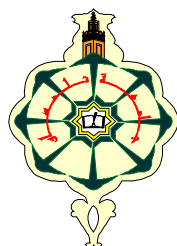


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire des substances naturelles et bioactives



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Option : **Molécules Bioactives : Synthèses et Applications**

Présenté Par : *Rania BELABBES*

Enquête ethnobotanique, caractérisation chimique et activités biologiques des volatils de deux plantes médicinales de l'ouest Algérien : *Calendula arvensis* L et *Carthamus* sp L

Présidents	Saïd GHALEM/Boufeldja TABTI	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs :	Hocine ALLALI	Professeur	Université de Tlemcen
	Mourad BENDAHOU	Professeur	Université de Tlemcen
	Meriem MERAD	MCA	Université de Tlemcen
	Nouria MERAD	MCA	Université de Tlemcen
	Nassim DJABOU	MCA	Université de Tlemcen
Invité	Alain MUSELLI	HDR	Université de Corse (France)
Directeur de mémoire	Mohammed El Amine DIB	MCA	Université de Tlemcen

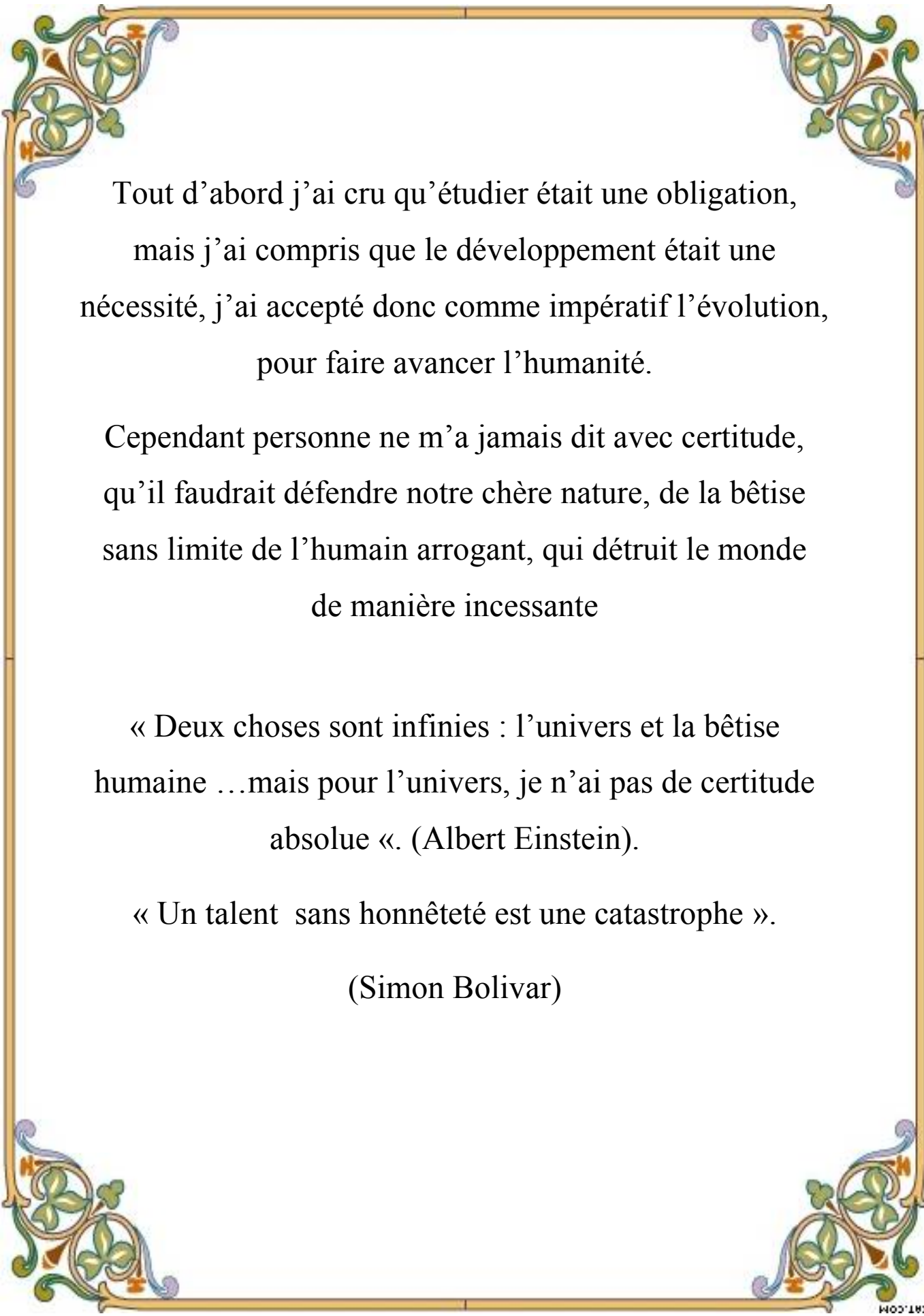


Le 27 Mai 2014

Created with

 **nitro**PDF[®] professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional



Tout d'abord j'ai cru qu'étudier était une obligation,
mais j'ai compris que le développement était une
nécessité, j'ai accepté donc comme impératif l'évolution,
pour faire avancer l'humanité.

Cependant personne ne m'a jamais dit avec certitude,
qu'il faudrait défendre notre chère nature, de la bêtise
sans limite de l'humain arrogant, qui détruit le monde
de manière incessante

« Deux choses sont infinies : l'univers et la bêtise
humaine ...mais pour l'univers, je n'ai pas de certitude
absolue ». (Albert Einstein).

« Un talent sans honnêteté est une catastrophe ».

(Simon Bolivar)

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu pour m'avoir donné la santé, le courage et la volonté pour achever ce travail, qui a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives « LASNABIO » de la faculté des sciences, Université de Tlemcen.

J'exprime mes remerciements les plus profonds à mon encadrant M^r DIB Mohamed El Amine, en reconnaissance de son aide, de son dévouement et de ses conseils judicieux qui m'ont été d'un grand soutien moral et qui m'ont amenée à réaliser ce travail. Je lui serai reconnaissante de la confiance qu'il m'a témoignée.

Je tiens aussi à remercier M^r GHALEM Said et M^r TABTI Boufeldja mes enseignants, pour m'avoir fait un grand honneur en acceptant de présider le jury.

Je remercie également, M^r DJABOU Nassim pour ses conseils éclairés, et pour son soutien et son aide.

Que mesdames et messieurs les membres de jury trouvent ici l'expression de mon profond respect et de mes remerciements les plus sincères pour l'intérêt qu'ils portent pour jurer ce modeste travail, en l'occurrence : M^{mes} MERAD Nouria, MERAD Meriem et M^r ALLALI Houcine.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mon profond respect à M^r Alain MUSELLI de l'Université de Corte en Corse, pour avoir accepté d'assister à ce jury.

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 ce mémoire n'aurait jamais pu être réalisée.

J'exprime aussi mes remerciements à M^{rs} Félix TOMI, Alain MUSELLI et Nassim DJABOU pour la réalisation et l'interprétation des spectres RMN.

Remerciements

Je tiens à remercier M^r BENDAHOU Mourad pour les activités antifongiques.

Mes remerciements vont aussi à M^{me} TABTI Leila, M^{me} MELIANI Nawel ,M^{me} ZIZI Zahia pour leurs orientations, leurs aides et a M^r BENABADJI Noury, M^r KAZI TANI Choukri pour l'identification des deux plantes.

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

Je ne peux oublier de remercier chaleureusement mes très chers (e) amis (e), pour l'ambiance cordiale et leur aide permanente qui a fait preuve d'une grande patience suite à mes plaintes et mes satisfactions : Fatima Zahra (témoucha), Ali, Adel, Meriem, Sihem, Nadia, Dalila,Chahra , Amel, kamel.

Enfin, mes derniers remerciements vont à ma formidable famille. Cette page n'est pas le lieu idéal pour décliner l'arbre généalogique mais sans vous tous, sans votre soutien, cette grande et longue aventure aurait été moins supportable. Cette aventure, certains l'ont vécue d'assez près ... voire de très très près ! Parmi ces derniers je pense forcément à mes parents qui ont su composer avec mes absences. Pour ce travail qui a parfois semblé infini : heureusement, leur patience et leur amour, eux, sont vraiment infinis.

Je remercie d'avance toutes les personnes qui prendront la peine de lire cet humble document

MERCI



Dédicaces

A mes très chers parents

A mes aimables frères Zaki & Issam

A ma sœur Meriem

A tous ceux qui me sont chers

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I	
CHAPITRE I : Etude théorique	
I.1.Huiles essentielles.....	3
I.1.1.Introduction.....	3
I.1.2.Propriétés biologiques des H.Es.....	3
I.1.3.Les méthodes d'analyses des H.Es.....	4
I.2.Activité antioxydante.....	6
I.2.1.Définition d'un antioxydant.....	6
I.2.2.Activités biologiques des plantes aromatiques.....	7
I.3.Activité antifongique.....	8
CHAPITRE II : Etude botanique de <i>Calendula arvensis</i> et <i>Carthamus sp</i>	
II.1.Généralité sur la famille des Astéracées	9
II.1.1.Morphologie.....	9
II.1.2.Distribution	10
II.2.Le genre <i>Carthamus</i>	11
II.2.1. <i>Carthamus sp</i>	11
II.2.2.Classification systématiques	12
II.2.3.Description.....	12
II.2.4.Domains d'applications.....	12
II.2.5.Distribution.....	13
II.2.6.Liste des <i>carthamus sp</i> recensées en Algérie.....	13
II.2.7. Travaux scientifiques réalisées sur <i>Carthamus sp</i>	13
II.3.Le genre <i>Calendula</i>	13
II.3.1. <i>Calendula arvensis</i>	14
II.3.2.Classification systématiques.....	14
II.3.3.Description.....	15
II.3.4.Domains d'applications.....	15
II.3.5.Distribution.....	15
II.3.6.Liste des <i>calendula</i> recensées en Algérie.....	16
II.3.7.Travaux scientifiques réalisées sur <i>Calendula</i>	16
PARTIE II	
CHAPITRE III : Extraction et Caractérisation des H.Es.	
III.1.Criblage phytochimique.....	18
III.2. Composition chimique de l'H.E de <i>Calendula sp L</i>	21
III.3. Composition chimique de <i>Carthamus sp L</i>	23
III.4. Identification du composé majoritaire par RMN.....	24

CHAPITRE IV : Partie biologique

IV.1. Activité antioxydante.....	29
IV.1.1.Introduction.....	29
IV.1.2.Test antioxydant par CCM.....	29
IV.1.3.Test de piégeage du radical libre DPPH	29
IV.1.4.Test de la réduction du fer FRAP.....	31
IV.1.5. Test de blanchissement du β -carotène	32
IV.2. Activité antifongique	34
IV.2.1.Introduction.....	34
IV.2.2.Activité antifongique in vivo de l'H.E de <i>Carthamus sp</i> et de <i>Calendula arvensis</i> contre.....	35
le développement des champignons	
IV.2.3.Activité antifongique in vitro de H.E DE <i>carthamus sp</i> et de <i>c ;arvensis</i>	36
contre la croissance de la <i>penicillium sp</i>	
CONCLUSION GENERALE.....	37

PARTIE III

CHAPITRE V : Partie expérimentale

V.1. Provenance du matériel végétal et identification.....	39
V.2. Méthodes utilisées pour l'extraction des H.Es.....	39
V.3. Méthodes d'identification chimique des H.Es.....	40
V.3.1.Analyse par CPG/FID.....	40
V.3.2.Couplage CPG/Spectrométrie de masse.....	41
V.3.3.Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	41
V.4.Méthodologie d'analyse.....	41
V.5. Criblage phytochimique.....	42
V.5.1.Préparation de l'extrait aqueux et éthanolique.....	42
V.5.2.Tests de caractérisation.....	42
V.6. Évaluation de l'activité antioxydante.....	45
V.6.1. Test CCM.....	45
V.6.2.Test DPPH.....	45
V.6.3.Test de réduction du fer FRAP.....	47
V.6.4.Test du dosage du blanchissement de β -carotène	48
V.7. Activité antifongique in vitro et in vivo.....	49
V.7. 1.Activité antifongique in vivo de H.E de <i>Carthamus sp</i> et de <i>Calendula arvensis</i> contre.....	49
le développement des champignons de <i>Citrus sinensis</i>	
V.7.2.activité antifongique in vitro de H.E de <i>Carthamus sp</i> et <i>Calendula arvensis</i> contre	50
<i>penicillium sp</i>	

Références bibliographique

LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Identification des constituants d'une H.E par combinaison.....6 des techniques de CPG et de CPG/SM
Figure II.1	Les Astéracées.....9
Figure II.2	Morphologie des Astéracées.....10
Figure II.3	Répartition géographique mondiale des Astéracée.....10
Figure II.4	Morphologie <i>Carthamus sp</i>11
Figure II.5	Racines de <i>Carthamus sp L</i>12
Figure II.6	Répartition de <i>Carthamus sp</i> dans le monde13
Figure II.7	Morphologie <i>Calendula</i>14
Figure II.8	<i>C. arvensis L</i>15
Figure II.9	Répartition de <i>C. arvensis</i> dans le monde.....15
Figure III.1:	Montage d'hydrodistillation type Clevenger.....19
Figure III.2:	Composés majoritaires de l'H.E de <i>C. arvensis</i>22
Figure III.3:	Principaux familles de composés de <i>C. arvensis</i>22
Figure III.4	Spectre RMN 1H.....24
Figure III.5	Spectre RMN13C25
Figure III.6	Spectre RMN 2D HSQC.....27
Figure III.7	Spectre RMN 2D HMBC.....28
Figure III.8	Benzyl 2-furylacetylene (Carlina oxide)/2-(3-phenylprop-1-ynyl) furan.....28
Figure IV.1	Plaque CCM présentant des tâches à activité antioxydante.....29 avec le DPPH de H.E de <i>Carthamus sp</i> et <i>C. arvensis</i>
Figure IV.2	Réduction du radical du violet au jaune par l'H.E de <i>Carthamus sp</i>30
Figure IV.3	Influence de la concentration d'HE de <i>Carthamus sp</i> sur.....31 l'intensité de la couleur de réduction
Figure IV.4	Pouvoir réducteur de H.E <i>Carthamus sp</i> , <i>C. arvensis</i> et de l'acide ascorbique32
Figure IV.5	Structure de la vitamine C.....32
Figure IV.6	Capacité des 2 H.E a inhibé la réaction de β -carotène avec l'acide ascorbique.33
Figure IV.7	Structure de la β -carotène.....33

LISTE DES FIGURES

Figure IV.8	Oranges pourries (Témoin) qui a été inoculées avec les pathogènes , et oranges non pourries (à droite et à gauche) dans lequel l'hydrolat est appliqué 30 minutes avant l'inoculation l'agent pathogène, et maintenu pendant 20 jours à 25 °C.....	35
Figure V.1	Région de Beni Snous Tlemcen.....	39
Figure V.2	Région de Ghazaouet Tlemcen.....	39
Figure V.3	Montage de l'hydrodistillation.....	40
Figure V.4	Appareil CPG.....	40
Figure V.5	Extracteur Soxhlet	42
Figure V.6	Méthode CCM.....	45
Figure V.7	Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH.....	46
Figure V.8	Capacité antioxydante de l'H.E de <i>Carthamus sp</i>	47
Figure V.9	Méthode DPPH.....	47
Figure V.10	Appareils utilisées dans la méthode de FRAP.....	48
Figure V.11	Mécanisme réactionnel du test de FRAP.....	48
Figure V.12	Activité antifongique in vivo.....	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II.1	Position taxonomique de <i>Carthamus sp. L.</i>	12
Tableau II.2	Liste de quelques espèces de <i>Carthamus</i> d'Algérie.....	13
Tableau II.3	Position taxonomique de <i>C. arvensis L.</i>	14
Tableau II.4	Les espèces <i>Calendula</i> de l'Algérie.....	16
Tableau III.1	Prospection phytochimique des extraits de solvant de <i>C. arvensis</i> et de <i>Carthamus sp</i>	18
Tableau III.2	Composition chimique d'H.E des parties aériennes de <i>Carthamus sp</i>	20
Tableau III.3	Composition chimique d'H.E des racines de <i>Carthamus sp</i>	23
Tableau III.4	Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹ H du composé NI-2.25	
Tableau III.5	Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹³ C du composé NI-2.26	
Tableau III.6	Structure et attribution des déplacements chimiques..... des protons et des carbones du Composé NI-2	27
Tableau IV.1	% d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'H.E de <i>Carthamus sp</i> , <i>C. arvensis</i> et du BHT à différentes concentrations	30
Tableau IV.2	Activité antioxydante de l'H.E et le BHT pour la méthode de dosage de blanchiment de β-carotène/acide linoléique à différentes concentrations.	33
Tableau IV.3	Effet de H.E de <i>Carthamus sp</i> et <i>C.arvensis</i> contre le champignon pathogène <i>pinicillium sp</i> par la technique petriplate inversé	36

LISTE DES ABREVIATIONS

H.E : Huile essentielle

C. arvensis : *Calendula arvensis* L

FID: Flame Ionisation Detector

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

CPG (CG): Chromatographie en Phase Gazeuse

CPG /SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CC : Chromatographie liquide sur Colonne ouverte

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

HPLC : Chromatographie liquide Haute Performance

SM : Spectroscopie de Masse

IRTF : Infra-Rouge de Transformée de Fourier

DPPH: 2, 2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle

FRAP: Feric Reducing Ability of Plasma

IC₅₀ : Concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres

NI : Non-identifié

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

ppm : Partie par million

Ir : Indice de rétention

BHT: Hydroxytoluène butylé

BHA (hydroxyanisol butylé)

TBHQ : tert-butylhydroquinone

DO: Densité Optique

nm : Nanomètre

N : Nord

O: Ouest

m : Mètre

C. sinensis : *Citrus sinensis*

Ligoine : éther de pétrole

PDA : Potatoes Dextrose Agar

Introduction générale

Une croyance bien répandue est que toute plante soigne

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400'000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimiques et pharmacologiques, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents [1].

