster included all sample oils from roots. Sample  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 oils from aerial parts represented a homogeneous group (S1-10) characterized by high  
4 amounts of myristicin (66.7-86.2 %). Sample oils from roots were divided into two sub-  
5 groups according to the normalized % abundances of myristicin and apiole (Table 5). The first  
6 sub-group (S1-S4) was myristicin-rich (58.0–83.4 %) with apiole (13.2-39.7 %) and the  
7 second sub-group (S5-S10) contained higher amounts of apiole (54.1-81.3 %) and lower  
8 amounts of myristicin (15.6-39.2 %).  
9  
10  
11  
12

### 13 14 *Correlation between essential oils chemical variability and environmental parameters of* 15 *sample locations*

16  
17  
18 PCA and CA analysis revealed the chemical variability of the root essential oils of *D. carota*  
19 *ssp. hispanicus* from ten locations (Figs. 1 and 2). It is noteworthy that the normalized %  
20 abundances of both major oil components differed greatly according to environmental  
21 parameters of sample locations. Specimens from Kihal, Amieur, Besekrane and Saf-Saf  
22 locations (Area 1: S1-S4) growing on calcareous soils with dry climate produced myristicin-  
23 dominant essential oils while specimens from Mansourah, Beni Boublene Lalla Setti,  
24 Mafrouche, Hafir and Terny (Area 2: S5-S10) growing on mineral-rich soils with humid and  
25 cooler climates produced apiole-dominant essential oils. By contrast, it seems that essential  
26 oils of aerial parts from *D. carota ssp. hispanicus* were not affected by the nature of soils and  
27 the climate. In addition, it is interesting to note the direct correlation between the essential oil  
28 yields and the area of harvest. This correlation occurs for *D. carota ssp. hispanicus* roots and  
29 aerial parts. Specimens originated from calcareous soils with dry climate (Area 1: S1-S4)  
30 exhibit lower yields (0.13-0.22% for the root oils and 0.4-0.85% for the aerial part oils) and  
31 specimens from mineral-rich soils and humid and cooler climates (Area 2: S5-S10) exhibit  
32 higher essential oil yields (1.0-1.6% for the root oils and 1.2-3.1% for the aerial part oils).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 Generally, the observed differences in chemical composition of the various oils can be the  
44 consequence of many factors. Such factors may include differences in climatic conditions,  
45 geographical locations and soil types (27, 28). Biotic and abiotic stresses exert a considerable  
46 influence on the production of several secondary metabolites in plants (29). Drought is one of  
47 the most important abiotic stress factors (30), affecting plant growth and leaf photosynthesis  
48 (31) and altering biochemical properties of plants (32). In the same way, changes in the  
49 chemical composition of the essential oils have been reported according to soil type (33-34).  
50 To advance in the study of the chemical variability of *D. carota ssp. hispanicus* from Algeria,  
51 it could be interesting to determine the genetic diversity of the populations studied here.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Antibacterial activity

The essential oil was evaluated for antibacterial activity against pathogenic strains of Gram positive (*S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *B. subtilis*) and Gram negative (*E. coli* and *K. pneumoniae*) bacteria. According to the results given in Table 6, both essential oils exhibited strong antimicrobial activity against *C. albicans*. The average zone of inhibition of *D. carota* ssp. *hispanicus* essential oil against *C. albicans* is situated at 26 and 30 mm for aerial parts and roots, respectively. However, *B. subtilis* was also prone to growth moderate inhibition with diameter zones of inhibition ranging from 14 to 16 mm. Rest of the bacterial strains (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* and *E. coli*) showed no inhibition, with diameter of zones of inhibition ranging from 6 to 10 mm (Table 6). The antimicrobial activity of root and aerial part essential oils was confirmed by the microdilution broth assay. As shown in Table 6, the most promising results were obtained from the aerial part oil which had the lowest MIC value (0.078 mg/mL) against *C. albicans*. The aerial part oil also showed an antimicrobial effect against *B. subtilis* and *S. aureus* with a MIC of 1.2 and 4.8 mg/mL respectively. It should be noted that the highest tested concentration (5 mg/mL) had no effect on other growth of microorganisms (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* and *E. coli*). The essential oil of *D. carota* ssp. *hispanicus* is mainly composed, by two kind of phenolic compounds (myristicin and apiole). However, a lot of phenolic compounds exhibit a wide range of biological effects (35, 36), especially the antimicrobial activity.

### Fungicidal activity

The results of in vitro assays showed that the root essential oil of *D. carota* ssp. *hispanicus* had a strong fungicidal effect against the growth of *A. flavus*. The results are given in table 7. MIC and MFC of root essential oil of *D. carota* ssp. *hispanicus*, was found to be 4.0  $\mu$ L/mL against toxigenic strain of *A. flavus*, respectively. The results of mycelial percentage growth inhibition (PI) are given in Table 7 and indicated that the radial growth of strains was totally inhibited by the essential oil. Percentage of growth inhibition (PI) was significantly ( $P < 0.05$ ) influenced by incubation time and essential oil concentration. Mycelia growth was considerably reduced with increasing concentration of essential oil. The root essential oil was more active than the essential oil obtained from the aerial parts. The percentage of inhibition zone and the minimal inhibition concentration value of the root essential oil were recorded as 100 % and at 4  $\mu$ g/mL after 8 days, respectively. Also, the concentration of 4  $\mu$ g/mL of aerial part essential oil exhibited a low inhibition, with percentage reduction of 42.22 after 8 days



