

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement

Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCCEN

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 : **Amel BENYAHIA**

Thème

---

**CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITES**

**BIOLOGIQUES DE DEUX PLANTES MÉDICINALE**

*Inula viscosa et Inula Montana*

---

<b>Présidents</b>	Saïd Ghalem/Boufeldja Tabti	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examineurs :</b>	Hocine Allali	Professeur	Université de Tlemcen
	Mourad Bendahou	Professeur	Université de Tlemcen
	Mohammed El Amine Dib	MCA	Université de Tlemcen
	Nouria Merad	MCA	Université de Tlemcen
	Nassim Djabou	MCA	Université de Tlemcen
<b>Directeur de mémoire</b>	Meriem Merad-Benjarou	MCA	Université de Tlemcen

**Le 29 Mai 2014**

# Dédicaces

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL À :

*Mes parents qui ont suivi avec attention et un grand intérêt ; A ma*

*sœur Fasmine et mon frère Aymen ;*

*A ma famille*

*A mes ami(s)*

# Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), pour cela je tiens à remercier son directeur de **Pr.Said GHALEM** ainsi que le chef d'équipe le **Pr.Boufeldja TABTI**.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à **Mme Meriem MERA D** pour avoir accepté de m'encadrer et pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de m'apporter tout au long de ce travail.

Je voudrais ensuite exprimer toute ma gratitude et mes vifs remerciements au **Dr. DIB**

**Mohamed El Amine**, le responsable de master MBSA.

Nos remerciements s'adressent au Pr. Said GHALEM, Pr.Boufeldja TABTI, Pr. Hocine ALLALI, Pr. Mourad BENDAHOU ,Dr .Nouria.MERAD, Dr.Nassim.DJABOU ,Dr .Mohamed el Amine DIB.

Mes chaleureux remerciements vont également à Messieurs BENABADJI Noury pour l'identification des plantes.

Je remercie également **Pr. Mourad bendahou**, membre du laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement ainsi son doctorant Fethi.BENBELAID.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance aux personnes qui m'ont apportées des appuis scientifiques, qu'il s'agisse de conseils ou d'informations, je pense notamment à Mme .Nadia.FEKIH , Kawter.YOUNES , Dr.Ilyes.CHIKHI ,Nouredine.MAISOUN ,Imad BAKHTI , Adel BENRAMDANE.

Enfin, je remercie gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Sommaire

## PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	1
<b><u>CHAPITRE I : Les plantes médicinales et la phytothérapie</u></b>	
INTRODUCTION.....	3 I-
Les plantes médicinales.....	3
II.1 Définition.....	3
II.2. Les plantes médicinales et leurs utilisations.....	3
III-La phytothérapie.....	3
III.1. Définition.....	3
III.2. Les différents types de phytothérapie.....	4
<b><u>CHAPITRE II : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIE</u></b>	
Etude botanique.....	5
I.1.introduction .....	5
I.2.répartition géographique et espèce d'inule.....	5
I.3. <i>Inule Visqueuse</i> .....	6
I.3.1. Description botanique.....	7
I.4. <i>Inula Montana</i> .....	7
I.4.1. Description botanique.....	8
II-Etude chimique.....	8
II.1.inule visqueuse.....	9
II-inula montana .....	10
<b><u>CHAPITRE III : les métabolites secondaires</u></b>	
I-INTRODUCTION .....	11
II.1.Les terpènes .....	11
II.2.Les alcaloïdes.....	12
II.3.Les composés phénoliques.....	12
II.3.1.Introduction .....	12
II.3.2.Classification .....	13
II.3.2.1.Flavonoïde.....	13

❖ Structure chimique.....	13
❖ Distribution .....	15
II.3.2.2.Les coumarines.....	16
II.3.2.3.Les tanins.....	18

#### **CHAPITRE IV : ETUDES DES HUILES ESSENTIELLES**

I - Historique.....	19
II- II- Définition .....	19
III-Chiie des huiles essentielles.....	20
III-1 composition chimique.....	21
III-2 utilisation des huiles essentielles .....	21
IV- Extraction des huiles essentielles.....	22
V-Méthode d'analyse des huiles essentiel.....	25

#### **CHAPITRE V: Activité biologiques**

I- Activité antioxydante.....	27
II- Activité antimicrobienne.....	28

#### **CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES**

I- Matériels végétales.....	30
II- Extraction de l'huile essentiel.....	31
III- Caractérisation des huiles essentiels.....	32
IV- Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	33
V- Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	34
VI- Tests phytochimiques.....	35

#### **RESULTAT ET INTERPRETATION**

I- Composition chimique de l'H.E aérienne d'I.Viscosa.....	37
II- Composition chimique de l'H.E es parties aérienne d'I.Montana.....	41
III- Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentiels.....	43
IV- Examen phytochimique.....	47

#### **Conclusion générale**

Référence bibliographique

Liste des figures

Liste des tableaux

# ***INTRODUCTION GENERALE***

## I-Introduction

**L**es plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux.

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La Chine, berceau de la phytothérapie, l'Inde, le Moyen-Orient, notamment au cours de l'ère arabo-musulmane, l'Égypte, la Grèce, Rome, constituent des civilisations phares chez lesquelles les plantes aromatiques et médicinales ont occupé une place de premiers choix.