Dans le cadre de la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux [1].

Parmi ces constituants d'origine végétale, les huiles essentielles, riches en terpénoïdes et en composés non-terpénoïdiques, possèdent des propriétés biologiques diverses et intéressantes. Elles constituent donc une source attirante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives. 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 [2].

Sur la base de cette hypothèse, cette étude s'est attelée à l'investigation phytochimique de *Carthamus sp*, vu qu'elle n'a fait l'objet, à notre connaissance d'aucune étude et *Calendula arvensis* du fait qu'elle n'a fait l'objet que de très peu

Introduction générale

d'étude. Ce travail avait également pour but une meilleure connaissance biologique de ces deux espèces.

La présentation de nos travaux est répartie comme suit :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique et une présentation botanique de la famille des Astéracées et aux plantes *Carthamus sp* & *Calendula arvensis* ; ainsi que la présentation des travaux antérieurs relatifs aux huiles essentielles et activités biologiques.

La deuxième partie concerne l'extraction, la caractérisation et l'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles des deux plantes.

La troisième partie présente les méthodes d'extractions, les conditions expérimentales des diverses analyses CPG, CPG-SM, RMN ^1H , RMN ^{13}C et RMN 2D (HSQC, HMBC), menant à l'identification de la composition chimique des huiles essentielles, ainsi que les différentes méthodes utilisées pour évaluer les activités biologiques.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale

Chapitre I : Etude théorique

I.1. Les huiles essentielles

I.1.1 Introduction

L'étude des H.Es est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. Il n'existe pas de réglementation concernant spécifiquement l'emploi des H.Es à chaque type d'usage se rapporte une réglementation spécifique, qu'il convient de respecter selon l'usage que l'on préconise pour le produit. Les H.Es peuvent être classées comme dispositifs médicaux, compléments alimentaires, cosmétiques, insecticides, produits chimiques ou même parfums d'ambiances.

L'analyse chimique a permis de mettre en évidence la présence dans ces H.Es de composés volatils en C_{10} ou C_{15} qu'on a appelés terpènes à cause de leur origine historique qui est l'essence de térébenthine [3]. Le point commun à la majorité des terpènes est la présence dans leur squelette de l'unité de base isoprène, qui peut se retrouver plusieurs fois, conduisant à une formule brute multiple de C_5H_8 pour les hydrocarbures. Guignard, (2000)[3] classe les terpènes d'après le nombre d'unités en C_{10} qu'ils comportent. Ainsi, pour les hydrocarbures terpéniques, la classification est la suivante : $C_{10}H_{16}$: monoterpènes ; $C_{15}H_{24}$: sesquiterpènes ; $C_{20}H_{32}$: diterpènes ; $C_{30}H_{48}$: triterpènes, etc.

I.1.2. Propriétés biologiques des H.Es

Depuis l'Antiquité, les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme pour les médicaments et la parfumerie [4]. Les H.Es ont été considérées comme les agents antimicrobiens et antioxydantes les plus efficaces présents dans ces plantes. Les qualités antimicrobiennes et antioxydantes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis longtemps. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes et antioxydantes sont dues à la fraction des H.Es contenue dans les plantes. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances [5]. Depuis deux

Chapitre I : Etude théorique

décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des H.Es dans le domaine alimentaire. Les effets antimicrobiens et antioxydantes de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les H.Es, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et antioxydantes pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains", ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant, des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne et antioxydante. Les H.Es ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne et antioxydante est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs [5]. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

I.1.3. Les méthodes d'analyses des H.Es

Une parfaite connaissance de la composition chimique des H.Es est nécessaire aux industriels pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces H.Es constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des H.Es reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques [6]. Leur analyse comporte plusieurs séquences :

- la première séquence consiste à les analyser, tout d'abord, par Chromatographie en Phase gazeuse (CPG); cette technique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à

Chapitre I : Etude théorique

les analyser par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, couramment la spectrométrie de masse (SM). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention I_r et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'H.E [6].

- une deuxième séquence est mise en œuvre lorsque l'H.E est complexe ou qu'elle contient des composés pouvant coéluer ou encore lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche. Un fractionnement de l'H.E est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions obtenues sont ensuite analysées de la façon décrite dans la première séquence. Cette étape est à privilégier lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétones...).

- enfin, une troisième séquence peut être mise en œuvre lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'H.E sont inconnus des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatives telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) ou encore la Chromatographie en phase gazeuse préparative (CPG). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN- ^1H) et du carbone-13 (RMN- ^{13}C), SM, IRTF, etc (figure I.1) [6].

Chapitre I : Etude théorique

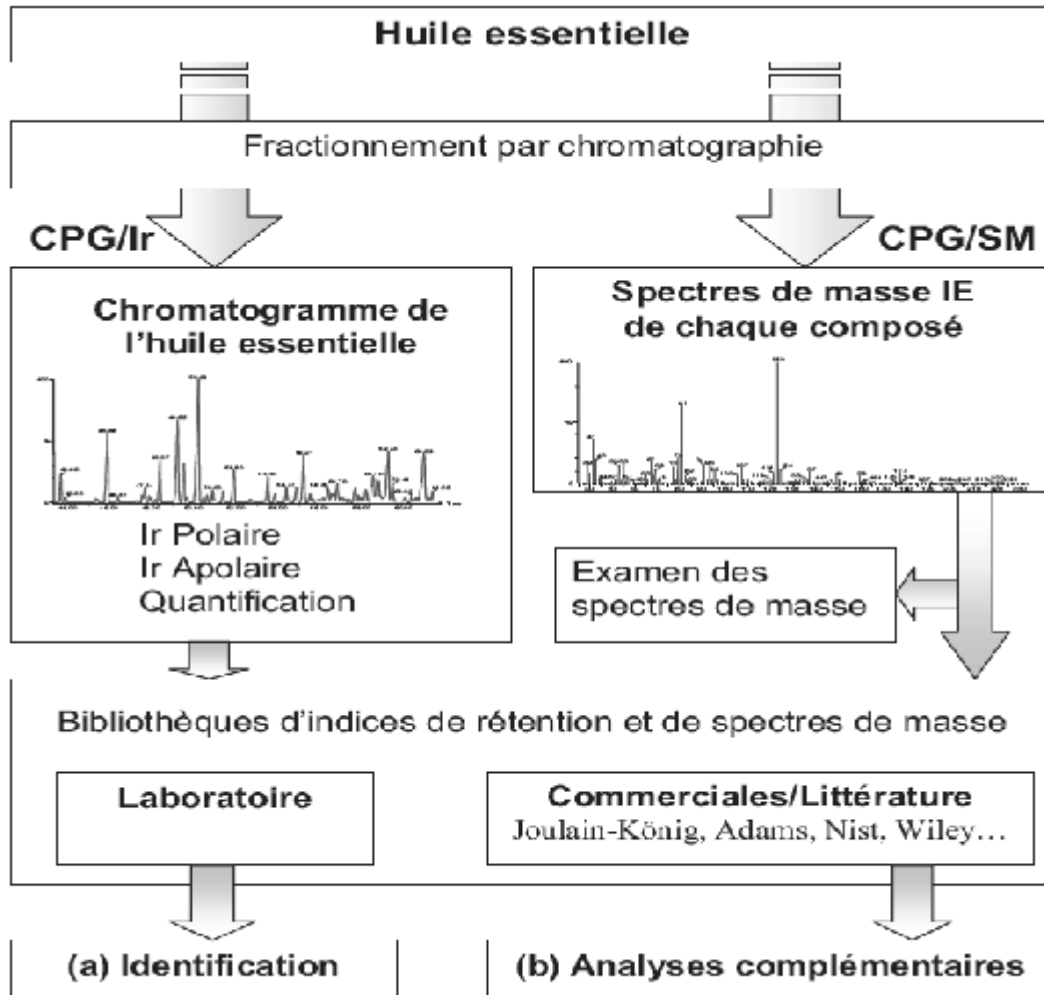


Figure I.1 : Identification des constituants d'une H.E par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM

I.2. Activité antioxydante

I.2.1. Définition d'un antioxydant

Le progrès de l'oxydation a comme conséquence la détérioration complète des aliments. La dégradation oxydative des constituants de nature lipidique de nos aliments présente des inconvénients à la fois aux plans organoleptique, nutritionnel, fonctionnel, économique et hygiénique [7-8]. La lutte contre l'oxydation des lipides représente donc un enjeu considérable pour les industriels alimentaires. Pour supprimer ou ralentir l'oxydation des lipides, deux voies sont envisageables : tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxydation et/ou trouver un réactif qui ralentit l'oxydation : c'est le rôle de l'antioxydant [9-10]. Ce dernier est défini

Chapitre I : Etude théorique

comme une substance qui, à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation [11].

L'anhydride sulfureux et ses combinaisons minérales ont été utilisés comme premiers antioxydants, mais ces composés possèdent un caractère fortement allergisant [12]. On trouve aussi d'autres composés comme le gallate de propyle, le gallate d'octyle, le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT) et le tert-butylhydroquinone (TBHQ) [13]. Le plus grand avantage de ces derniers est lié à leurs coûts bas d'une part, leurs propriétés chimiques et technologiques bien étudiées, qui satisfont dans la plupart des cas la demande des producteurs d'autre part. En revanche, le BHA et le BTH ont été avérés cancérigènes [14-15]. Le TBHQ a été interdit au Japon, au Canada et en Europe. De même, le BHA a été également éliminé de la liste des composés GRAS [16]. Par conséquent, il y a grand intérêt mondial pour la recherche de nouvelles sources d'antioxydants, naturelles et sûres.

I.2.2. Activités biologiques des plantes aromatiques

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens. Les H.Es quant à elles, ainsi que les extraits aromatiques ont été utilisés pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l'Egypte ancienne, les techniques de l'embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l'H.E, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les vieux ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l'H.Es étaient les principes actifs qu'on peut retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives. Dans les ouvrages les plus récents, l'utilisation des H.Es dans l'aromathérapie laisse entrevoir une perspective d'alternative aux médicaments de synthèse. Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes :

- * Fongistatique
- * Insecticide
- * Nématicide
- * Herbicide
- * Bactériostatique
- * Antioxydante

Chapitre I : Etude théorique

Les H.Es possèdent de nombreuses activités biologiques [17]. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens. 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. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les H.Es ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires [17].

Les H.Es les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan lavande, menthe, romarin, sauge, etc...L'H.E de thym d'Espagne (*Thymus capitatus*) est souvent rapporté comme étant parmi les huiles les plus actives. Dans notre étude, nous n'allons-nous intéresser qu'à deux activités biologiques : les activités antioxydantes et antifongiques [18].

1.3. Activité antifongique

En général, les méthodes d'évaluation de l'activité antifongique sont rapides, moins coûteuses et faciles à réaliser. Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les H.Es ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire [19]. Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique : Phénols ›Alcools ›Aldéhydes ›Cétones ›Ethers ›Hydrocarbures

Chapitre II : Étude botanique de *C. arvensis* L & *Carthamus* sp L

II.1. Généralité sur la famille des Astéracées

Les Astéracées est une importante famille de plantes dicotylédones (principalement herbacées) appartenant aux sous classes des astérides (Asteridae). Auparavant, les astéracées étaient connues sous le nom de composacées (compositae), On distingue 4 sous familles :

- Les tubiflores ou carduacées
- Les liguliflores ou chicoracées
- Les labiatiflores
- Les radiées ou corymbifères [20].

Elle est largement utilisée en médecine populaire pour guérir un bon nombre de maladies on citera :

- *Centaurea chamaerhaponiticum* bail, les racines fraîches ou sèches en décoction sont utilisées dans le traitement des maladies du foie, l'estomac, et des intestins [21].
- *Anacyclus valentinus* L. possède une action anesthésiante et anti-inflammatoire, sédative et calmante [22].
- l'artichaut est l'ami du foie, il permet à ses cellules de régénérer



Figure II.1 : Les astéracées

II.1.1. Morphologie

Les Astéracées peuvent être annuelles, bisannuelles ou vivaces, ont la particularité d'avoir des fleurs réunies en capitule c'est-à-dire serrées les uns à côté des autres, placé à l'extrémité d'une tige entourée d'une structure formées par des bractées florales appelée involucre, les fleurs sont caractérisées par leurs anthères soudées. Le fruit des « Astéracées » est un akène généralement surmonté d'un Pappus (une

Chapitre II : Étude botanique de *C. arvensis* L & *Carthamus* sp L

aigrette de soies correspondant au calice persistant), les fleurs sont alternes, simples, ais chez certaines espèces elles peuvent être divisées se présentent sous deux formes:

- Des languettes, ou ligules, dans lesquelles, les équivalents de pétales sont soudés, généralement par cinq, parfois par trois, reconnaissable seulement aux deux dents de la languette, et ou un pétale prédomine.
- Des tubes terminés par des lèvres, imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes [23].

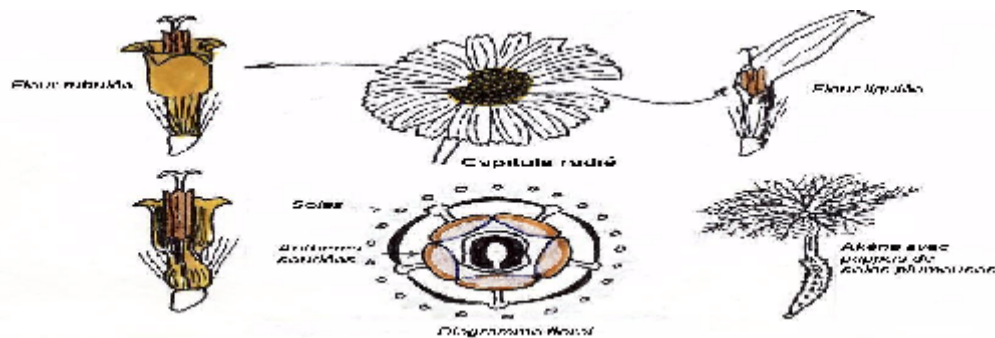


Figure II.2 : Morphologie des Astéracées

II.1.2. Distribution

La famille des Astéracées avec près de 1500 genres et pas loin de 26.000 espèces dont 750 endémiques est la seconde en importance, derrière celle des Orchidacées. Elle est présente dans toutes les régions du monde principalement dans les régions tempérées et à l'exception des pôles [20].