(Table 7). The root essential oil was found to be effective against *A. flavus*. The bioactivity of the essential oil may be due to the presence of some highly fungitoxic components as phenylpropanoids (37). For instance, apiole have been previously reported as is a specific inhibitor of aflatoxin (38). In the search of bioactive aflatoxin inhibitory compounds, *D. carota* ssp. *hispanicus* essential oils from Algeria were revealed more interesting. The plants produce essential oils dominated by myristicin and apiole, two phenylpropanoids compounds which accounted for 93.6-97.1% and 67.2-86.3% in roots and aerial parts, respectively. Root essential oils of *D. carota* ssp. *hispanicus* were found to be strongly fungicidal and inhibitory to aflatoxin production. Our study suggests that Algerian *D. carota* ssp. *hispanicus* essential oils have the potential to be used as food preservatives.

### Acknowledgments

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

### References

1. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, *Food Chem Toxicol.*, **46**, 446 (2008).
2. M. T. Hedayati, A. C. Pasqualetto, P. A. Warn, P. Bowyer, and D. W. Denning, *Microbiology.*, **153**, 1677 (2007).
3. M. Razzaghi-Abyaneh, M. Shams-Ghahfarokhi, M.B. Rezaee, S. Jaimand, S. Alinezhad, R. Saberi, and T. Yoshinari, *Food Control.*, **20**, 1018 (2009).
4. A. Jabrane, H. Ben Jannet, F. Harzallah-Skhiri, M. Mastouri, J. Casanova, and Z. Mighri, *Chem. Biodiv.*, **6**, 881 (2009).
5. H.E.A. Saad, S.H. ElSharkawy, and A.F. Halim, *Pharm. Acta helvetica*, **70**, 79, (1995).
6. J. Kula, K. Izydorczyk, A. Czajkowska, and R. Bonikowski, *Flav Fragr J.*, **21**, 667 (2006).
7. F. Mojab, A. Hamed, B. Nickavar, and K. Javidnia, *J. Essent. Oil Bear.*, **11**, 271 (2008).
8. M. Staniszewska, J. Kula, M. Wiczorkiewicz, and D. Kusewicz, *J. Ess. Oil Res.*, **17**, 579 (2005).
9. P. Kainulainen, J. Tarhanen, K. Tiilikkala, and J.K. Holopainen, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3780 (1998).
10. M.G. Pinilla, M.J. Pérez-Alonso, and A. Velasco-Negueruela, *J. Ess. Oil Res.*, **7**, 433 (1995).

11. A.C. Tavares, M.J. Goncalves, C. Cavaleiro, M.T. Cruz, M.C. Lopes, J. Canhoto, and L.R. Salgueiro, *J. Ethnopharmacol.*, **119**, 129 (2008).
12. X. Imamu, A. Yili, H.A. Aisa, V.V. Maksimov, O.N. Veshkurova, and I. Salikhov, Sh. *Chem Nat Comp.*, **43**, 495 (2007).
13. Y. Wu, Z.L. Xu, H.j. Li, X.Y. Meng, Y.I. Bao, and Y.X. Li, *Chem Res Chinese U.*, **22**, 328 (2006).
14. A. Maxia, B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda, E. Tuveri, M.J. Gonçalves, C. Cavaleiro, and L. Salgueiro, *Fitoterapia.*, **80**, 57 (2009).
15. H. Marzouki, A. Khaldi, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, P. Molicotti, and S. Zanetti, *Nat Prod Commun.*, **5**, 1955 (2010).
16. M. Soković, D Stojković, J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Ristić, and D. Grubišić, *Pharm Biol.*, **47**, 38 (2009).
17. M.M. Özcan, and J.C. Chalchat, *Grasas y aceites.*, **58**, 359 (2007).
18. P.G. Rossi, L. Bao, A. Luciani, J. Panighi, J.M. Desjobert, J. Costa, J. Casanova, J.M. Bolla, and L. Berti, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7332 (2007).
19. M. Staniszewska, and J. Kula, *J. Ess. Oil Res.*, **13**, 439 (2001).
20. D. Mockute, and O. Nivinskiene, *J. Ess. Oil Res.*, **16**, 277 (2004).
21. Chizzola. R. *J. Essent. Oil Bear.*, **13**, 12 (2010).
22. S. Glišić, D. Mišić, M. Stamenić, I. Zizovic, R. Ašanin, and D. Skala, *Food Chem.*, **105**, 346 (2007).
23. J. Gora, A. Lis, J. Kula, M. Staniszewska, and A. Wołoszyn, *Flav Fragr J.*, **17**, 445 (2002).
24. M. Gonny, P. Bradesi and J. Casanova, *Flav Fragr J.*, **19**, 424 (2004).
25. B. Collignon, *Hydrogéologies appliquées des aquifères karstiques des monts de Tlemcen*. Thèse de doctorat. Université d'Avignon. France, (1986).
26. Algerian Minister of Agriculture and Rural Development. (2010). *Phase A du plan de gestion II. Phase descriptive et analytique*. Parc National de Tlemcen, (2006-2010).
27. S.S. Cheng, J.Y. Liu, Y.R. Hsui, and S.T. Cheng, *Biores Technol.*, **97**, 306 (2006).
28. S.S. Cheng, M.T. Chua, E.H. Chang, C.G. Huang, W.J. Chen, and S.T. Cheng, *Biores Technol.*, **100**, 465 (2009).
29. C.A. Jaleel, B. Sankar, P.V. Murali, M. Gomathinayagam, G.M.A. Lakshmanan, and R. Panneerselvam. *Coll Surf B: Biointer.*, **62**, 105 (2008).
30. S. Dash, and N. Mohanty, *J Plant Physiol.*, **158**, 1153 (2001).
31. J. Flexas, J. Bota, F. Loreto, G. Cornic, and T.D. Sharkey, *Plant Biology.*, **6**, 269 (2004).