L'extraction des plantes médicinales est une pratique basée sur les avancées et les preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique conduit aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.[1]

Mais, les plantes médicinales sont faiblement utilisées dans le traitement de certaines affections, bien qu'elles aient fait leurs preuves dans le passé ou nos grands-parents les utilisaient presque exclusivement pour leur vertu curative.

Selon l'OMS, la phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et elle est encore massivement employée dans certains pays, dont les pays en voie de développement. C'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique [1]. Le retour, et pour cause, vers la phytothérapie est aujourd'hui une démarche planétaire.

Se trouvant dans le bassin méditerranéen avec de grandes variations climatiques du Nord au Sud, l'Algérie présente un terrain de prédilection au développement de cultures. Les cultures aromatiques et médicinales en Algérie restent traditionnelles. Elles se limitent aux jardins familiaux et aux jardins d'agrément, notamment avec des espèces florales faisant l'objet de cultures de fleurs. La valorisation de ces ressources naturelles peut avoir des retombées

économiques considérables pour notre pays. Récemment des projets de production des plantes aromatiques et médicinales ont vu le jour et sont essentiellement orientés vers : l'exportation des plantes fraîches, d'huile essentielle et d'huile concrète.

Dans le but de continuer à exploiter les plantes poussant en Algérie et réputées pour leurs vertus médicinales, nous avons étudié la composition chimique des H.Es de l'*I.Viscosa* et *I.Montana* ainsi que l'étude de leur pouvoir antioxydante et antibactérienne.

Pour ce faire, nous avons subdivisé notre travail de recherche en deux parties principales. :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur cinq chapitres :

Le premier chapitre consiste en une étude générale sur les plantes médicinales et la phytothérapie. Le second chapitre est consacré à l'étude botanique et chimique de *L'Inule Visqueuse & Montagne*. Le troisième chapitre présente les classes des métabolites secondaires. Le quatrième chapitre présente les huiles essentielles, leur localisation dans la plante, leur composition chimique, les principales méthodes de leur extraction et l'identification de leurs Composants. Le cinquième chapitre résume la méthodologie suivie lors de l'évaluation des propriétés pharmacologiques d'un principe actif extrait de plante.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus :

- L'extraction de l'huile essentielle de *L'Inula Viscosa* et *Inula Montana* par hydrodistillation
- L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse.
- L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et la méthode de FRAP et l'évaluation de l'activité antibactérienne.
- Les tests phytochimiques des différentes parties de la plante.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.



***PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIE***

***Chapitre I***

***« Les plantes médicinales et la phytothérapie »***

## **I-Introduction**

Depuis des siècles, la phytothérapie, le traitement par les plantes, est à la base de la médecine. Les plantes sont certes là pour nous permettre de nous soigner, mais également pour favoriser le bon fonctionnement de notre organisme [2].

## **II- Les plantes médicinales**

### **II.1. Définition**

Les plantes médicinales sont des plantes dont un des organes (feuille, écorce) possède des vertus curatives et parfois toxiques selon son dosage. Les plantes médicinales sont les plantes utilisées en phytothérapie pour leurs principes actifs, elles peuvent être vendues en herboristerie, en pharmacie, avec ou sans prescription selon la réglementation du pays.

### **II.2. Les plantes médicinales et leurs utilisations**

Les plantes médicinales sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Cette connaissance ancestrale fut à l'arrivée de la médecine traditionnelle mise de côté au profit de la prise de médicaments d'ordonnance souvent plus puissants et agissant plus rapidement que la médecine traditionnelle utilisée auparavant. Par contre, aujourd'hui nous assistons au retour de l'utilisation des plantes médicinales pour favoriser la santé. Chaque plante médicinale a une définition qui lui est propre et une utilisation spécifique. [3]

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme des agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs [4]. Les plantes sont donc la source principale de substances actives, et pas uniquement dans la médecine traditionnelle [5].