Figure II.3 : Répartition géographique mondiale des Astéracées

II.2. Le genre *Carthamus*

Le genre botanique *Carthamus* voisine du chardon présent dans nos contrées. Originaire de moyen-orient, le mot « carthame » découle du mot arabe « Kurthum » qui signifie « teinte » c'est un membre de la tribu des cynarées, sous-famille Tubuliflores, et de la famille des Astéracées.

Il comprend 25 espèces et sous-espèces [24].

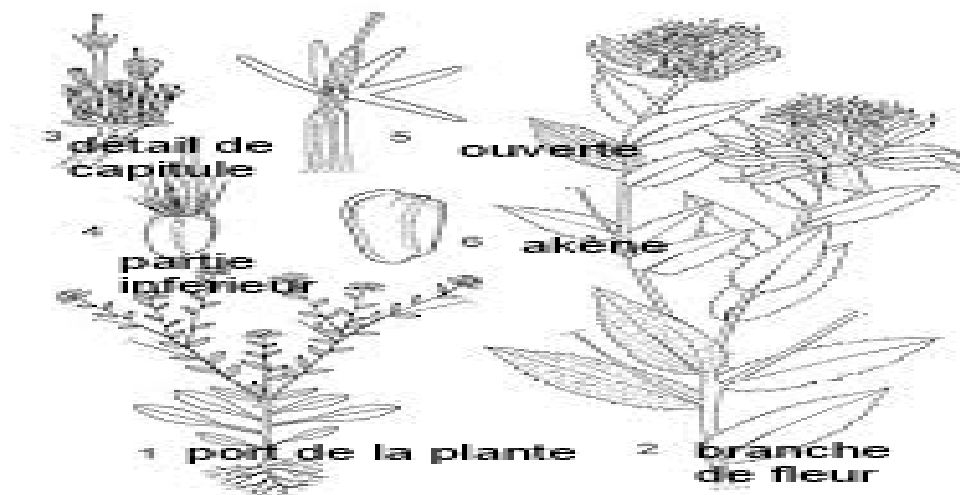


Figure II.4 : Morphologie des *Carthames*

Capitules homogames, multiflores. Fleurs tubuleuses, égales, tous hermaphrodites. Involucre globuleux ou ovoïde, complété par un involucre supplémentaire constitué par des bractées foliacées et très épineuses. Involucre proprement dit à bractées imbriquées sur plusieurs rangs, acuminées et inermes, ou les intérieures comportant un appendice fimbrié ou entier et les extérieurs pectinées-ciliées. Réceptacle plan, très paléacé.

Akènes quadrangulaires ou (rarement) trigones, à angles saillants ou non aigrette nulle ou constituée par des paillettes ou des soies non plumeuses (différence avec *Carduncellus*), simple ou double [23].

II.2.1. *Cartamus* sp L

Cette espèce fait partie de la famille des Astéracées. Sa période de floraison s'étale de Mai à Juillet, c'est une plante méditerranéenne semblable au chardon [24].

II.2.2. Classification systématique [23]

La place de *Carthamus* sp L dans la taxonomie botanique est la suivante :

Tableau II.1: Position taxonomique de *Carthamus* sp L

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Cynarées
Sous-embranchement	Centaureines
Famille	Astéracées
Sous-famille	Carduoidées
Genre	<i>Carthamus</i>
Espèce	<i>Carthamus</i> sp L

II.2.3. Description

C'est une plante annuelle ou vivace le plus souvent très épineuse avec une hauteur de 30 à 150 cm. Une tige dressée et velue. Des feuilles coriaces luisantes, avec des supérieures dentées et piquantes et les fleurs : bleues [23].



Figure II.5 : Racines de *Carthamus* sp

II.2.4. Domaines d'application et intérêt en phytothérapie

Les enquêtes menées auprès des herboristes dans le domaine de la phytothérapie, elle est traditionnellement utilisée comme un cicatrisant contribue à guérir les brûlures en outre contre les inflammations articulaires et comme lotion pour la guérison du collant et aussi pour les cancéreux. Dans le domaine culinaire, les racines sont ajoutées en mélange avec d'autres épices au plat traditionnel et pour la femme ayant accouché.

Chapitre II : Étude botanique de *C. arvensis* L & *Carthamus* sp L

II.2.5. Distribution

Cette espèce préfère les endroits ensoleillés, elle est d'origine de sud-ouest d'Asie mais elle se trouve dans le nord d'Afrique, l'Europe et l'Amérique [24].



Figure II.6 : Répartition de *Carthamus* sp dans le monde

II.2.6. Liste des *Carthamus* recensées en Algérie [23].

Tableau II.2 : Liste de quelques espèces de *Carthamus* d'Algérie

Espèces	Nom vernaculaire	Synonyme(s)
<i>C. lanatus</i> L		<i>Kentrophyllum lanatum</i> L
<i>C. arborescens</i> L		<i>Kentrophyllum arborescens</i> L
<i>C. helenioides</i>	Zitset	
<i>C. strictus</i>		<i>Onobroma stricta</i> pomel

II.2.7. Travaux scientifiques réalisés sur *Carthamus* sp

L'étude bibliographique minutieuse menée sur les espèces de *Carthamus*, révèle que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude sur les H.Es. Ceci nous a incité à nous intéresser de près à l'étude de la composition chimique de son H.E 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. 3. Le genre *Calendula* [23]

Calendula est un genre d'environ 20 espèces de plantes herbacées annuelles ou vivaces de la famille des Astéracées, originaires de la région méditerranéenne et de

Chapitre II : Étude botanique de *C. arvensis* L & *Carthamus* sp L

Macaronésie. Feuilles alternes, Capitules hétérogames, radiés. Fleurs hermaphrodites généralement stériles. Bractées de l'involucre sur 1-2 rangs. Réceptacle nu. Anthères aiguës ou acuminées à la base mais non caudées. Fleurs hermaphrodites stériles à style entier ou un peu bilobé; celui des fertiles à 2 branches tronquées et poilues au sommet. Akènes de forme variable mais sans aigrette. Un seul genre local: *Calendula* L.



Figure II.7 : Morphologie *Calendula*

II.3.1. *C. arvensis*

C.arvensis L est une plante méditerranéenne de la famille des astéracées qui fleurisse toute l'année son nom vernaculaire arabe est Djemra alors que son nom berbère est Azouiout [25]

II.3.2. Classification systématique [23]

Tableau II.3 : Position taxonomique de *C.arvensis* L

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Dicotylédones
Famille	Astéracées
Genre	<i>Calendula</i>
Espèce	<i>Calendula Arvensis</i> L

II.3.3. Description

C. arvensis L ou souci des champs est une plante annuelle herbacée de 30 à 50 cm d'hauteur, la tige dressée et ramifiée, les feuilles sont alternées, oblongues lâchement dentées ou entières, les fleurs jaunes ou oranges vifs, simples ou pleines pouvant atteindre 5 à 6 cm de diamètre, les akènes extérieurs arqués, épineux sur le dos les intérieurs roulés en anneau, lisses ou épineux. Capitules assez grands, solitaires, terminant les rameaux. [25] lieux cultivés, champs, vignes.



Figure II.8: *C. arvensis* L

II.3.4. Domaines d'application et intérêt en phytothérapie

Comme application médicinales : les fleurs possèdent des propriétés dépuratives anti spasmodique et stimulante ; sa tisane agit pour atténuer les spasmes gastriques et intestinaux ; quant aux feuilles leur sucs calme les vomissements et les ulcérations internes et elles sont utilisées aussi pour effacer les verrues, les durillons et les cors [26], elle est actuellement utilisée en phytothérapie, on trouve différentes préparations sur le marché, notamment les pommades pour bébé , huile de massage , crème protectrice pour le visage et des savons .

II.3.5. Distribution

Elle est très répondeue dans le centre et sud d'Europe l'Afrique du nord et le sud-ouest d'Asie [25].



Figure II.9: Répartition de la *C. arvensis* dans le monde

II.3.6. Liste des *Calendula* recensées en Algérie [23]

Tableau II.4 : Les espèces *Calendula* de l'Algérie

Espèces	Synonyme(s)
<i>C. aegyptiaca</i>	<i>C. subinermis</i> <i>C. gracilis</i> <i>C. Cristal-galli</i> <i>C. malvaecarpa</i> <i>C. echinata</i> <i>C. platycarpa</i> <i>C. malvaecarpa</i>
<i>C. arvensis</i> L	<i>C. parvijlora</i> <i>C. stellata</i> <i>C. sicula</i>
<i>C. bicolor</i>	
<i>C. monardi</i>	<i>C. undulata</i> <i>C. officinalis</i>
<i>C. fulgida</i>	
<i>C. tomentosa</i>	<i>C. incana</i>
<i>C. Suffruticosa</i>	<i>C. stellata</i>

II. 3.7. Travaux scientifiques réalisés sur le genre *Calendula*

De précédentes investigations chimiques du genre *Calendula* ont été étudiées et ont révélé la présence de plusieurs types de composés.

La composition des H.Es des tiges, feuilles et fleurs de *C. officinalis* obtenus par CO₂ supercritique ont été déterminées par CPG et CPG / SM. Les principaux composés de toutes les huiles étudiés étaient α -cadinol (de 11,7 à 29,1%), δ -cadinène (de 3,2 à 20,3%), γ -cadinène (01.05 à 11.04%) et cadine-3,9-diène (de 0,4 à 11,2%). Les échantillons d'huile obtenues à partir des extraits de CO₂ ont été trouvés à être plus complexes contenant un gurjunene, β -caryophyllène, β -gurjunene, cis-Muurola-4 (14)-5-diène et un humulène [25].

Il est à noter que l'équipe **Khalid, K.A et al, (2010) [26]**, ont travaillé sur le rendement de H.E de *C. officinalis* et ont montré que l'irrigation avec de l'eau

Chapitre II : Étude botanique de *C. arvensis* L & *Carthamus* sp L

saline a augmenté la teneur H.E et ses principales composantes (α -cadinol, γ et Δ -Cadinène).

Chalchat.J.C et al, (2006) [27] ,ont obtenu un faible rendement de l' H.E, 66 éléments ont été identifiés par CPG-SM, alcools principalement sesquiterpéniques de l'huile de *C. officinalis* le α -cadinol était le constituant principal (environ 25%). L' H.E de la plante entière était différente de celle des fleurs par la présence d'hydrocarbures monoterpéniques, en plus des alcools.

En **2011** l'équipe de **Tugba Ercetina et al., (2011) [28]**, ont réalisé des travaux sur les extraits des feuilles et fleurs de *C. arvensis* et *C. officinalis* et ils ont montré que les extraits de méthanol et d'éthyle d'acétate de fleurs de *C. arvensis* avait la plus forte activité de piégeage des radicaux DPPH .

L'étude effectuée sur les H.Es de *C. arvensis* en corse durant l'année **2010** par l'équipes de **Paolini et al., (2010) [29]**, révèle deux principaux groupes de composés identifiés en fonction de la quantité de composés sesquiterpéniques (hydrocarbures et les alcools) et les caractéristiques du sol. La variation saisonnière (hiver vers printemps) dans les concentrations de deux principaux composés (δ -cadinene et α -cadinol) au cours de la période de floraison a été observée. Ils ont démontré également que l'H.E collective de *C. arvensis* était riche en sesquiterpènes et les principaux composés étaient: le δ -cadinene (15,1%) et α -cadinol (12,4%).

En 2012 en Turquie[30] , une équipe de chercheure a élaboré des travaux sur H.E de *C. arvensis* et ils ont obtenu que les composés majoritaires étaient selinene (16,0%) β -pinène (12,3%), (Z)- α -santalol (8,2%), δ -amorphene (8,0%) et (Z)-sesquilavandulol (4,8%) et ils ont prouvé que l'extrait méthanolique a une activité antibactérienne modérée contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* et une bonne activité contre *Mycobacterium* .

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

III.1. Criblage phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique réalisés sur les extraits des racines de *C. arvensis* et de la partie aérienne et de *Carthamus sp* sont consignés dans le (Tableau III.1). Au cours de ces tests, deux solvants de polarités différentes (eau, éthanol) ont été utilisés. Les différentes méthodes sont exposées dans la partie expérimentale.

Tableau III.1: Prospection phytochimique des extraits de solvant de *C. arvensis* et de *Carthamus sp*.

Réactifs	Famille de composés	Résultats	
		<i>C. arvensis</i>	<i>Carthamus sp</i>
Mayer	Alcaloïdes	+	+
Wagner		-	+
FeCl ₃	Tanins	+	+
Fehling	Composés réducteurs	-	+
Indice de mousse	Saponosides	+	+
Mg ⁺ , HCl	Flavonoïdes	+	+
Amidon	Amidons	-	-
Bonträger	Anthocyanosides	-	+
Anhydride acétique + H ₂ SO ₄	Stéroïdes	+	+
NH ₄ OH 10%	Coumarines	-	-
Acide acétique + H ₂ SO ₄ +Fe	Hétérosides	-	-

D'après les résultats des tests phytochimiques obtenus sur les deux espèces, nous avons pu déceler différentes familles de composés chimiques co-existantes dans les deux plantes étudiées par de simples réactions de coloration et de précipitation.

D'après le tableau III.1, nous avons observé que les extraits de solvant des deux plantes ont montré une inférence positive pour le test des tanins, flavonoïdes, stéroïdes et les alcaloïdes. Pour les saponosides, la couche de mousse a été montrée que dans l'extrait aqueux. Cependant le test des coumarines et des hétérosides produit

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

une inférence négative. En outre les sucres réducteurs sont présents dans les deux extraits de *Carthamus sp* ainsi que les Anthocyanosides.

Les résultats montrent que ces deux plantes sont d'une grande importance, elles sont riches en composés phénoliques tel que les tanins et les flavonoides qui sont des substances reconnues pour leur propriété antioxydante [31]. Les tanins sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines avec une tendance à l'imperméabilité des couches externes et la protection des couches sous-jacentes [32], leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus pourraient expliquer l'utilisation traditionnelle des écorces de *carthamus* dans le traitement des brûlures et les inflammations articulaires et comme lotion pour la guérison du colon et aussi pour les cancéreux. Dans le domaine culinaire, les racines sont ajoutées en mélange avec d'autres épices au plat traditionnel et donné à boire à la femme après son accouchement.

III.2. Composition chimique de l'H.E des parties aériennes de *C. arvensis*

Le matériel végétal a été récolté en Mai 2013, dans la localité de Ghazaouet (Tlemcen) où elle pousse en abondance. Il a été hydrodistillé durant 5 heures dans un appareillage de type Clevenger avec un rendement de 0.22% par rapport à la masse de végétal frais. L'H.E des parties aériennes est analysée par CPG-Ir et CPG/SM-IE.



Figure III.1: Montage d'hydrodistillation de type clevenger

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

Ces analyses ont permis d'identifier 32 composés (tableau III.2) représentant 92.5 % de la composition chimique de l'H.E. Les identifications ont été établies sur la base des bibliothèques « Arômes » propres au laboratoire de Corse.