- 1
- 2
- 3 32. S.M.A. Zobayed, F. Afreen, and T. Kozai, *Envir Experimental Botany.*, **59**, 109 (2007).
- 4 33. P. Martonfi, A. Grejtovsky, and M. Repcak, *Biochem System Ecology.*, **22**, 819 (1994).
- 5 34. P.H. Gouyon, P. Vernet, J.L. Guillerme and G. Valdeyron, *J. Hered.*, **57**, 59 (1986).
- 6 35. D. Kalemba, and A. Kunicka, *Curr Med Chem.*, **10**, 813 (2003).
- 7 36. M. Güllüce, M. Sökmen, D. Daferera, G. Agar, H. Özkan, N. Kartal, M. Polissiou, A.
- 8 Sökmen, and F. Sahin, *J. Agric Food Chem.*, **51**, 3958 (2003).
- 9 37. M. Razzaghi-Abyaneh, M. Shams-Ghahfarokhi, T. Yoshinari, M.B. Rezaee, K. Jaimand,
- 10 H. Nagasawa, and S. Sakuda, *Inter J Food Microbiol.*, **123**, 228 (2008).
- 11 38. M. Razzaghi-Abyaneh, T. Yoshinar, M. Sams-Ghahfarokhi, M.B. Rezaee, H. Nagasawa,
- 12 and S. Sakuda, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **71**, 2329 (2007).
- 13 39. Council of Europe *European Pharmacopoeia*, First Ed. Council of Europe, Strasbourg,
- 14 1997.
- 15 40. W.A. König, D.H. Hochmuth, and D. Joulain, *Terpenoids and Related Constituents of*
- 16 *Essential oils*, Library of Mass Finder 2.1., first ed. Institute of Organic Chemistry,
- 17 Hamburg, 2001.
- 18 41. National Institute of Standards and Technology *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard*
- 19 *Reference Database*, MD. Gaithersburg, [<http://webbook.nist.gov/chemistry>], 2008.
- 20 42. F.W. Mc Lafferty, and D.B. Stauffer, *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th ed., Mass
- 21 Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Palisade, Newfield,
- 22 1994.
- 23 43. R.P. Adams *Identification of essential oils by Capillary Gas Chromatography/Mass*
- 24 *Spectroscopy*, 4<sup>th</sup> edition Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL, 2009.
- 25 44. National Institute of Standards and Technology. *NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library.*
- 26 PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA, 1999.
- 27 45. C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B.A. Zellner, R. Costa, and
- 28 P. Rubiolo, *Flav Fragr J.*, **23**, 382 (2008).
- 29 46. N. Djabou, V. Lorenzi, E. Guinoiseau, S. Andreani, M.C. Giuliani, J.M. Desjobert, J.M.
- 30 Bolla, J. Costa, L. Berti, A. Luciani, and A. Muselli, *Food Control.*, **30**, 354 (2013).
- 31 47. M. Bendahou, A. Muselli, M. Grignon-Dubois, M. Benyoucef, J.M. Desjobert, A.F.
- 32 Bernardini, and J. Costa, *Food Chem.*, **106**, 132 (2008).
- 33 48. C. Rota, J.J. Carramiñana, J. Burillo, and A. Herrera, *J Food Protect.*, **67**, 1252 (2004).
- 34 49. F.M. Aarestrup, E.M. Nielsen, M. Madsen, and J. Engberg, *Antimicrob Agents*
- 35 *Chemother.*, **41**, 2244 (1997).
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1  
2  
3 50. R. Kumar, A.K. Mishra, N.K. Dubey, and Y.B. Tripathi, *Inter J Food Microbiol.*, **115**,  
4 159 (2007).  
5  
6 51. M.C. Yin, and S.M. Tsao, *Inter J Food Microbiol.*, **49**, 49 (1999).  
7  
8 52. R.G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*,  
9 First Ed. Wiley Interscience, New-York, 2003.  
10  
11 53. D. L. Massart, *Chemometrics: A Textbook*. Elsevier Science Ltd., New-York, 1998.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review Only

Table 1. Main components of the essential oils of *Daucus carota* from different origins previously reported