## **III-La phytothérapie**

### **III.1. Définition**

La phytothérapie, selon **Bruneton (1999)**, est le traitement par les plantes ; c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation de produits préparés à partir de plantes sans passer par une étape de sélection de molécules, on ne consomme donc pas que le principe actif mais tout ce que contient la plante. Par ailleurs la phytothérapie requiert une connaissance parfaite de substances chimiques contenues dans un organe végétal et une bonne connaissance de mode d'emploi. On peut distinguer la phytothérapie utilisée dans une pratique traditionnelle, parfois très ancienne, basée sur l'utilisation de plantes ayant des vertus découvertes empiriquement de la Phytothérapie basée sur les études scientifiques recherchant les principes actifs des plantes et leurs effets [3].

### III.2. Les différents types de phytothérapie

On peut distinguer différents types de thérapies par les plantes :

- **La phytothérapie** : l'utilisation des différentes parties des plantes (racine, feuilles, fleurs...ou la plante entière) sous différents formes galéniques.
- **La gemmothérapie** : l'utilisation des bourgeons de la plante.
- **L'aromathérapie** : l'utilisation des huiles essentielles obtenues grâce à divers procédés d'extraction. [6]
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules ... [7].

## **Chapitre II**

**« RECHERCHE BIBLIOGRAPHIE »**

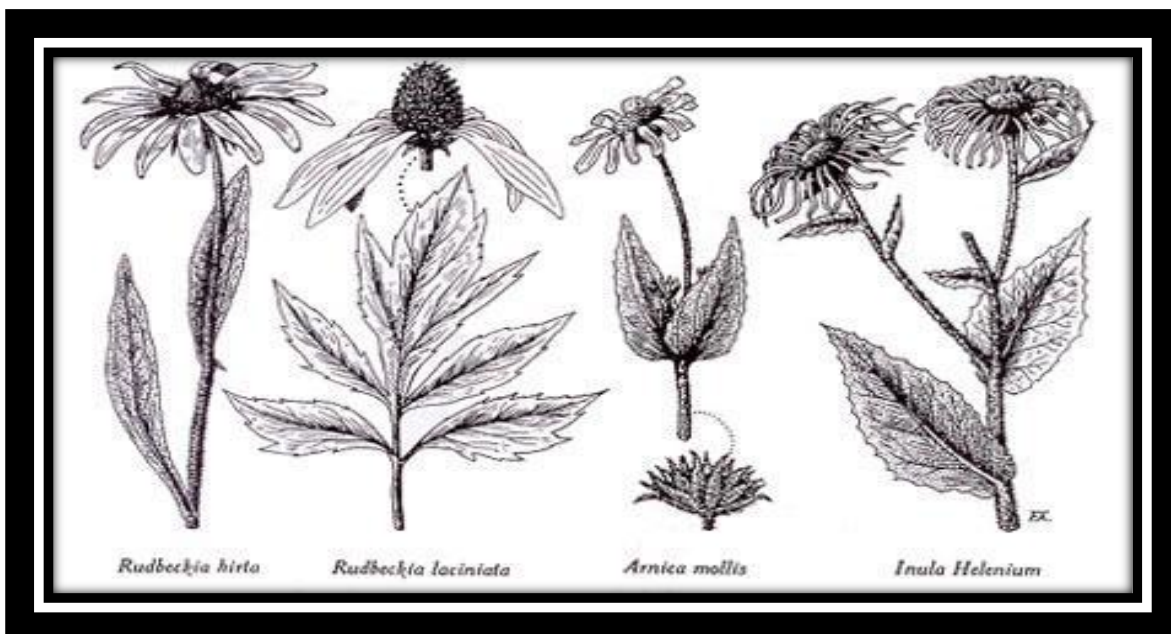
## **-Etude botanique**

### **I.1.INTRODUCTION**

Le nom du genre *Inule*, est dû à **Carl Von Linné (1753)**, terme qui vient du nom de l'espèce *Helenium*. Le nom *Helenium* découlerait du grec "helen". La légende antique raconte que la fleur serait née des larmes de la belle Hélène de Troie.

Les *Inules* appartiennent à la famille des Astéracées C'est une importante famille de plantes dicotylédones qui regroupent 20000 espèces.

Le genre *Inule* comprend une variété d'environ 90 espèces. Ce sont des plantes herbacées vivaces, à feuilles alternes, capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées, bractées en plusieurs séries fleurs périphériques pistillées, à ligules tridentées, anthères sagittées à la base, à chaînes munis de côtes, aigrette simple.



**Figure 1** : les *Inules*

Les *Inules* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle. Au Japon l'*Inule* est utilisé comme un remède familial (tisane) ; comme une diaphorèse en Europe, et en Taïwan et Chine comme un agent thérapeutique pour la tuberculose et l'entrogastrique chronique. Elle a aussi des propriétés antiseptiques, antibiotique, antispasmodique, anti inflammatoire, anti diabétique [8-11].