Tableau III.2 : Composition chimique de l'H.E des paries aériennes de
C. arvensis

N ^o a	Composés	/RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	C.S	C.lit	Identification ^e
1	(Z)-hex-3-èn-1-ol	851	854	1380	0,2	tr	RI, MS
2	α -Thujène	922	923	1023	0,5	0.3	RI, MS
3	α -Pinène	936	931	1022	0,4	0.7	RI, MS
4	Sabinène	973	968	1120	0,5	0.1	RI, MS
5	β -Pinène	978	979	1110	0,3	0.1	RI, MS
6	Myrcène	987	985	1159	0,2	tr	RI, MS
7	p-Cymène	1015	1011	1265	0,3	0.1	RI, MS
8	Limonène	1023	1022	1197	0,3	0.6	RI, MS
9	γ -Terpinène	1048	1048	1241	0,1	-	RI, MS
10	(E)-Sabinène hydrate	1053	1053	1454	0,1	-	RI, MS
11	Terpinèn-4-ol	1164	1164	1590	0,5	0.2	RI, MS
12	(E)- β -Caryophyllène	1421	1418	1590	0,3	0.1	RI, MS
13	(E)- β -Farnésène	1446	1446	1660	0,3	-	RI, MS
14	α -Himachalène	1450	1450	1638	0,1	-	RI, MS
15	Allooromadendrène	1462	1456	1640	0,5	0.1	RI, MS
16	γ -curcumène	1474	1474	1685	0,5	0.1	RI, MS
17	Zingiberène	1489	1484	1715	1,1	-	RI, MS
18	Bicyclogermacrène	1494	1492	1720	0,4	0.2	RI, MS
19	β-Sesquiphellandrène	1516	1518	1762	1,5	-	RI, MS
20	Globulol	1589	1585	2066	0,8	0.4	RI, MS
21	Zingiberénol 1	1599	1594	2109	1,1	1.5	RI, MS
22	Zingiberénol 2	1613	1612	2169	32,8	-	RI, MS
23	τ-Cadinol	1632	1627	2132	8,5	0.6	RI, MS
24	τ-Muurolol	1634	1630	2103	17,1	1.2	RI, MS
25	β -Eudesmol	1644	1640	2232	0,5	-	RI, MS
26	(Z,Z)-Farnésol	1653	1653	2163	0,9	0.1	RI, MS
27	(E,Z)-Farnésol	1687	1686	2260	18,9	0.9	RI, MS
28	Heptadécane	1700	1696	1698	0,1	-	RI, MS

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

Suite							
29	α -Oxobisabolene	1719	1720	2267	2,5	-	RI, MS
30	Heneicosane	2100	2099	2101	0,4	-	RI, MS
31	(E)-Phytol	2114	2113	2591	0,3	0.4	RI, MS
32	Eicosane	2200	2201	2200	0,5	-	RI, MS
Taux d'identification %					92,5		
Monoterpènes hydrocarbonés					2.6		
Monoterpènes oxygénés					0.6		
Sesquiterpènes hydrocarbonés					4.7		
Sesquiterpènes oxygénés					83.1		
Diterpènes oxygénés					0.3		
Composés non-terpéniques					1.2		

^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^b Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa). ^c Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa). ^dRIa : indices de rétention sur colonne polaire Rtx-RIp. ^e RI : indices de rétention; MS : spectre de masse en mode impact électronique. CS : Composition chimique en % de *C. arvensis* de la station de Ghazaouet ; C. lit : Composition chimique en % des composés en commun de *C. arvensis* rapporté dans littérature [29]

Parmi les composés identifiés, huit composés sont des monoterpènes hydrocarbonés (2.6 %), 2 monoterpènes oxygénés (0.6 %), 8 sesquiterpènes hydrocarbonés (4.7 %), 9 sesquiterpènes oxygénés (83.1 %), 4 composés non terpéniques (1.2 %) et 1 diterpènes oxygénés (0.3%). De l'analyse de ce tableau, il ressort pour l'H.E de *C. arvensis* de la région de Ghazaouet à une large prédominance des sesquiterpènes oxygénés. Les cinq composés majoritaires sont le zingiberenol 2 (32.8 %), (E,Z) farnesol (18.9 %), τ -muurolol (17.1 %), τ -cadinol (8.5 %) et α -oxobisabolene (2.5 %) qui représentent 79.8 % de la totalité de la composition chimique (tableau III.2). Ils sont suivis de deux sesquiterpènes hydrocarbonés : β -sesquiphellandrene (1.5 %) et zingiberene (1.1 %). Il est à noter que ces composés n'ont jamais été trouvés dans l'H.E de *C. arvensis* rapporté dans la littérature [29].

Il est à remarquer que les composés majoritaires des 25 échantillons décrits dans la littérature [29], sont des composés oxygénés. Parmi les sesquiterpènes oxygénés, on relève onze alcools qui sont représentés principalement par germacradien-11-ol (2.6-24.9 %), 4-epi-cubebol (2.4-15.2 %), 1-epi-cubenol (5.5-16.3 %) et α -cadinol

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

(27.8-38.3 %). Les autres composés majoritaires sont des sesquiterpènes hydrocarbonés.

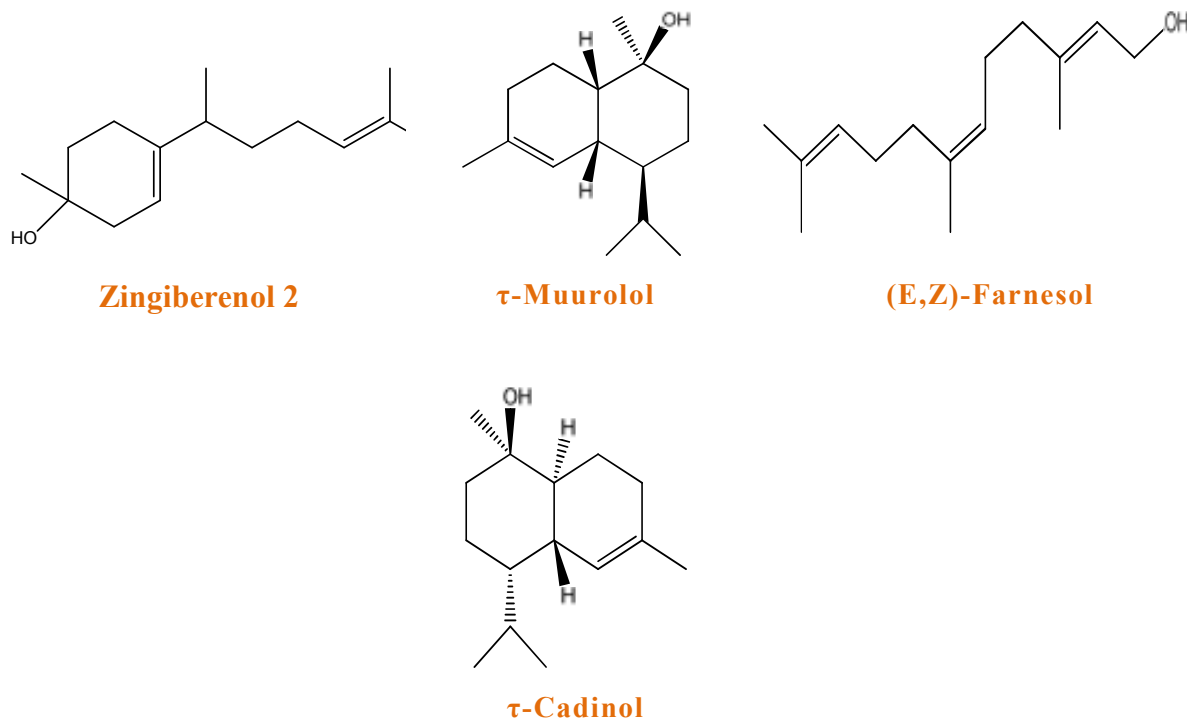


Figure III.2: Composés majoritaires de l'H.E de *C. arvensis*

Au regard du travail réalisé, on peut conclure que l'H.E de *C. arvensis* est assez particulière et différente de celle reportée par Paolini et al, (2010) [29]. Le composé majoritaire est le zingiberenol 2, un alcool sesquiterpénique qui est présent avec un pourcentage élevé (> 30%) (Figure III.3).

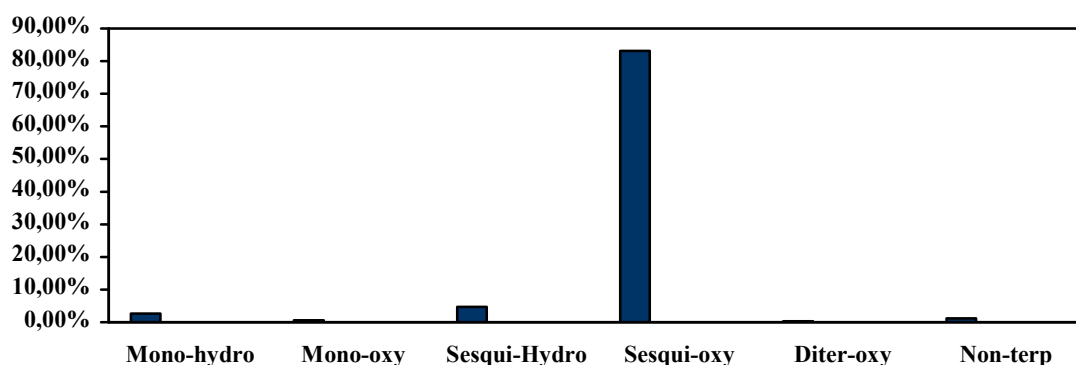


Figure III.3: Principaux familles de composés de *C. arvensis*

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

Cette différence, est probablement liée aux facteurs environnementaux tels que l'ensoleillement ou plus particulièrement la composition du sol, comme le suggère certains travaux reliant la teneur en sesquiterpènes hydrocarbonés des H.Es, à la minéralisation du sol sur lequel poussent les végétaux [33,34].

III.3. Composition chimique de l'H.E des racines de *Carthamus sp*

La plante a été récoltée en mois d'Avril dans la localité de Beni Snous (Tlemcen) où elle pousse en abondance. Elle a été hydrodistillée durant 5 heures dans un appareillage de type Clevenger avec un rendement de 0,13% par rapport à la masse de végétal frais. L'H.E des parties aériennes est analysée par CPG-Ir et CPG/SM-IE. L'H.E de *Carthamus sp* que nous avons étudiée, est caractérisée par une prédominance des phényl propanoïdes est représentent en effet plus de 85% de la composition chimique globale (Tableau III.3).

Tableau III.3: Composition chimique de l'H.E des racines de *Carthamus sp*

No. ^a	Composés	<i>l</i> RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Racines	Identification ^s
1	Benzaldehyde	929	931	1525	0,4	RI, SM
2	NI-1	-	969	-	0,3	
3	NI-2	-	1572	-	85,2	
4	NI-3	-	1735	-	2,4	
5	NI-4	-	1790	-	5,32	
6	NI-5	-	2045	-	1,5	
Pourcentage d'identification %					95,12	

Le seul composé identifié dans l'H.E des racines de *Carthamus sp* est le benzaldehyde (0.4%). Cependant, les cinq autres composantes de l'huile des racines de *Carthamus sp* sont restées non identifiées. D'autre part, le composé inconnu de l'huile **NI-2** (85.2%) a été identifié en utilisant les informations obtenues à l'aide des données conjointes de la spectroscopie de masse, de la RMN ¹H, RMN ¹³C et des techniques de la RMN à deux dimensions (HSQC et HMBC) ainsi que la base de données des déplacements chimiques de la littérature.

III.4. Identification du composé majoritaire par RMN

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux sont présentés dans le tableau III.4. Le spectre RMN ^1H est représenté par la figure III.4 et celui du spectre RMN ^{13}C sur la figure III.5 et l'expérience HSQC et HMBC qui en découle sont représentées sur les figures III.6 et III.7.

Le spectre RMN ^1H montre dans la région des champs forts un méthylène caractéristique d'une substitution en C-7 (3.84 ppm, s). Il indique également deux doublets de doublet à 6.36 et 6.50 ppm attribuables aux protons furano C-11 et C-12. Entre 7.2-7.4 ppm apparaît un massif correspondant aux 5 protons aromatiques et un CH furano qui corrélient avec le carbone en C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 et C-13 (figure III.4 et tableau III.4).

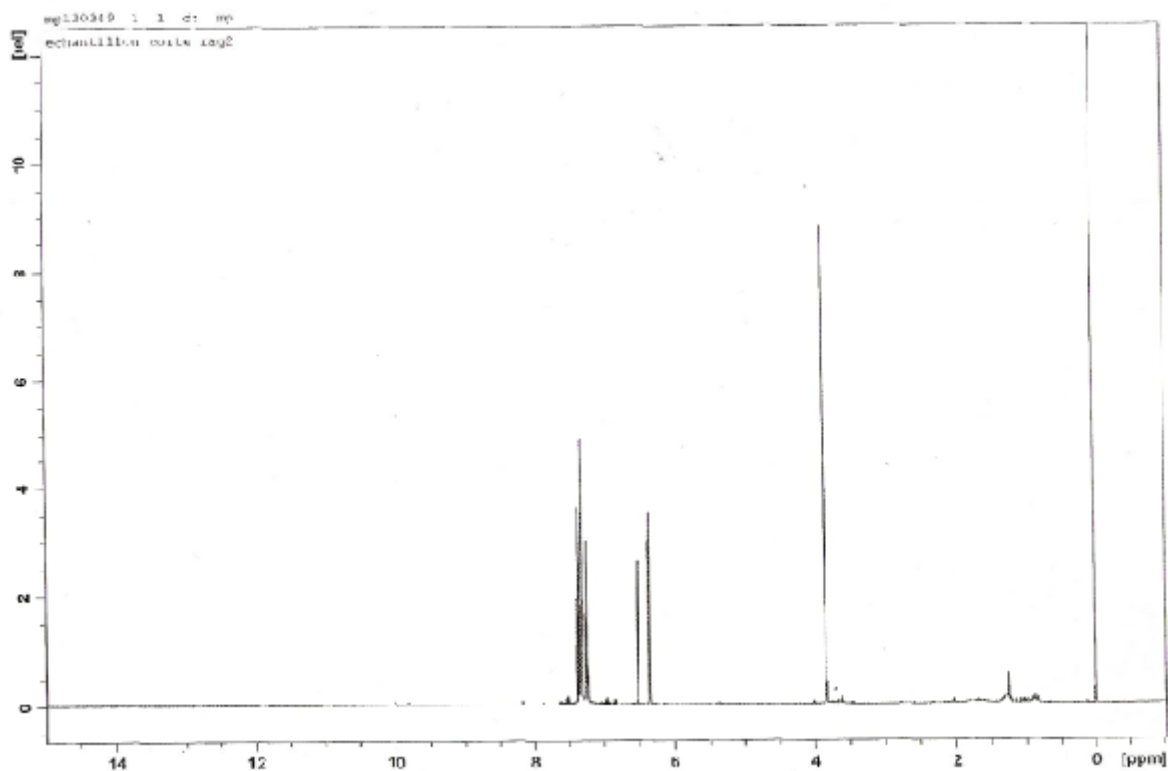


Figure III.4: Spectre RMN ^1H

Tableau III.4 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ^1H du composé **NI-2**

Protons	δ ppm [35]	δ ppm (RI)
1		7.2 (d, 1H, CH aromatique)
2		7.38 (dd, 1H, CH aromatique)
3	7.2-7.4	7.34 (dd, 1H, CH aromatique)
4	(6H, m, CH phényle +	7.38 (dd, 1H, CH aromatique)
5	CH furano)	7.2 (d, 1H, CH aromatique)
7	3.82	3.84 (2H, s, CH ₂)
11	6.34	6.36 (1H, dd, CH furano)
12	6.34	6.50 (1H, dd, CH furano)
13		7.4 (1H, d, CH furano)

d : doublet ; s : singulet ; dd : doublet de doublet

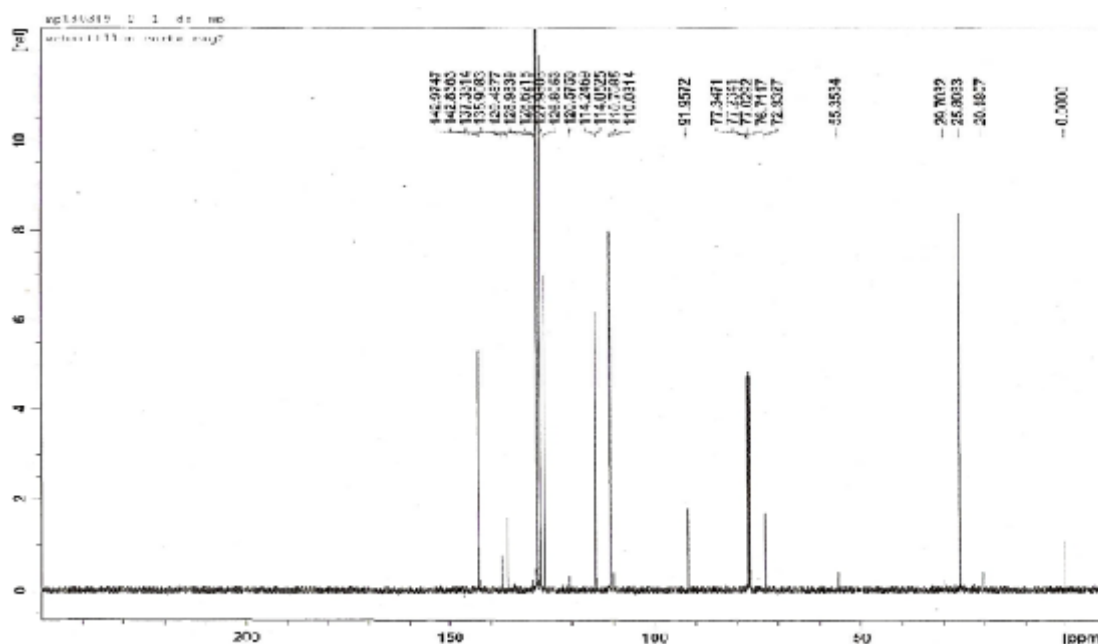


Figure III.5 : Spectre RMN ^{13}C

L'examen du spectre de RMN du carbone-13 et le DEPT du composé **NI-2** permet d'observer

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

13 pics (tableau III.5 et figure III.5):

- 11 carbones secondaires δ ppm : 129.48 (C-1), 128.61 (C-2), 126.80 (C-3), 127.97 (C-4), 128.97 (C-5), 25.80 (C-7), 77.34 (C-8), 91.9 (C-9), 137.33 (C-10), 110.70 (C-11), 114.03 (C-12),

- 1 carbone tertiaire δ ppm : 135.90 (C-6),

- 1 carbone primaire δ ppm : 142.83 (C-13)

Ces données, en conjonction avec la valeur du pic moléculaire observé en SM ($m/z = 182$) suggèrent la formule brute de type $C_{13}H_{10}O$.