<i>D. carota</i> <i>ssp.</i>	Organs	Origins (country)	Main components	References
	Flowers		Sabinene (51.6%), terpinen-4-ol (11.0%).	
<i>maritimus</i>	Roots	Tunisia	Myristicin (29.7%), dillapiole (46.6%).	(4)
<i>maximus</i>	Ripe and mature fruits	Egypt	Shyobunone (16.8-24.3%), $\beta$ -cubebene (3.5-12.7%), preisocalamendiol (17.9-32.7%).	(5)
	Umbels	Poland,	$\alpha$ -Pinene (40.0- 46.0%), sabin[4]ene (12.0-24.0%), $\beta$ - caryophyllene (4.6-13.2%).	(6)
<i>sativus</i>	Leaves	Iran	<i>trans</i> -Anethole (23.5 %), myrcene (14.5 %),	(7)
	Seeds	Poland	Carotol (10.7-48.0%), $\alpha$ -pinene (9.0- 18.0%),	(8)
	Fruits	Sweden	Myrcene (25.7-44.6 %), (E)- $\beta$ -ocimene (8.0-11.3%), methyl isoeugenol (19.7-55.3%).	(9)
<i>gummifer</i>	Fruits	Spain	Geranyl acetate (51.74–76.95%).	(10)
<i>halophilus</i>	flowering umbels	Portugal	Sabinene (28.3-33.8%). Limonene (11.0-11.8%)	
	Ripe umbels		Elemicin (26.0–31.0%), sabinene (27.6–29.0%).	(11)
	Seeds	China	$\beta$ -bisabolene (80.49%), $\alpha$ -asarone (8.8%), and <i>cis</i> - $\alpha$ - bergamoten (5.51%).	(12)
<i>sativa</i>	Stems and leaves	China	Caryophyllene (17.24%), myrcene (14.06%), (+) epi- bicyclo-sesquiphellandrene (10.14%),	
	Roots		$\alpha$ -farnesene (17.1%), caryophyllene (10.9%), 1, 2, 4- Methano-1H-cyclobuta[ ] cyclo (32.3%).	(13)
	Umbels	Italy	$\beta$ -Bisabolene (17.6-51.0%), carotol (2.4-25.1%), 11 $\alpha$ -(H)- himachal-4-en-1- $\beta$ -ol (9.0-21.6%), E-methylisoeugenol (1.3- 10.0%).	(14)
		Portugal	$\alpha$ -Pinene (13.0-37.9%), geranyl acetate (15.0-65.0%).	

<i>carota</i>	Umbels	Tunisia	Elemicin (31.5-35.3%), carotol (48.0-55.7%), 11- $\alpha$ -(H)-himachal-4-en-1- $\beta$ -ol (12.7-17.4%), sabinene (12.0-14.5%), $\alpha$ -selinene (7.4-8.6%).	(15)
	Ripe, flowers, roots, leaves, and stems	Serbia	$\alpha$ -pinene (7.1-51.2%), sabinene (2.7-36.7%).	(16)
	Fruits		Muurolene (8.2-10.9%).	
	Seeds	Turkey	Carotol (68.0%), daucene (8.7%).	(17)
	Aerial parts	Corsica	$\alpha$ -Pinene (15.9-24.9%), elemicin (11.4-16.3%), E-methylisoeugenol (21.8-33.0%).	(18, 19)
	Herbs, umbels	Poland	$\alpha$ -Pinene (30.0-42.0 %), sabinene (19.5-40.5%), myrcene (2.5-7.0 %).	(8, 20)
	Seeds	Lithuania	Sabinene (28.2-37.5%), $\alpha$ -pinene (16.0-24.5%), terpinen-4-ol (4.6-7.5%), $\gamma$ -terpinene (2.9-6.0%).	(21)
	Roots		$\alpha$ -terpinolene (26-56 %).	
	Leaves	Vienna	$\alpha$ -Pinene (20.9-44.8%), sabinene (14.2-19.5%).	(22)
	Fruits		$\alpha$ -Pinene (23.5-30.4%), sabinene (21.5-46.6%), geranylacetate (3.9-28.1).	
	Fruits	Northern Serbia	Sabinene (18.7%), carotol (20.3%).	(23)
	Herbs, umbels	Poland	$\alpha$ -Pinene (16.1-42.7%), sabinene (21.3-45.3%), myrcene (4.0-12.9), limonene (3.55-6.75%).	(24)

Table 2. Information concerning the locations of harvest of *D. carota* ssp. *hispanicus* from Western Algeria

Samples	Locations	Latitudes (N)	Longitudes (E)	Altitudes (m)	Nature of soils	Climate s
S1	Kihal	35° 12' 16"	1° 11' 46"	490	Calcareous	Dry
S2	Amieur	34° 02' 05"	1° 14' 17"	319	soilhumic rich in	
S3	Bensekrane	34° 04' 49"	1° 13' 10"	263	organic matter	
S4	Saf Saf	34° 53' 58"	1° 16' 49"	599	(Agricola soil).	
S5	Mansourah	34° 51' 27"	1° 20' 50"	907	Red soil, fersiallitic	
S6	Beni Boublene	34° 51' 41"	1° 20' 15"	908	to character vertisol, has high	Humid
S7	Lalla Setti	34° 51' 45"	1° 18' 56"	1030	water content. (Rich in clays).	
S8	Mafrouche	34° 51' 00"	1° 17' 48"	1140	Brown fersiallitic soil originated on limestone rock.	Humid and cooler
S9	Hafir	34° 49' 60"	1° 22' 0"	1100	Rich in Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> and K <sup>+</sup> .	
S10	Terny	34° 47' 44"	1° 21' 32"	1220	Hard soil, rich in Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> and K <sup>+</sup> .	Humid and cooler

Nature soils and climate was reported by Algerian Minister of Agriculture and Rural Development, (25, 26)

Table 3. Composition of the essential oils of *D. carota* ssp. *hispanicus* (roots, leaves, stems and flowers)

N <sup>o</sup>	Components <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	RF <sup>e</sup>	<i>D. carota</i> ssp. <i>hispanicus</i> <sup>f</sup>					Identification <sup>g</sup>
						Roots	Aerial parts	Stems	Leaves	Flowers	
1	Pentan-3-one	654	652	954	1.40	-	tr	-	tr	-	RI, MS
2	Heptane	700	700	700	1.01	-	0.1	-	0.1	-	RI, MS
3	2-Methyl pentan-3-one	750	747	991	1.40	-	0.1	0.1	tr	-	RI, MS
4	Hexanal	770	771	1049	1.40	-	tr	0.1	tr	-	RI, MS
5	(E)-2-Hexenal	832	830	1204	1.40	-	0.1	0.1	tr	tr	RI, MS
6	$\alpha$ -Thujene	932	925	1014	1.01	-	0.3	4.3	0.5	0.1	RI, MS
7	$\alpha$ -Pinene	936	931	1016	1.01	-	tr	0.1	0.2	-	RI, MS
8	Thuja-2,4(10)-diene	946	943	1115	1.01	-	0.1	-	tr	-	RI, MS
9	Camphene	950	947	1062	1.01	-	0.1	tr	-	-	RI, MS
10	6-Methylhept-5-en-2-one	966	961	1325	1.40	-	tr	tr	-	-	RI, MS
11	Sabinene	973	968	1111	1.01	-	tr	tr	-	0.1	RI, MS
12	$\beta$ -Pinene	978	974	1102	1.01	-	0.2	1.2	0.4	0.2	RI, MS
13	2-Pentylfuran	981	978	1353	1.59	-	0.1	tr	tr	-	RI, MS, Ref
14	Myrcene	987	980	1152	1.01	-	0.3	0.2	-	tr	RI, MS
15	Isobutyl-2-methyl butyrate	994	991	1102	1.55	-	0.2	tr	tr	-	RI, MS
16	$\alpha$ -Phellandrene	1002	997	1155	1.01	-	0.1	0.2	0.2	-	RI, MS
17	$\alpha$ -Terpinene	1008	1011	1267	1.01	-	0.1	1.9	2	0.1	RI, MS
18	p-Cymene	1011	1015	1256	1.01	-	0.1	0.9	tr	tr	RI, MS
19	Limonene	1025	1022	1195	1.01	-	0.8	0.4	0.3	tr	RI, MS
20	(Z)- $\beta$ -Ocimene	1024	1027	1221	1.01	-	1.1	2.6	tr	1.1	RI, MS
21	(E)- $\beta$ -Ocimene	1034	1037	1237	1.01	-	tr	0.4	tr	0.1	RI, MS
22	$\gamma$ -Terpinene	1051	1051	1233	1.01	-	0.2	0.2	tr	-	RI, MS
23	m-Tolualdehyde	1053	1055	1575	1.40	-	0.1	tr	-	0.1	RI, MS

1												
2												
3												
4												
5	24	4-Methyl benzaldehyde	1060	1064	1591	1.40	-	0.2	tr	-	0.1	RI, MS
6	25	Terpinolene	1082	1079	1274	1.01	-	0.3	0.1	-	-	RI, MS
7	26	Nonanal	1076	1081	1387	1.40	-	tr	tr	0.1	tr	RI, MS
9	27	3-Methyl butyl isovalerate	1098	1090	1267	1.55	-	tr	0.2	tr	tr	RI, MS
10	28	2-Methyl butyl isovalerate	1102	1097	1284	1.55	-	0.3	0.2	tr	tr	RI, MS
11	29	(Z)-Ocimene oxide	1115	1115	1365	1.59	-	tr	tr	tr	tr	RI, MS, Ref
13	30	allo-Ocimene	1120	1121	1359	1.01	-	tr	tr	tr	-	RI, MS
14	31	(E)-Ocimene oxide	1125	1127	1377	1.59	-	0.1	tr	tr	-	RI, MS, Ref
16	32	(E)-2-Nonenal	1136	1134	1522	1.40	-	0.1	tr	tr	-	RI, MS
17	33	Lyratol	1150	1148	1769	1.34	-	0.1	-	0.1	-	RI, MS
18	34	(E)-2-Nonen-1-ol	1153	1152	1672	1.34	-	0.2	tr	-	tr	RI, MS
20	35	(E)-2-Decenal	1240	1237	1646	1.40	-	tr	0.5	tr	-	RI, MS
21	36	Bornyl acetate	1270	1265	1571	1.55	-	0.1	0.3	0.4	-	RI, MS
22	37	$\alpha$ -Longipinene	1360	1357	1465	1.0	-	tr	tr	tr	tr	RI, MS
24	38	$\alpha$ -Ylangene	1376	1371	1470	1.0	-	0.3	0.2	-	tr	RI, MS
25	39	$\alpha$ -Copaene	1379	1382	1457	1.0	-	0.1	0.2	tr	0.1	RI, MS
26	40	$\beta$ -Bourbonene	1386	1385	1510	1.0	-	0.2	-	tr	tr	RI, MS
27	41	$\beta$ -Ylangene	1420	1413	1560	1.0	-	0.5	1.1	0.4	0.3	RI, MS
28	42	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	1421	1416	1579	1.0	-	0.2	tr	-	tr	RI, MS
29	43	(E)- $\alpha$ -Bergamotene	1434	1430	1572	1.0	-	0.2	0.2	0.1	tr	RI, MS
30	44	$\alpha$ -Himachalene	1450	1447	1630	1.0	-	0.1	0.2	0.1	0.1	RI, MS
31	45	$\alpha$ -Humulene	1455	1460	1660	1.0	-	0.4	tr	0.2	0.1	RI, MS
32	46	$\alpha$ -Curcumene	1473	1468	1763	1.0	tr	0.1	1.0	0.9	0.1	RI, MS
33	47	Germacrene D	1479	1477	1704	1.0	0.3	3.1	3.0	2.9	6.4	RI, MS
34	48	Zingiberene	1489	1489	1717	1.0	-	0.3	0.3	0.4	0.2	RI, MS
35	49	Bicyclogermacrene	1494	1495	1720	1.0	-	0.3	0.2	-	0.7	RI, MS
36												
37												
38												
39												
40												
41												
42												
43												
44												
45												
46												
47												
48												
49												