Tableau III.5: Comparaison des données spectroscopiques RMN ^{13}C du composé NI-2

Carbones	δ ppm [35]	δ ppm (RI)
1	128.6 (2C, Phényle)	129.48 (1C, phényle)
2		128.61 (1C, phényle)
3		126.80 (1C, phényle)
4	127.9 (2C, Phényle)	127.97 (1C, phényle)
5		128.97 (1C, phényle)
6	135.9	135.90 (1C, phényle)
7	25.7	25.80 (1C, CH ₂)
8	72.9	77.34 (1 C, c \equiv c)
9	91.9	91.9 (1C)
10	137.3	137.33 (1C)
11	110.70	110.70 (1C, CH)
12	114.2	114.03 (1C, CH)
13	142.9	142.83 (1C, CH)

Les résultats de corrélation entre les différents protons d'une molécule, entre protons et carbones (HSQC, HMBC), fournissent des renseignements précieux sur la structure moléculaire et facilitent considérablement l'analyse structurale.

L'attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones (1H et ^{13}C) a été réalisée par utilisation de séquences de RMN 1D et 2D (Corrélations proton-carbone HSQC et proton-carbone longue distance HMBC) et ne présente pas de difficulté particulière (Tableau III.6, et figure III.6, III.7).

Chapitre III : Extraction et caractérisation des H.Es

Tableau III.6: Structure et attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones du Composé NI-2

Carbones	$\Delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\Delta^1\text{H}$ (ppm)	HMBC
CH-1	129.48	7.20	} 11,12, 1-5,6,10,13
CH-2	128.61	7.38	
CH-3	126.80	7.34	
CH-4	127.97	7.38	
CH-5	128.97	7.20	
C-6	135.90		} 12,1-5,6,10
CH ₂ -7	25.80	3.84	
C-c≡C-8	77.34		
C-9	91.90<		
C-10	137.33		
CH-11	110.70	6.36	12, 1-5,6,10,13
CH-12	114.03	6.50	11,1-5,6,10,13
CH-13	142.83	7.40	11,12, 1-5,6,10,13

δ_{H} & δ_{C} : Déplacements chimiques des hydrogènes et des carbones. *la corrélation entre les hydrogènes et les carbones qui les portent est déterminée grâce au spectre HSQC*

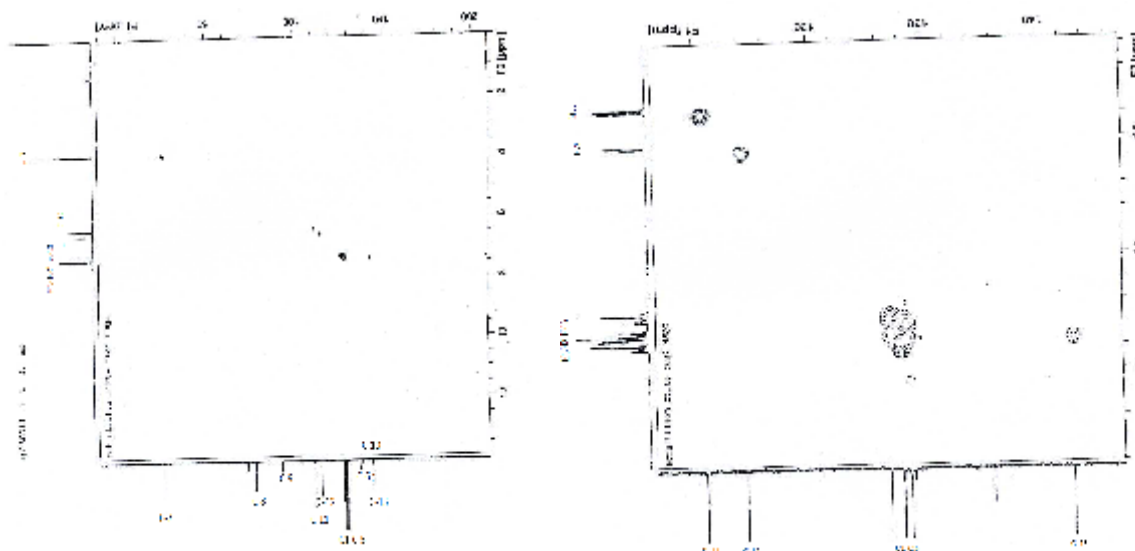


Figure III.6 : Spectre RMN 2D HSQC

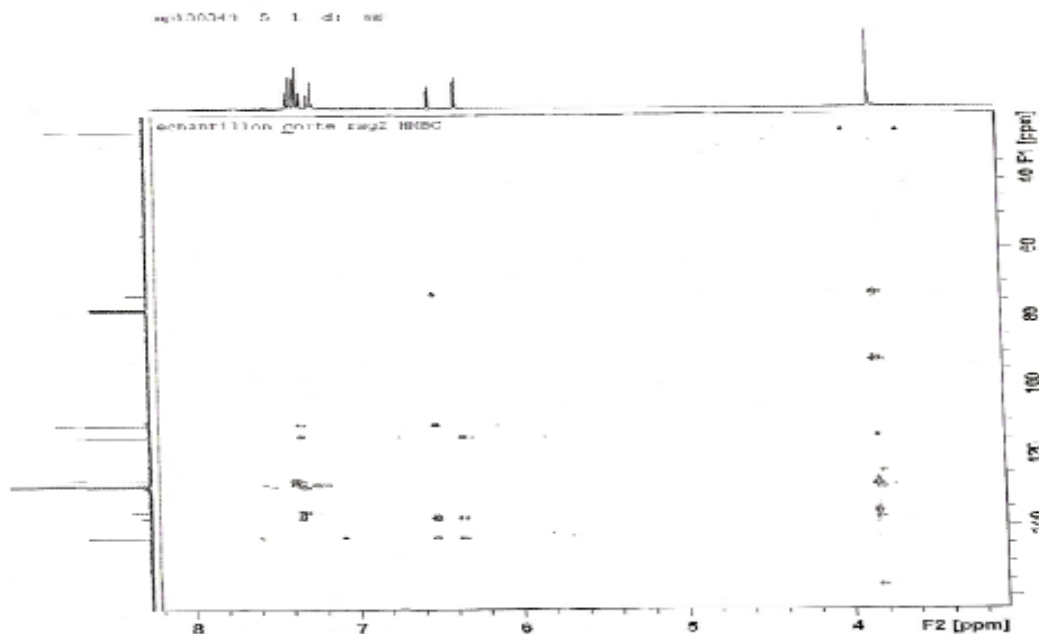


Figure III.7 : Spectre RMN 2D HMBC

Ces données associées à celles de la RMN ^1H et ^{13}C , sont identiques à celles indiquées dans la littérature pour le **Benzyl 2-furylacetylene**, un composé de formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}$ isolé de *Carlina acanthifolia* par Djordjevic et al. (2005) [35] une plante de la famille des Asteracées.

Le spectre RMN ^1H du composé NI est représenté ci-dessous :

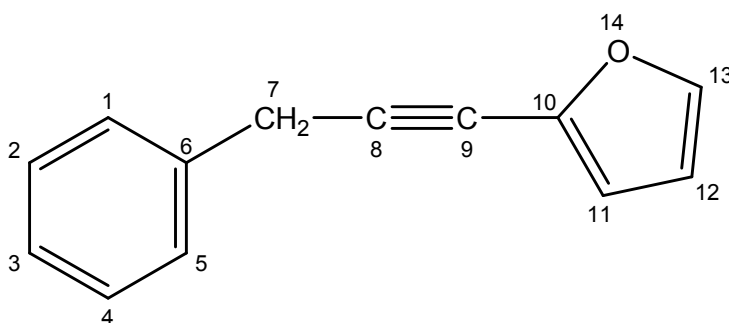


Figure III.8 : Benzyl 2-furylacetylene (Carlina oxide)
2-(3-phenylprop-1-ynyl) furan

IV.1. Activité antioxydante

IV.1.1. Introduction

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de H.E de *Carthamus sp* et *C. arvensis* a été réalisée par quatre techniques chimiques (test antioxydant par CCM, le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer et le blanchiment du β -carotène).

IV.1.2. Test antioxydant par CCM [36]

Les chromatogrammes de l'H.E de *Carthamus sp* et *C. arvensis*, révélés par une solution de DPPH à la concentration de 0.2 et 0.4 mg/mL dans le méthanol, respectivement pour l'huile de *Carthamus sp* et *C. arvensis*, présentent des tâches jaunes sur un fond violet : ceux sont des constituants, capables de réduire le radical DPPH oxydant, qui donnent des indications intéressantes pour une activité anti-radicalaire des H.Es (Figure IV.1).

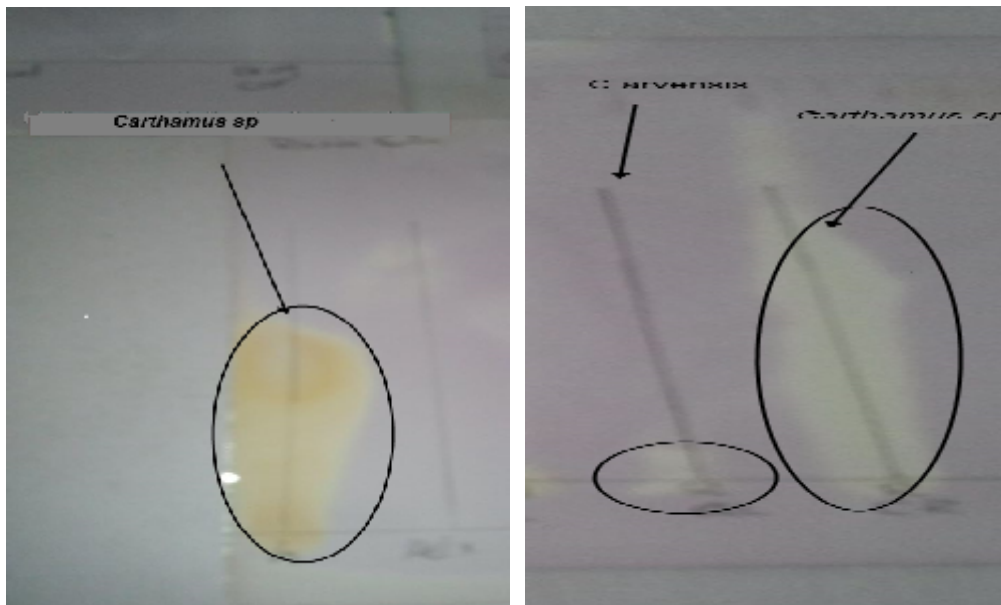


Figure IV.1: Plaque de CCM présentant des tâches à activité antioxydante avec le DPPH de l'H.E de *Carthamus sp* et *C. arvensis*

IV.1.3. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa

Chapitre IV : Partie biologique

simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée [37].

L'activité antioxydante de H.E de *Carthamus sp* et *C. arvensis* a été évaluée spectrophotométriquement suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517nm.

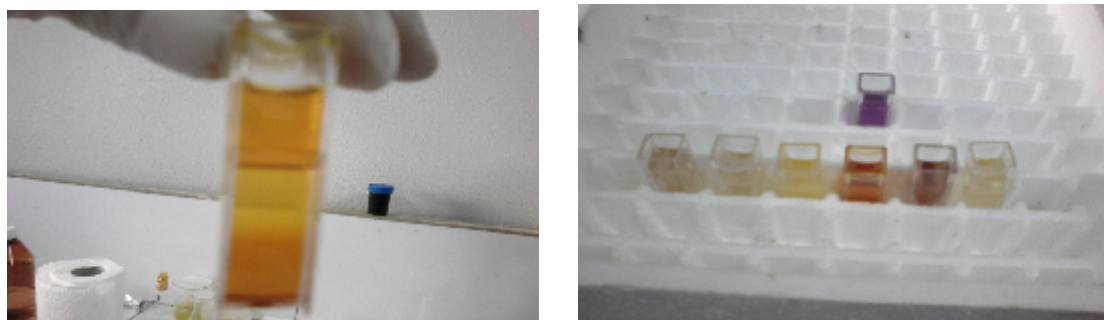


Figure IV.2 : Réduction du radical du violet au jaune par l'H.E de *Carthamus sp*

Tableau IV.1: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'H.E de *Carthamus*, *C. arvensis* et du BHT à différentes concentrations

Echantillons		Activité antioxydante				
		0.31	0.47	0.63	1.3	6.3
Huile <i>Carthamus</i>	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	36.59	51.10	59.08	66.87	74.93
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					0.44
Huile <i>Calendula</i>	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	7.8	15.1	30.2	60.5	90.7
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	17.88	22.30	22.50	45.36	56.36
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					76.25
BHT	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	2	5	10	20	25
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	18.55	30.40	35.95	55.85	64.69
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					17.36

L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin BHT (antioxydant de référence) (0.31-25 $\mu\text{g/mL}$) (Tableau IV.1). Tableau IV.1 montre l'activité de piégeage de DPPH, exprimée en pourcentage, causée par différentes concentrations des H.Es de *Carthamus* et *C. arvensis*. La plus faible activité de piégeage des radicaux (17.88 %) a été exposée par l'H.E de *C. arvensis* à une concentration de 7.8 $\mu\text{g/mL}$, alors

Chapitre IV : Partie biologique

que l'activité la plus forte (74.93 %) a été exposée par l'huile de *Carthamus sp* à une concentration de 6.3 µg/mL. Dans ce système, l'huile de *Carthamus sp* a montré une activité plus forte que l'antioxydant synthétique BHT (64.69 % à 25 µg/mL de concentration). Par conséquent, l'activité de balayage DPPH est généralement présentée par la valeur IC₅₀. Les concentrations de l'antioxydant fournissant 50% d'inhibition de DPPH à la solution d'essai (IC₅₀) ont été calculées et présentées dans le tableau IV.1. Les H.Es de *Carthamus sp* présentaient l'activité de piégeage des radicaux la plus élevée avec la plus faible valeur de IC₅₀ de 0,44 µg/mL suivie de l'H.E *C. arvensis* avec une valeur IC₅₀ de 76.25 µg/mL. En outre, l'H.E de *Carthamus* était plus élevée que celui de l'étalon (BHT avec une valeur d'IC₅₀ de 17,36 µg/mL).

IV.1.4. Test de la réduction du fer FRAP

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm [38].

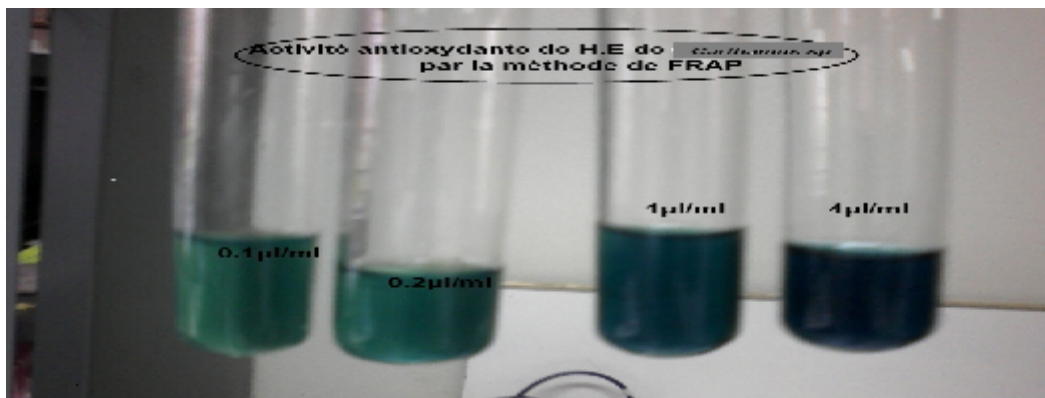


Figure IV.3: Influence de la concentration d'HE de *Carthamus sp* sur l'intensité de la couleur de réduction

L'activité antioxydante des H.Es de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Le pouvoir réducteur des deux H.Es, déterminé selon la méthode de réduction du ferricyanure de potassium, a augmenté avec une concentration croissante.

Chapitre IV : Partie biologique

Le pouvoir réducteur des H.Es des deux plantes est dose dépendante. A la concentration de 0.63 $\mu\text{g/mL}$, le pouvoir réducteur de l'H.E des racines de *Carthamus* est largement supérieur (DO=2.244) par rapport à l'H.E de *C. arvensis* et de l'acide ascorbique (Figure IV.4).

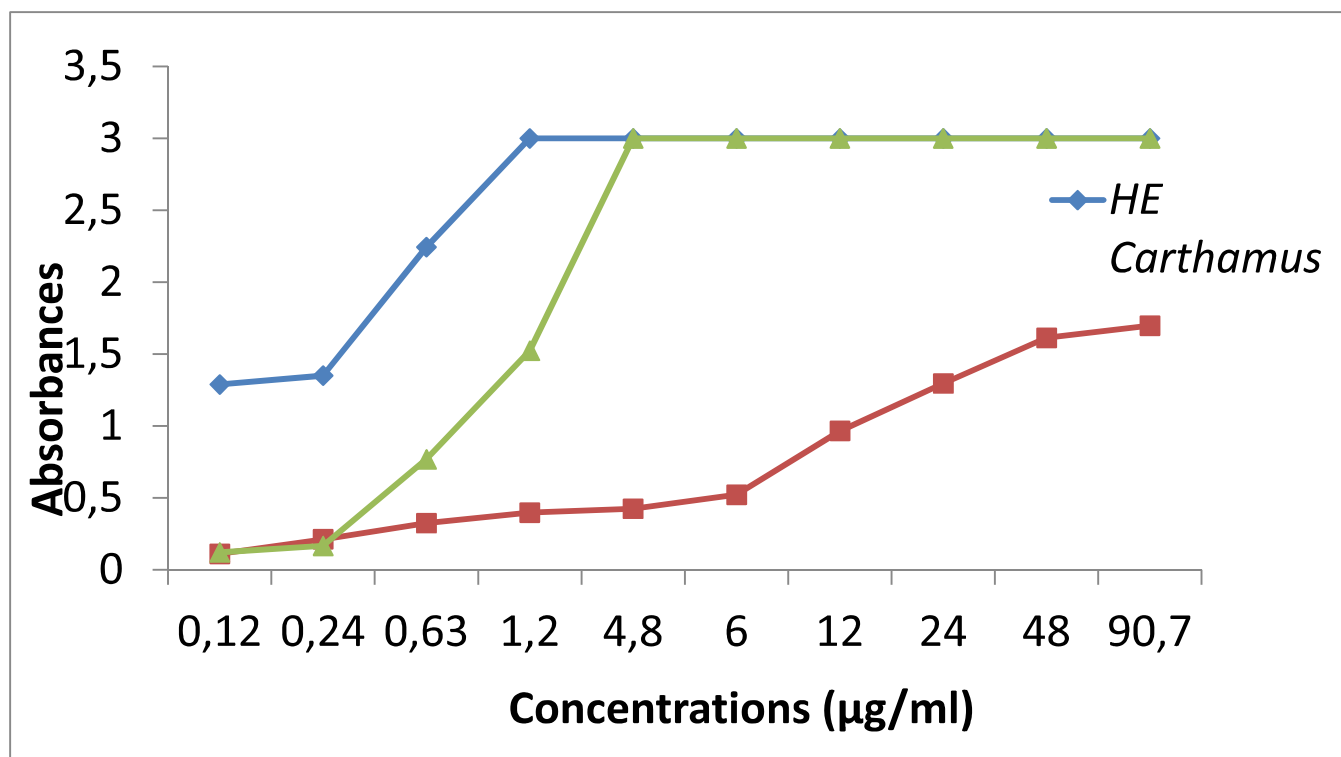


Figure IV.4: Pouvoir réducteur des H.E de *Carthamus sp*, *C. arvensis* et de l'acide ascorbique

A la concentration de 90.7 $\mu\text{g/mL}$, le pouvoir réducteur de l'H.E de *C. arvensis* est largement supérieur (DO=1.698), mais reste nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique (Figure IV.5). Ces résultats nous ont permis de conclure que l'H.E des racines de *Carthamus sp* présente une très intéressante activité antioxydante par rapport à l'acide ascorbique (3 fois supérieure).

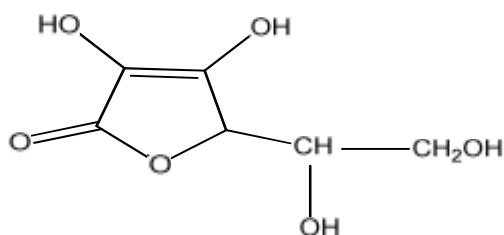


Figure IV.5.: Structure de la vitamine C

Chapitre IV : Partie biologique

Tableau IV.2: Activité antioxydante de l'H.E et le BHT pour la méthode de dosage de blanchiment de β -carotène/acide linoléique à différentes concentrations

Echantillons		Activité antioxydante relative				
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	0.06	0.12	0.25	1.3	5.1
Huile	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	48.35	76.30	>100	>100	>100
<i>Carthamus</i>	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					0.07
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	12.1	24.2	48.4	90.8	121.1
Huile	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	15.32	28.02	36.05	48.17	54.28
<i>Calendula</i>	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					100.55
	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	0.1	0.2	1.0	2.0	/
BHT	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	49.55	55.59	75.36	82.14	/
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					0.6

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β -carotène/acide linoléique est proportionnel à la concentration. L'H.E de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* inhibent le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libre (Tableau IV.2). A 0.25 $\mu\text{g/mL}$, l'H.E de *Carthamus sp* révèle une puissante activité qui dépasse les 100 %. Alors que l'huile de *C. arvensis* présente une activité inhibitrice supérieure à 50 % à 121.1 $\mu\text{g/mL}$.

Les valeurs de la IC₅₀ calculées nous ont permis d'évaluer et comparer l'efficacité des huiles par rapport au témoin (Tableau IV.2). Plus la valeur est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée. L'H.E de *Carthamus sp* constitue un bon piégeur des radicaux libres en comparant avec les autres extraits. Sa concentration IC₅₀ égale à 0.07 $\mu\text{g/mL}$ qui est dix fois plus active que le témoin BHT (IC₅₀ = 0.7 $\mu\text{g/mL}$). Concernant l'H.E de *C. arvensis*, la IC₅₀ obtenue est de l'ordre de 100.55 $\mu\text{g/mL}$. Cette activité reste inférieure au BHT.

IV.2. Activité antifongique

IV.2.1.Introduction :

En 2010-2011, 571 000 tonnes de citrus ont été produites en Algérie, qui est le 19ème producteurs dans le monde et le 3ème dans l'Union du Maghreb arabe [40]. En outre, la production d'agrumes représente une activité agricole et économique important dans le pays. Les oranges et les mandarines sont traditionnellement

Chapitre IV : Partie biologique

destinés à la consommation locale et aussi pour l'exportation. La croissance des champignons sur les fruits et légumes frais est responsable de l'altération des aliments et à de nombreuses maladies des plantes, qui conduisent à des pertes économiques importantes. *Penicillium* et *Aspergillus* sont responsables de la détérioration de nombreux aliments et provoquent la pourriture des fruits stockés endommagées par les insectes, les animaux, les premières divisions, et la récolte mécanique [41,42].

Par conséquent, la présente étude a été faite dans le but d'examiner l'activité antifongique in vivo de l'huile obtenue à partir de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* contre trois champignons phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Penicillium italicum* and *Fusarium solani*), responsables de la pourriture des oranges.

IV.2.2. Activité antifongique in vivo de l'huile de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* contre le développement de champignons de *C. sinensis*

Les résultats du test in vivo de la pourriture des agrumes par l'H.E de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* sur les trois souches, sont présentés dans la figure IV.8. Selon les résultats des tests, les H.Es ont montré une activité antifongique intéressante, il n'y avait pas de différence significative dans les diamètres des lésions chez les oranges traitées.



Figure IV.8 : Oranges pourries (temoin) qui ont été inoculées avec les pathogènes, et oranges non pourries (à droite et à gauche) dans lequel l'H.E est appliqué 30 minutes avant l'inoculation avec les pathogènes, et maintenu à 25 °C.

Chapitre IV : Partie biologique

Pour la souche *Penicillium italicum* (B), nous n'avons remarqué aucune incidence de la maladie (Figure III. 11) pendant plus de 45 jours. Cependant pour la souche *Fusarium solani* (E) et la souche *Aspergillus niger* (C), une très faible incidence de la maladie a été observée après une durée de plus de 15 jours. Alors que pour les quatre souches injectées ensemble sur les oranges traitées avec les H.Es, nous avons remarqué une incidence de la maladie après 10 jours mais beaucoup moins importante par rapport à ceux non traitées qui ont moisi complètement (Figure III.11). Par ailleurs, nos résultats prouvent l'existence d'une activité antifongique intéressante pour les trois souches. En conséquence cela pourrait être lié à la nature et la proportion des différents constituants (composés majoritaires) de H.E et de leurs effets synergiques qui ont une influence forte sur l'activité antifongique des H.Es. En plus l'activité inhibitrice peut être due aux différents modes d'action de tous les composants de H.E sur les moisissures.

IV.2.3. Activité antifongique in vitro de l'H.E de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* contre la croissance de *penicillium sp*

Les résultats des essais in vitro ont montré que l'H.E de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* avait un fort effet fongicide contre la croissance de *penicillium sp*. Les résultats sont donnés dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3. Effet de l'H.E de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* (EHs) contre le champignon pathogène *Penicillium sp* par la technique petriplate inversé.

Tests	Pourcentage d'inhibition de la zone mycélium (PI (%))		
	10	50	100
HEs (μ L)			
<i>Carthamus</i>	48	56	76
<i>C. arvensis</i>	44	48	60

Les résultats de l'inhibition de la croissance mycélienne en pourcentage (%) ont indiqué que la croissance radiale des souches a été inhibée par l'H.E de *Carthamus sp* et de *C. arvensis*. Le pourcentage d'inhibition de croissance (PI) a été significativement influencé par la concentration des H.Es. La croissance de mycélium a été considérablement réduite avec l'augmentation de la concentration

Chapitre IV : Partie biologique

des H.Es. A une concentration de 100 μ L, l'H.E de *Carthamus sp* été plus active (76 %) que l'H.E de *C. arvensis*.

En conclusion, ce document fait partie d'une étude globale qui vise à déterminer les activités antifongiques de ressources florales naturelles de l'Algérie, afin de trouver de nouveaux produits naturels bioactifs. Les H.Es de ces plantes étudiées, présentaient une activité antifongique intéressante. D'autres travaux sont nécessaires pour explorer l'efficacité des H.Es contre la pourriture de la maladie des oranges et à exploiter ces H.Es comme une nouvelle source potentielle d'additifs naturels pour l'industrie alimentaire et/ou pharmaceutique.

Conclusion générale

L'Algérie dispose d'une très grande variété végétale et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ne sont pas évaluées scientifiquement. Parmi elles, deux plantes de la famille des Astéracées qui ont fait l'objet d'une étude chimique et biologique.

Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe des H.Es du laboratoire de substances naturelles bioactives de l'université de Tlemcen, Algérie en collaboration avec l'équipe du laboratoire de Chimie des Produits Naturels de l'université de Corté, Corse (France). L'objectif principal de ce travail est de fournir des informations scientifiques objectives sur deux plantes très utilisées en médecine traditionnelle en l'occurrence *Carthamus sp* et *C. arvensis*, permettant d'une part, la connaissance de la composition chimique de leur H.E et de tester leur activité biologique d'autre part.

Il ressort de ce travail que l'H.E de *Carthamus sp* soit, décrite pour la première fois. Elle s'est avérée particulièrement intéressante d'un point de vue analytique par la présence d'un composé phénolique le **Benzyl 2-furylacetylene** (> 80 %) comme constituant majoritaire de l'H.E des racines.

Dans l'H.E de *C. arvensis*, nous avons pu identifier un nouveau composé naturel, le **zingiberenol 2**, un sesquiterpène oxygéné très intéressant présent en quantité importante (32.8 %). En plus, cette H.E présente un profil chromatographique qualitativement et quantitativement différent de celui observé pour les H.Es décrites dans la littérature.

L'activité antioxydante des H.Es a été déterminée par quatre méthodes, CCM, DPPH, FRAP et blanchissement du β -carotène dont les résultats montrent que l'H.E des racines de *Carthamus sp* possède une activité antioxydante dix fois supérieure au témoin (BHT), probablement attribuable au composé majoritaire (**Benzyl 2-furylacetylene**). L'H.E de cette plante peut être considérée comme un agent antioxydant de première classe et peut être employée pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à

Conclusion générale

la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires. Alors que l'H.E de *C. arvensis* présente une activité antioxydante intéressante mais reste inférieure que le standard BHT.

Le résultat de l'essai in vitro sur le champignon *penicillium sp* a montré que l'huile essentielle de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* avait un fort effet fongicide contre la croissance de *penicillium sp*. Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antifongique in vivo des H.Es de *Carthamus sp* et *C. arvensis* sur trois champignons phytopathogènes (*A. niger*, *P. italicum* et *F. solani*), responsables de la pourriture des oranges. Les résultats ont montré que les H.Es possèdent une activité antifongique très intéressante et qui pourraient être utilisée pour la gestion de ces pathogènes comme source alternative de fongicides écologiques ou une alternative idéale pour contrôler les infections pendant le stockage des oranges.

Sachant que ces résultats se révèlent prometteurs et que chaque plante se caractérise par des molécules particulièrement intéressantes , qui demandent d'être exploitées, nous proposons à l'avenir de :

- ✓ Réaliser une étude toxicologique de ces H.Es.
- ✓ Développer un médicament antiradicalaire à base de l'H.E des racines de *Carthamus sp*, doués d'une activité antioxydante.
- ✓ Réaliser des tests plus approfondies sur les activités antifongiques in vivo.
- ✓ Développer des fongicides écologiques à base des H.Es des deux plantes étudiées.
- ✓ Réaliser une étude de la variabilité géographique des H.Es afin de déceler une éventuelle spécificité régionale en vue d'une valorisation commerciale.

Chapitre V : Partie Expérimentale

V.1. Provenance du matériel végétal et identification

* *Carthamus*

Les racines de *Carthamus* ont été collectées en mois d'Avril 2013 dans la région de Beni Snous [1165m, 34°38'N 1°33'O] dans la wilaya de Tlemcen. L'identification de cette plante a été faite par le Professeur **Noury BENABADJI** du laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes naturels de l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.

* *C. arvensis*

Les parties aériennes *C. arvensis* ont été collectées en mois de Mai 2013 dans la région de Ghazaouet [33m, 35°04'N 1°51'O] dans la wilaya de Tlemcen. L'identification de cette plante a été faite par le docteur **KAZI TANI Choukri** du laboratoire d'Agronomie Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.