50	Myristicin	1489	1499	2186	1.25	16.6	73.2	66.9	80.2	83.8	RI, MS
51	$\delta$ -cadinene	1507	1503	1742	1.0	-	0.2	1.6	0.2	0.2	RI, MS
52	Elemicin	1518	1520	2232	1.25	-	0.3	0.1	tr	0.6	RI, MS
53	(E)- $\alpha$ -Bisabolene	1531	1526	1776	1.0	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
54	Elemol	1541	1539	2070	1.34	-	0.4	0.1	0.2	tr	RI, MS
55	Epiglobulol	1558	1550	2013	1.34	1.4	5.1	2.1	3.1	1.2	RI, MS
56	Epoxy salvial-1,5-4(14)-ene	1560	1562	1902	1.55	-	0.1	1.4	0.1	0.2	RI, MS
57	Spathulenol	1572	1568	2110	1.34	-	0.2	0.3	0.3	tr	RI, MS
58	cis-Sesquisabinene hydrate	1586	1566	2099	1.34	0.1	0.3	0.1	0.1	tr	RI, MS
59	Caryophyllene oxide	1578	1574	1937	1.59	-	0.4	0.5	tr	-	RI, MS
60	4(14)-Salvialene-1-one	1592	1585	2109	1.31	-	0.5	0.1	0.1	0.1	RI, MS, Ref
61	Viridiflorol	1592	1594	2083	1.34	0.3	2.3	0.5	0.7	0.3	RI, MS
62	Guaiol	1593	1589	2090	1.34	-	0.6	0.1	0.1	tr	RI, MS
63	Aromadendrene oxide II	1623	1620	1996	1.59	-	0.1	0.3	0.1	0.1	RI, MS
64	$\tau$ -Muurolol	1633	1626	2138	1.34	-	0.1	0.1	0.1	0.3	RI, MS
65	$\tau$ -Cadinol	1633	1632	2160	1.34	-	0.8	0.4	0.1	0.3	RI, MS
66	$\alpha$ -Cadinol	1643	1641	2223	1.34	-	0.2	0.8	0.1	0.1	RI, MS
67	Apiole	1649	1646	2402	1.25	80.3	1.1	0.2	0.1	1.7	RI, MS, Ref
68	(E)-Phytol	2114	2015	2568	1.34	-	0.1	tr	0.1	tr	RI, MS
<b>Total identification %</b>						<b>99.1</b>	<b>97.4</b>	<b>96.1</b>	<b>95.0</b>	<b>98.9</b>	
<b>Essential oil yields % (w/w)</b>						<b>0.4</b>	<b>2.2</b>	<b>0.1</b>	<b>1.6</b>	<b>2.1</b>	
% Hydrocarbon compounds						0.4	9.9	20.6	8.8	10.0	
% Monoterpene hydrocarbons						-	3.7	12.5	3.6	1.7	
% Sesquiterpene hydrocarbons						0.4	6.1	8.1	5.2	8.3	
% Non terpenic hydrocarbon compounds						-	0.1	-	-	-	



1						
2						
3						
4						
5	% Oxygenated compounds	98.7	87.5	75.5	86.2	88.9
6	% Oxygenated monoterpenes	-	0.6	1.2	0.5	-
7						
8	% Oxygenated sesquiterpenes	1.8	11.1	6.8	5.1	2.6
9	% Non terpenic oxygenated compounds	-	0.8	0.3	0.2	-
10						
11	% Oxygenated diterpenes	-	0.1	-	0.1	-
12	% Phenylpropanoids	96.9	74.9	67.2	80.3	86.3

13 a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). b Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from literature [40]. c  
 14 Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp). e Response factors (RF). f Sample: S9.  
 15 Hafir. Percentages (means of three analyses). g RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; Ref.: compounds identified  
 16 from literature data (40)  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49

Table 4 . Chemical compositions of *D. carota* ssp. *hispanicus* essential oils from Algeria.