Figure V.2 : Région de Ghazaouet
Tlemcen



Figure V.1 : Région de Beni Snous
Tlemcen

V.2. Méthodes utilisées pour l'extraction des H.Es

Les hydrodistillations ont été réalisées avec un appareil de type Clevenger (figure V.3), on place 400 g de la matière végétale sèche dans 4 litre d'eau puis on chauffe l'ensemble pendant une durée de 5h. Après on récupère les vapeurs refroidies. Enfin, les H.Es sont conservées dans des flacons de verre ambrés à une température de 4°C. Les rendements sont calculés par rapport à la masse de végétal frais.

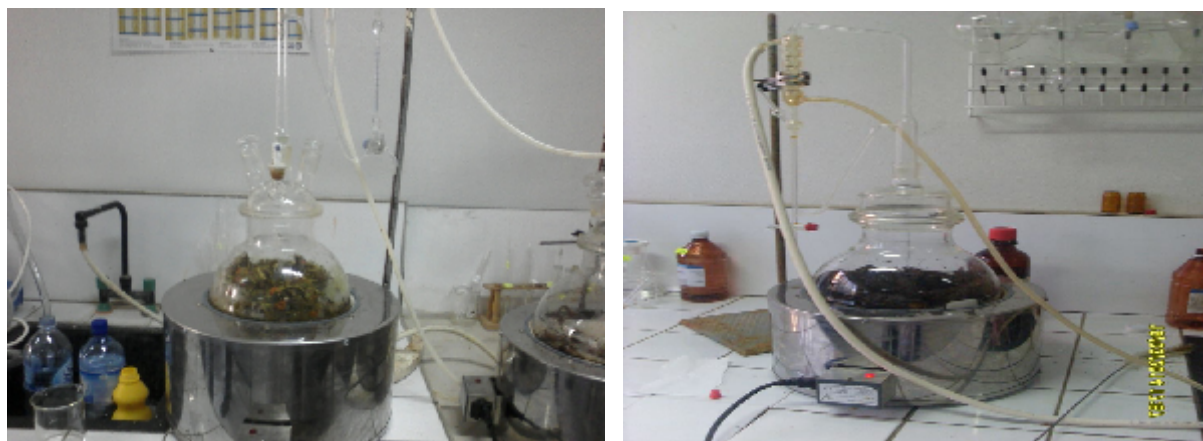


Figure V.3 : Montage de l'hydrodistillation.

V.3. Méthodes d'identification chimique des H.Es

V.3.1. Analyse par CPG/FID

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC, 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'H.E injectée est de 0,2 μL . Pour chacun des composants, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcanes.



Figure V.4 : Appareil CPG

V.3.2. 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.

V.3.3. 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 des bibliothèques de données, mais aussi elles proposent les valeurs de déplacements chimiques de molécules «modèles» à partir desquelles des reconstitutions de spectres sont possibles. Les spectres RMN 1D et 2D sont enregistrés sur Bruker 400 AVANCE, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone-13.

V.4. Méthodologie d'analyse

Une H.E, 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 de Corse et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées [43-48]. 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 [43-49] ou répertoriés dans la littérature

V.5. Criblage phytochimique

V.5.1. Préparation des extraits (aqueux et éthanolique)

25 g de matériel végétal sont mis en contact avec 200 mL de solvant dans un ballon Monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant 9 heures. Le mélange est filtré et l'extrait est soumis aux différents tests.



Figure V.5 : Extracteur Soxhlet

V.5.2. Tests de caractérisation

- Épuisée par éthanol

➤ Alcaloïdes sels

On évapore 20 mL de la solution éthanolique à sec. On ajoute 5 mL de HCL 2N au résidu et on chauffe dans un bain-marie. On filtre le mélange, puis on divise le filtrat en deux parties égales. En fin, on traite la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner.

Observation : présence de turbidité ou précipitation

(+) Est enregistré si le réactif produit une légère opacité

(++) Est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation

(+++) Est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd

➤ Flavonoïdes

On traite 5 mL d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCL concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de 3min [50].

➤ Tanins

A 1 mL de solution alcoolique, on ajoute 2mL d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tanins cathéchiques), bleu-verte (tanins galliques) [51].

Chapitre V : Partie Expérimentale

➤ Composés réducteurs

On traite 1mL de l'extrait éthanolique avec 2 mL d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis on chauffe. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique [51].

➤ Coumarines

On évapore 5mL de la solution extractive éthérique. On dissout le résidu dans 1 à 2 mL d'eau chaude. On divise le volume en deux parties puis on Prend la moitié du volume comme témoin et on ajoute à l'autre moitié 0,5mL de NH₄OH (10%). En fin on met deux taches sur un papier filtre et on les examine sous la lumière U.V., une fluorescence intense indique la présence des coumarines [51].

➤ Anthocyanosides

La solution aqueuse acide est dosée avec une solution de NaOH. S'il y a un virage de couleur en fonction du pH, la présence des Anthocyanosides, est confirmée

- pH 3 : la solution prend une coloration rouge
- 4 pH 6 : la solution prend une coloration bleue

➤ Stérols & stéroïdes

On évapore 10mL d'extrait alcoolique puis le résidu obtenu est traité avec 10mL de chloroforme anhydre. Après filtration, on mélange 5mL de la solution chloroformique avec 5mL d'anhydre acétique puis on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On agite et on laisse reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 min à 21C°)

- Epuisée par l'eau :

➤ Amidon

Le test effectué consiste à traiter 5 mL de l'extrait aqueux avec le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

➤ Composés réducteurs

Le teste consiste à ajouter 2mL de la solution aqueuse 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling, chauffer ensuite la solution résultante. Un précipite rouge brique marque la présence des hydrates de carbones.

➤ Saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 mL de l'extrait aqueux, après l'agitation, le mélange est abandonné pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif (-)

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif (+)

Mousse de 1-2cm = test positif (++)

Mousse plus de 2cm = test très positif (+++) [51].

➤ Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1mL de l'extrait aqueux, 1mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 . L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins.

IV.5.3.Réactifs de caractérisation

○ Réactif de Mayer :

On dissout 1.358g de HgCl_2 dans 60 mL d'eau et 5g de KI dans 10 mL d'eau. On mélange, ensuite, les deux solutions et on ajuste le volume total à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif une trouble plus un précipité blanc.

○ Réactif de Wagner :

On dissout 2g de KI et 1.27 g de I_2 dans 75 mL d'eau, la solution ainsi obtenue est ajoutée à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

○ Liqueur de Fehling

La liqueur de Fehling est un mélange de deux solutions Fehling A et le Fehling B, les composés réducteurs donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique

○ Réactif d'Amidon

Une solution de 1.2 g d'iode dans 50 mL d'eau distillée contenant 2.5 g d'iodure de potassium est chauffée pendant 5 min, puis diluée jusqu'à 500 mL. On chauffe 5mL de la solution à tester avec 10 mL d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition et on ajoute le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacée.

V.6. Évaluation de l'activité antioxydante

V.6.1. Test CCM

Dépistage de l'activité antioxydante sur CCM à l'aide du DPPH : le test chimique qu'on a utilisé pour déceler la présence de composés antioxydants dans les extraits de plante repose sur le principe de la réduction des radicaux libres fournis par le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Pour réaliser ce test, on a déposé 10 μ l d'une solution de 10 mg/mL (M/V) de chaque extrait sur la plaque de silicagel 60 F254 (Merck) possédant un support en aluminium.

Le développement des plaques a été réalisé dans les systèmes de solvants suivants:

Butanol-Acétate d'éthyle-Eau (65 : 15 : 25) pour les extraits polaires, tandis que les extraits apolaires ont été développés dans le système de solvants ligroïne-acétate d'éthyle (1 :1).

Après migration, les chromatogrammes ont été séchés à l'aide du séchoir électrique puis révélés à l'aide d'une solution de DPPH à la concentration de 2 mg / mL (M / V) dans le méthanol. En présence de substances antioxydantes, le DPPH est réduit et passe de la couleur pourpre au jaune.

Sur les plaques CCM, les zones d'activités antiradicalaires apparaissent en jaune-clair sur fond violet après un temps optimal de 30 mn [36].



Figure V.6 : Méthode CCM

V.6.2. Test DPPH :

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH \cdot) est réalisé par la méthode décrite par (Ammar et *al.*, 2009) [37] qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la IC₅₀ des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit

Chapitre V : Partie Expérimentale

par un donneur de proton H^+ . Où AH est un composé capable de céder un H^+ au radical DPPH.

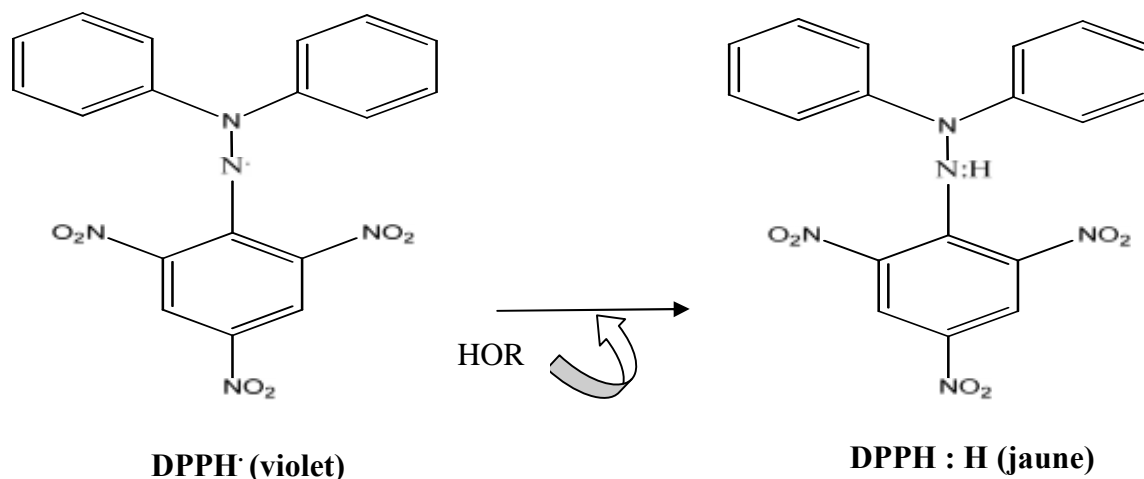


Figure V.7 : Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH[·]

V.6.1.1. Mode opératoire

Une solution éthanolique de 26 $\mu\text{g/ml}$ de DPPH[°] est mélangée avec différentes concentrations des H.E (0.31-90.7 $\mu\text{g/mL}$). On met 1mL de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, on ajoute 1mL de solution éthanolique de DPPH, puis on laisse incuber 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Enfin, on lit l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol pur. Ces mêmes opérations sont répétées, en remplaçant les huiles essentielles par le BHT (control positif) et l'éthanol pur (control négatif). Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100 \text{ [37].}$$

Où :

A_C : Absorbance du contrôle ;

A_T : Absorbance du test effectué ;

I% : % d'inhibition.

- Calcul des IC_{50} : IC_{50} ou concentration inhibitrice de 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 ;

Chapitre V : Partie Expérimentale

pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

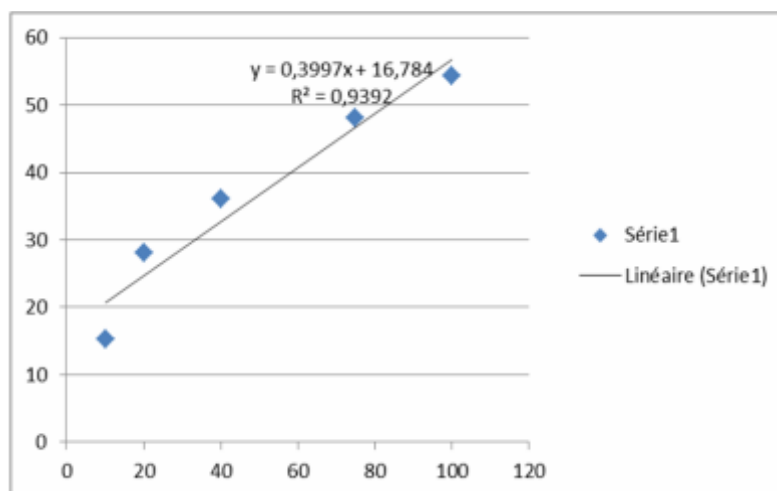


Figure V.8: Capacité antioxydante de H.E de *Carthamus*



Figure V.9: Méthode DPPH

V.6.3. Réduction de fer

Cette méthode est basée sur la capacité que possède un antioxydant à réduire les ions ferriques Fe^{3+} (couleur jaune) aux ions ferreux Fe^{2+} (couleur bleu)

V.6.3.1. Mode opératoire

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique [38]. Les différentes concentrations des H.Es dans l'eau distillée (0.5 mL) sont mélangées avec 0.5 mL de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 0.5 mL de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 0.5 mL de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 1 mL du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 1 mL de l'eau distillée et 0.3 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

Chapitre V : Partie Expérimentale

(0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.



Figure V.10 : Appareils utilisés dans la méthode de FRAP

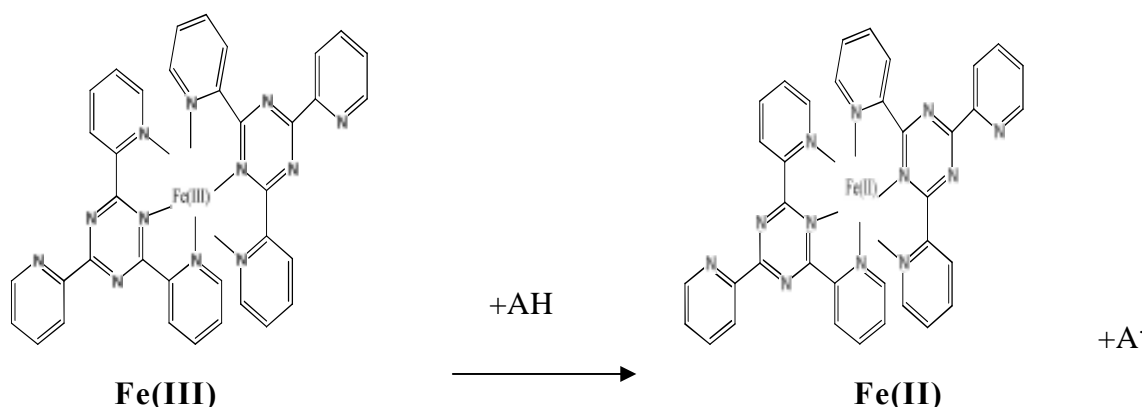
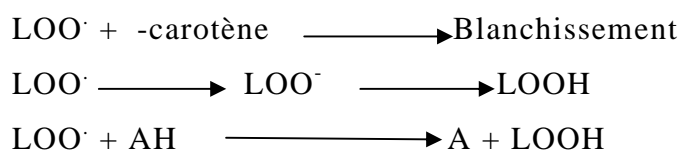


Figure V.11: Mécanisme réactionnel du test de FRAP

V.6.4. Test de blanchissement du β -carotène

V.6.4.1.Principe

L'activité antioxydante des H.E de *Carthamus* et de *C. arvensis* est mesurée selon la méthode de Tepe *et al.*, (2006) [39], L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique [39].



V.6.3.2. Mode opératoire

On dissout 10 mg de -carotène dans 10 mL de chloroforme. On prélève 1mL de cette solution dans une fiole contenant préalablement 2 mL de Tween 20 et 200 µl de l'acide linoléique. Après évaporation du chloroforme, 500 mL d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2.5 mL sont transférés dans des tubes auxquels sont additionnés 350 µl de chaque huile à différentes concentrations (**0.06-121.1** µg/mL ou de BHT (2 µg/mL). Un tube contenant 2.5 mL d'émulsion et 350 µl d'éthanol servira de témoin négatif. L'absorbance est immédiatement mesurée à 470 nm, D'autres lectures sont faites à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h, et 48h) [39], Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

L'activité anti-oxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

$$\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100$$

Où :

- AAR : activité anti-oxydante relative.
- Abs Échantillon : absorbance de l'échantillon après 48 heures.
- Abs BHT : absorbance du BHT après 48 heures.

V.7. Evaluation de l'activité antifongique

V.7.1 Activité antifongique in vivo de l'H.E de *Carthamus* et de *C. arvensis* contre le développement de champignons de *C. sinensis*

V.7.1.1. Champignons pathogènes

Trois isolats fongiques causant la pourriture des oranges. *Aspergillus Niger*, *Penicillium italicum* et *Fusarium solani* ont été utilisées pour cette expérience [52].

V.7.1.2. Test in vivo

Pour le test antifongique in vivo, nous avons utilisé la méthode décrite par Dikbas et al., (2008) [53]. Les oranges sélectionnées pour les expériences ont été lavées dans de l'éthanol (70%) pendant 2 min, puis rincées deux fois avec de l'eau distillée

Chapitre V : Partie Expérimentale

stérile (10 min chaque) et séchées à l'air. Les surfaces des oranges stérilisées ont été blessées avec un clou à une profondeur uniforme de 3 mm. Les inoculums fongiques contenant 10^6 spores/mL ont été préparées par raclage la matière de spores à partir de la surface des colonies avec un coton-tige humide et remise en suspension du matériau dans l'eau distillée contenant 0,5% de Tween 80. Pour le test de l'activité antifongique in vivo contre les 03 isolats fongiques et le mélange, les H.Es de *Carthamus sp* et de *C. arvensis* ont été appliqués directement à la concentration de 10 μ g/mL et 25 μ g/l. mL. Les H.Es (sous forme d'émulsion avec l'eau) des deux plantes et inoculum fongique ont été pulvérisés séparément sur les oranges blessées. Les fruits non inoculés avec l'agent pathogène ont été utilisés comme contrôle négatif. Ils ont été scellés dans des boîtes en plastique polyéthylène avec un taux d'humidité et incubées entre 20-25 °C, état de stockage.

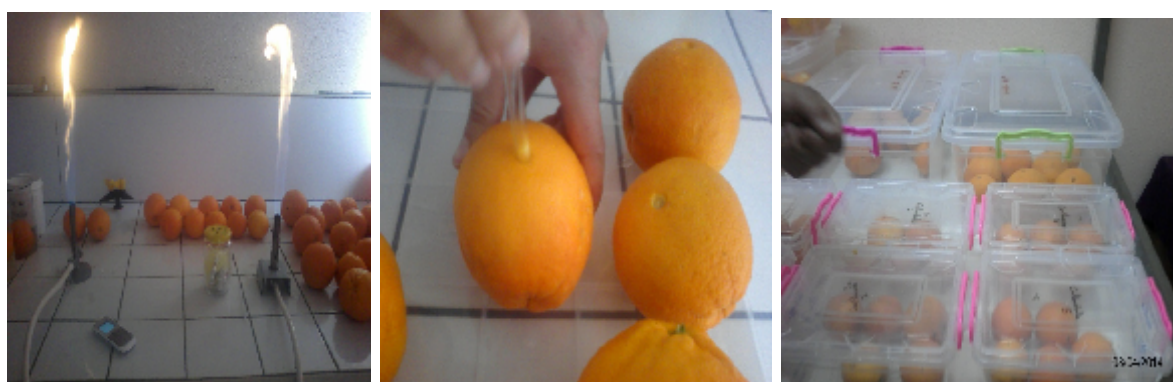


Figure V.12 : Activité antifongique in vivo

V.7.2. Essai antifongique contre *Penicillium sp*

On additionne 10, 50 et 100 μ l d'H.E à 20 ml de milieu PDA. Des disques de mycélium de 6 mm de diamètre coupés de périphérique d'une culture de 7 jours sont déposés au centre des boites puis incubation à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant 7 jours. La mesure des diamètres des zones de croissance de l'hyphe par rapport au contrôle se traduit par l'application de la formule suivante de Soliman et Badeaa., (2002) [54].

$$\text{PI (\%)} = \frac{D_b - D_a}{D_b} \times 100$$

Avec :

T : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.

Da : Le diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (mm).

Db : Le diamètre de témoin (mm).

Références

- [1] Hostettmann K, Kizu H, Tomimori T. 1982. Molluscicidal Properties of Various Saponins. *Planta Med.* 44, 34-35.
- [2] Harrar A. 2012. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus*. Mémoire de magister, Université de Setif.
- [3] Kekulé F. 1866. Sur la constitution des substances aromatiques," *Bulletin de la Societe Chimique de Paris.* 2(3), 129-36.
- [4] Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12, 564-582.
- [5] Cox SD, Mann CM, Markam JL. 2001. Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology.* 91, 492-497.
- [6] Hanaoka K, Sieffermann JM, Giampaoli P. 2000. Effects of the sniffing port air makeup in gas chromatography-olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48, 2368-2371.
- [7] Alais C, Linden G, Miclo L. 2003. Biochimie alimentaire, DUNOD. 5^{ème} édition de l'abrégé. 59p.
- [8] Rolland Y. 2004. Actualités des lipides en cosmétique : Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps Gras.* 11(6), 419-424.
- [9] Moll M .1998. Additifs alimentaires et auxiliaires technologique. Ed. DUNOD. Paris. 89-99p.
- [10] Jeantet R, Croguennec T, Schuck P, Brule G. 2006. Science des aliments, stabilisation biologique et physico-chimique. volume 1. Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, 95-151p.
- [11] Beirão ARB, Bernardo-Gil MG. 2006. Antioxidants from *Lavandula luisieri*. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. Portugal; 8p.
- [12] Bondet V. Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH^{*} free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.* 30(6), 609-615.
- [13] Gachkar L. Yadegari D. Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry.* 102, 898-904.

Références

- [14] Ho CL, Wang EIC, Wei XT, Lu SY, Su YC. 2008. Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. from Taiwan. *Journal of Essential Oil Research*. 20, 328-34.
- [15] Rashid CHA, Qureshi MZ, Raza SA, William J, Arshad M. 2010. Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. *Analele Universităţii din Bucureşti –Chimie*. 19(1), 23-30.
- [16] Bandoniene D, Pukalskas A, Venskutonis PR, Gruzdiene D. 2000. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. 33, 785-791.
- [17] Linderschmidt R, Trylka A, Goad M, Witschi H. 1986. The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice." *Toxicology*. 38, 151-160.
- [18] Lis-Balchin M. 2002. Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London. 37, 40, 50, 155-200p.
- [19] Sipailiene A, Venskutonis PR, Baranauskiene R, Sarkinas A. 2006. Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*. 18, 698-703.
- [20] Selles C. 2012. Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux H₂SO₄ 0,5 M. Thèse de Doctorat d'état. Université de Tlemcen.
- [21] Memou S. 2012. Composition antibactérienne et antioxydante des H.E extraites de la partie aérienne de *Pinus halpensis* Algérien (pinacées). Mémoire de Master. Université de Tlemcen.
- [22] Boumedane S. 2009. Contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques et analyse chromatographique par CPG /SM de l'HE de *Anacyclus valentinus* L. mémoire de Magistère. Université de Constantine.
- [23] Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tomes 2, ED. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris.
- [24] Boumerfeg S. Antioxidative properties of *Tamus communis* L and juga iva L. extracts. These de Doctorat. Université Abbes Frerhat Setif.

Références

- [25] Petrović L, Lepojević Z, Sovilj V. 2010. Composition of essential oil obtained from tubular, head and ligulate flowers of *Calendula officinalis* L. By steam distillation of plant material and co2 extracts. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2), 143-146.
- [26] Khalid A, Khalida. 2010. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Scientia Horticulturae*. 126(2), 297–305.
- [27] Chalchat JC, Garry RP, Michet A. 1991. Chemical composition of essential oil of *Calendula officinalis* L. (pot marigold). *Flavour and Fragrance Journal*, 6(3), 189-192.
- [28] Ercetin T, Senol FS, Orhan IE, Toker G. 2012. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L and *Calendula officinalis* L. *Industrial crops and products*, 36, 203-208.
- [29] Paolini J, Barboni T, Desjobert JM, Djabou N, Muselli A, Costa J. 2010. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. 38, 865-872.
- [30] Gonca T, BÜSra Y, Tayfun A, Ahmet Y, SengÜL Alpay K, Nurettin Y. 2012. Comparative essential oil analysis of *calendula arvensis* L. Extracted by hydrodistillation and micro-wave Distillation and Antimicrobial Activities. *Asian Journal oh chemistry*. 24(5), 1955-1958.
- [31] Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *The Zutphen Elderly Study. Lancet*. 42, 1007-1011
- [32] Ma ZC, Porter LJ. 1988. Tannins from *Bendo Eucalyptus*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 30, 534–538.
- [33] Djabou N, Muselli A, Allali H, Dib MA, Tabti B, Varesi L, Costa J. 2012. Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 83, 51–62.
- [34] Meliani N, Dib MA, Djabou N, Costa J, Allali H, Tabti B, Muselli A. 2013. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Daucus aureus* Essential Oils from Algeria. *Natural Product Communication*. 8(9), 1-6.

Références

- [35] Djordjevic S Petrovic S, Ristic M, Djokovic D. 2005. Composition of *Carlina acanthifolia* Root Essential Oil. *Chemistry of Natural Compounds*. 7(4), 410-412.
- [36] Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shell fish. *Brusci, Brotech-Brochem*. 58, 1780-1783.
- [37] Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A. 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*. 95, 200-204.
- [38] Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44, 307-315.
- [39] Ammar R B, Bhourri W, Sghaier MB, Boubaker J, Skandrani I, Neffati A, Bouhlel I, Kilani S, Mariotte AM, Chekir-Ghedira L, Dijoux-Franca MGD, Ghedira K. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*. 116, 258-264
- [40] Lagha-Benamrouche S, Madani K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial crops and products*. 50, 723-730.
- [41] Agrios GN. 1997. Plant Pathology (4th Ed.). Academic Press, San Dieg.
- [42] Rojas TR, Sampayo CAF, Vázquez BI, Franco CM, Cepada A. 2005. Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control*. 16, 445-450.
- [43] Joulain D, König WA. 1998. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Hambourg, Ed. E.B. Verlag.
- [44] König WA, Hochmuth DH, Joulain D. 2001. Terpenoids and related constituents of essential oils, Library of MassFinder 2.1, Institute of organic chemistry, Hambourg, Germany.
- [45] Adams R.P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing. Carol Stream, IL, USA.
- [46] McLafferty FW, Stauffer DB. 1988. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 4 Ed. Wiley-Interscience, New York.

Références

- [47] McLafferty FW, Stauffer DB. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6 Ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, version 3.10., Newfield.
- [48] National Institute of Standards and Technology. 1999. Pc Version 1.7 of NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library. Perkin-Elmer Corp: Norwalk, CT.
- [49] Jennings W, Shibamoto T. 1980. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, Ed. Jovanovitch H.B., Academic Press, New-york.
- [50] Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R. (1971). Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).
- [51] Trease E, Evans WC. 1987. Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13th Edition 61-62. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamifera* (Baume du pommier). Journal of Medicine and scientific. 4(3), 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.
- [52] Tabti L, Dib MA, Gaouar N, Bouayad S, Tabti B. 2014. Antioxidant and Antifungal Activity of Extracts of the Aerial Parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns Against Four phytopathogenic Fungi of *Citrus sinensis* Jundishapur *Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 9(1), 49-54.
- [53] Dikbas N, Recep Kotan F, Dadasoglu FS. 2008. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. International Journal of Food Microbiology. 124, 179-182.
- [54] Soliman KM, badeaa RI. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 1669-1675.

Enquête ethnobotanique, caractérisation chimique et activités biologiques des volatils de deux plantes médicinales de l'ouest Algérien : *Calendula arvensis* et *Carthamus sp*

Résumé

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. La composition chimique des HEs des racines de *Carthamus sp* et les parties aériennes de *Calendula arvensis* ont été étudiées, par CPG, CPG-SM et RMN, puis évaluées pour leur activité biologique. L'HE de *Carthamus sp* a été dominée par le 2-(3-phényl-1-propynyl)-furane (> 80%) de la composition totale de HE. L'HE de *C. arvensis* a été dominée par un nouveau composé naturel, le zingiberenol 2, un sesquiterpène oxygénés très intéressants présents en quantité importante (32.8 %). L'HE des racines de *Carthamus sp* possède une activité antioxydante dix fois supérieure au témoin (BHT), probablement attribuable au composé majoritaire (Benzyl 2-furylacétylène). Alors que l'HE de *C. arvensis* présente une activité antioxydante intéressante mais reste inférieure que le standard BHT. Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antifongique in vivo des H.Es de *Carthamus sp* et *C. arvensis* sur trois champignons phytopathogènes (*A. niger*, *P. italicum* et *F. solani*), responsables de la pourriture des oranges. Les résultats ont montré que les H.Es possèdent une activité antifongique très intéressante et qui pourraient être utilisées pour la gestion de ces pathogènes comme source alternative de fongicides écologiques ou une alternative idéale pour contrôler les infections des oranges.

Mots clés: *Carthamus sp*; *calendula arvensis*, Huile essentielle; Activités biologiques

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 people. The chemical composition of EOs of *Carthamus sp* roots and *Calendula arvensis* aerial parts were studied by GC, GC-MS and NMR, and then evaluated for their biological activity. The EO of *Carthamus sp* was dominated by 2-(3-phenyl-1-propynyl)-furan (> 80%) of the total oil. HO of *C. arvensis* was dominated by a new natural compound, zingiberenol 2, a very interesting oxygenated sesquiterpene present in significant amount (32.8%). The essential oils roots of *Carthamus sp* have antioxidant activity ten times higher than the control (BHT), probably due to predominant compound (2-Benzyl furylacetylene). While EO of *C. arvensis* is an interesting antioxidant activity but remains lower than the standard BHT. In this study we also conducted a test in vivo antifungal EOs *Carthamus sp* and *C. arvensis* on tree phytopathogenic fungi (*A. Niger*, *P. italicum* and *F. solani*), responsible for the rotting oranges. The results showed that essential oils have a very interesting antifungal activity and could be used for the management of these pathogens as an alternative source of ecological fungicides or an ideal alternative to control infections oranges.

Keywords: *Carthamus sp*, *calendula arvensis*; Essential oil; Biological activities

ملخص:

النباتات الطبية تعتبر كمنتج نهائي للاستهلاك وفي نفس الوقت كمواد أولية لإنتاج المركبات الحيوية. وهي تمثل مصدرا هاما من مصادر الدخل لكثير من الناس. تمت دراسة التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية لجذور *Carthamus sp* والأجزاء الهوائية من *Calendula arvensis* بواسطة GC، GC-MS و RMN، ثم تقييمها من جانب النشاط البيولوجي. أظهر تحليل الزيوت الأساسية لـ *Carthamus sp* أن 2-(3-phényl-1-propynyl)-furane (> 80%) يسيطر بنسبة (< 80%) من مجموع الزيوت الأساسية. الزيت الأساسية لـ *C. arvensis* سيطر عليها مركب طبيعي جديد، 2 zingiberenol مشبع بالأكسجين والمثير جدا للاهتمام، بكمية كبيرة (32.8%). الزيوت الأساسية لجذور *Carthamus sp* أظهرت نشاط مضاد للأكسدة أعلى عشر مرات من الشاهد (BHT)، على الأرجح بسبب المركب الغالب (Benzyl 2-furylacetylene) في حين الزيوت الأساسية لـ *C. arvensis* تظهر نشاط مضاد للأكسدة بشكل معتبر ولكن لا يزال أقل من معيار BHT. خلال هذه الدراسة أجرينا أيضا اختبار مضاد للفطريات حيويًا للزيوت الأساسية لـ *Carthamus sp* و *C. arvensis* على ثلاث فطريات الممرضة للنبات (*A. niger*, *P. italicum* و *F. solani*)، المسؤولة عن تعفن البرتقال. أظهرت النتائج أن الزيوت الأساسية لها نشاط مضاد للفطريات بشكل مثير للاهتمام ويمكن استخدامها للتعامل مع هذه الأمراض كمصدر بديل لمضادات الفطريات البيئية أو بديلا مثاليا للسيطرة على عدوى البرتقال.

الكلمات المفتاحية: *Carthamus sp*, *calendula arvensis*، زيت أساسي، نشاط بيولوجي

Auteur : M^{elle} BELABBES Rania

Adresse : laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives, facu
Université Abou Bekr BELKAID de Tlemcen