N°	Components <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIP <sup>d</sup>	<i>D. carota</i> ssp. <i>hispanicus</i> samples <sup>e</sup>																				Id. <sup>f</sup>
					Roots										Aerial parts										
					S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	Penta-3-one	654	652	954	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0.1	0.1	0.1	tr	tr	tr	tr	RI, MS
2	Heptane	700	700	700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	RI, MS
3	2-Methylpentan-3-one	750	747	991	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.2	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
4	Hexanal	770	771	1049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0.1	tr	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
5	(E)-2-Hexenal	832	830	1204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
6	$\alpha$ -Thujene	932	925	1014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.3	0.1	RI, MS
7	$\alpha$ -Pinene	936	931	1016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.3	tr	0.5	0.8	0.2	0.9	0.9	tr	0.1	RI, MS
8	Thuja-2,4(10)-diene	946	943	1115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
9	Camphene	950	947	1062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0.1	0.3	tr	tr	tr	0.1	tr	RI, MS
10	6-Methylhept-5-en-2-one	966	961	1325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	tr	RI, MS
11	Sabinene	973	968	1111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	0.2	tr	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	RI, MS
12	$\beta$ -Pinene	978	974	1102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.2	0.4	0.9	0.8	1.1	0.8	0.2	1.8	RI, MS
13	2-Pentylfuran	981	978	1353	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	0.1	0.1	0.2	tr	tr	0.1	0.2	RI, MS, Ref
14	Myrcene	987	980	1152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.1	0.1	0.3	tr	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4	RI, MS
15	Isobutyl-2-methylbutyrate	994	991	1102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	RI, MS
16	$\alpha$ -Phellandrene	1002	997	1155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	-	tr	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	RI, MS
17	$\alpha$ -Terpinene	1008	1011	1267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.1	-	tr	0.1	0.1	1.9	0.9	0.1	0.2	RI, MS
18	p-Cymene	1011	1015	1256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
19	Limonene	1025	1022	1195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0.3	0.5	0.4	0.6	0.1	0.9	0.7	0.8	0.9	RI, MS







Table 5. Clustering of *D. carota* ssp. *hispanicus* samples from the statistical analysis.

No <sup>a</sup>	Components	Roots			
		Group I (S1-4)		Group II (S5-10)	
		Range <sup>b</sup>	Average <sup>b</sup>	Range <sup>b</sup>	Average <sup>b</sup>
<b>Phenylpropanoid compounds</b>			<b>96.8</b>		<b>99.8</b>
<b>50</b>	Myristicin	58.3-83.4	70.6	15.6-39.5	31.4
<b>71</b>	Apiole	13.2-38.8	26.2	54.1-81.3	68.4

<sup>a</sup> The numbering refers to those of Table 4; <sup>b</sup> Normalized % abundances

Table 6. Antibacterial activity of *D. carota* ssp. *hispanicus* essential oils (EO) using agar disc diffusion and minimal inhibition concentration (MIC)

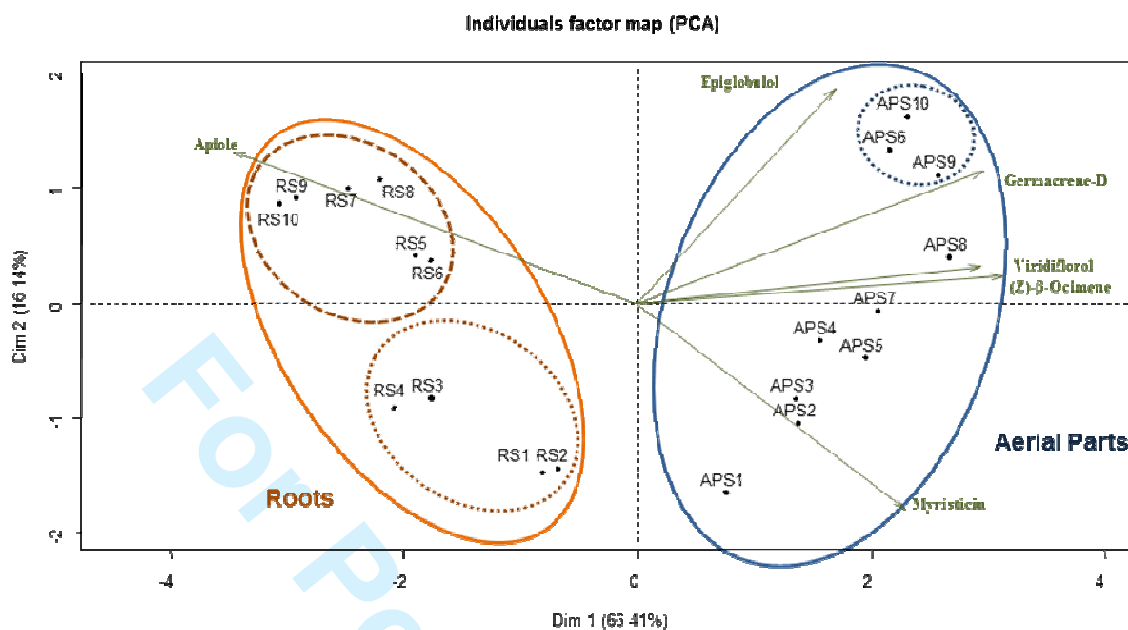
Bacterial strains	DD		MIC		Gen (mg/mL)	Am B (mg/mL)
	(mm)		(mg/mL)			
	Eo Aerial parts	Eo Roots	Eo Aerial parts	Eo Roots		
<b>Gram-positive bacterium</b>						
<i>L. monocytogenes</i>	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	> 5	> 5	nt	-
<i>B. cereus</i>	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	> 5	> 5	nt	-
<i>S. aureus</i>	8.0 ± 0.1	10.0 ± 0.2	4.8 ± 0.6	4.2 ± 0.6	0.128 ± 0.02	-
<i>B. subtilis</i>	16.0 ± 0.6	14.0 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.5	0.156 ± 0.09	-
<i>E. faecalis</i>	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	> 5	> 5	nt	-
<b>Gram-negative bacterium</b>						
<i>K. pneumoniae</i>	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	> 5	> 5	0.625 ± 0.08	-
<i>E. coli</i>	6.0 ± 0.00	6.0 ± 0.00	> 5	> 5	0.256 ± 0.08	-
<b>Yeasts</b>						
<i>C. albicans</i>	26 ± 0.7	30 ± 0.9	0.078 ± 0.02	0.125 ± 0.04	-	0.312 ± 0.02

Am B: Amphotericin B (10 µg/mL); Gen: Gentamycin (10 µg/disc); DD = Diameter of disc diffusion (mm); MIC = Minimal inhibitory concentrations (mg/mL); nt: not tested.

Table 7. Effect of *D. carota ssp. hispanicus* essential oil (Eos) against *A. flavus* pathogenic fungi by inverted petriplate technique.

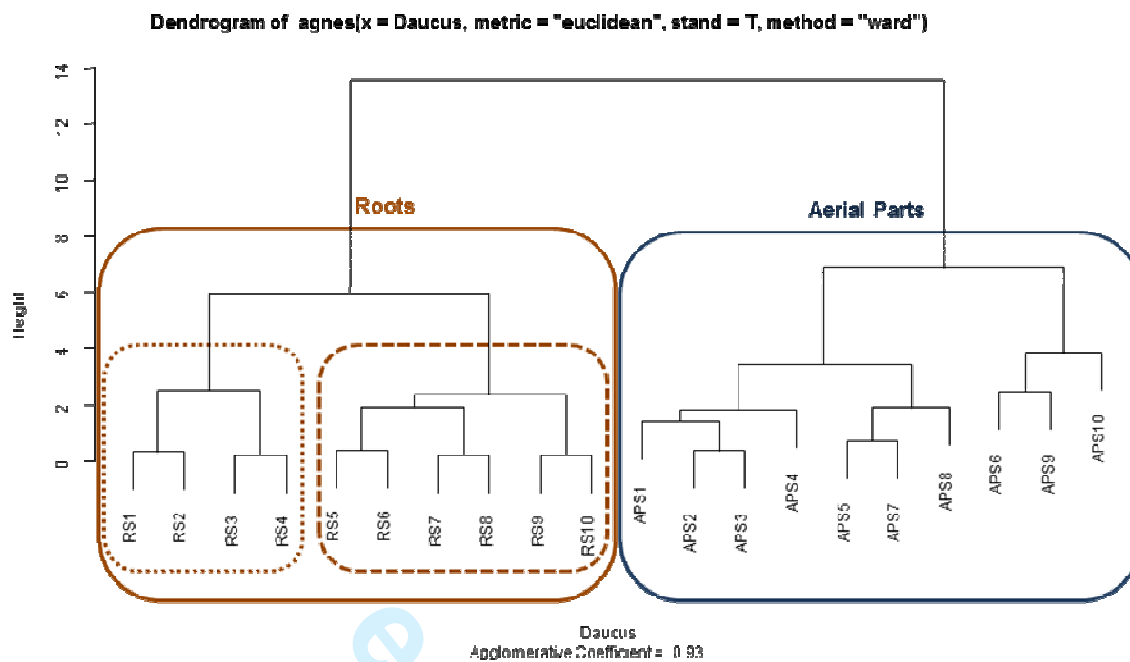
Test	<i>A. flavus</i> colony diameters			Percentage mycelial		
	recorded (mm)			zone inhibition		
Eos ( $\mu\text{g/mL}$ )	3.0	3.5	4.0	3.0	3.5	4.0
Roots	$16 \pm 0.4$	$10 \pm 0.0$	$6 \pm 0.0$	$64.44 \pm 0.8$	$77.77 \pm 0.9$	$100 \pm 0.00$
Aerial parts	$44 \pm 0.8$	$38 \pm 0.9$	$26 \pm 0.5$	$2.22 \pm 0.1$	$15.55 \pm 0.5$	$42.22 \pm 0.8$





R: Roots; Ap: Aerial parts

Fig. 1. PCA of chemical compositions of *D. hispanicus* oils. Distribution of variables (component codes corresponding to those of Table 4) and distribution of samples (coding numbers of locations)



R: Roots; Ap: Aerial parts

Fig. 2. CA of chemical compositions of *D. hispanicus* from Algeria