## I.2. Répartition géographique

Le genre *Inula* est largement distribué dans le bassin méditerranéen [12], en Europe (Espagne, France...), Asie (Chine, Turquie, Japon) et en Afrique (Algérie, Tunisie Maroc...). on le trouve dans les sols salés, les prairies Humides et les bords de cours d'eau.



Figure 2 : carte géographique de L'*Inula*

## I.3. *Inula Visqueuse*

Le nom *Inula* viendrait du grec : Inéo qui signifie-je purge [13]. Et *Viscosa* veut dire visqueuse : Aunée visqueuse [14].

L'*Inula* est une plante très anciennement connue, elle a été utilisée au moyen âge jusqu'à nos jours pour ses vertus médicinales variées.

Sa taxonomie est configurée dans le tableau suivant :

<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous- embranchement</b>	angiospermes
<b>Classe</b>	dicotyledones
<b>Sous Classe</b>	gamopetales
<b>Ordre</b>	campunulales
<b>Famille</b>	compositae
<b>Genre</b>	<i>Inula</i>
<b>Espèce</b>	<i>Viscosa</i> - L – AIT
<b>Noms vernaculaires</b>	Terhalâ, magramane

## Tableau 1 : Taxonomie d'*Inula viscosa* [14]

### 1.3.1. Description botanique d'*Inule Visqueuse*

*Inule Visqueuse* est une plante herbacée pérenne ou vivace de la famille astéracées, répandues dans toute la région méditerranéenne. Elle est blanchâtre.

Elle apparaît sous forme de buissons hauts de **0.5 à 1 m**, ligneuse dans sa partie inférieure. Les feuilles sont ondulées, dentées, aiguës, rudes recouvertes sur les deux faces de glandes visqueuses qui dégagent pendant la phase végétative une odeur forte et âcre.

La floraison commence à partir du mois de Septembre, les inflorescences sont de longues grappes fournies de capitules jaunes. Les fleurs périphériques sont liguliformes, celles du centre sont tubulaires. Les fruits sont des akènes velus à aigrette grisâtre.



Figure 3 : *Inule Visqueuse* (fleur -feuille)

### 1.4. *Inula Montana*

#### ➤ Position systématique [15-16]

<b>Embranchement :</b>	Phanérogames ou Spermaphytes
<b>Sous embranchement :</b>	Angiospermes
<b>Classe :</b>	Endicots
<b>Sous classe :</b>	Astéridées
<b>Ordre :</b>	Astérales
<b>Famille :</b>	Astéracées ou Composées
<b>Genre Espèce :</b>	<i>Inula montana</i> L
<b>Noms vernaculaires</b>	Boutelilis

Tableau 2: Taxonomie d'*Inula Montana*

### I.4.1. Description botanique

C'est une plante polymorphe à tige simple, blanchâtre laineuse de **15-35** cm qui porte des feuilles entières. Les inférieures atténuées en pétiole.

Gros capitules de **4-5** cm, solitaires au sommet de la tige, à grandes ligules jaunes et linéaires. Les bractées externes de l'involucre sont herbacées et lancéolées, les inférieures sont ciliées et linéaires. Les fleurs sont jaunes. Elle est assez commune en région méditerranéenne, qui croît sur les pentes rocailleuses arides des montagnes. La floraison est du moi de Juin à Juillet.



Figure 4 : *Inula Viscosa*

## II- Etude chimique

Les *Inules* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques; on reprend, à la suite, les principaux travaux réalisés sur les extraits et les H.Es obtenues à partir des principales espèces d'*Inules*.

### II.1. *Inule Visqueuse*

L'espèce de l'*I.Viscosa* est riche en métabolites secondaire. Ils ont fait l'objet de plusieurs travaux. On cite les travaux phytochimiques qui leurs ont été consacrés.

Une étude phytochimique effectuée sur la partie aérienne de l'espèce *I.Viscosa*. Cette étude à permis d'isoler :

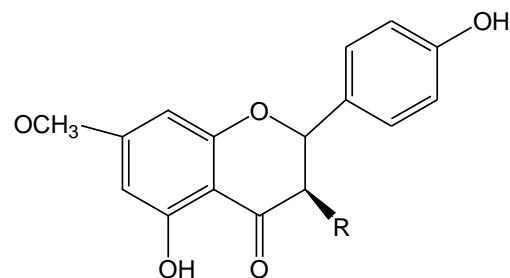
✓ Trois flavanones .Les structures ont été identifiées par les différentes méthodes d'analyses spectroscopique RMN H<sup>1</sup>et RMN C<sup>13</sup>[17]

flavanone

R = H Sakuranetin

R = OH 7-O-Methylaromadendrin

R = OCOCH<sub>3</sub> 3-Acetyl-7-O-methylaromadendrin



✓ Sesquiterpènes qui ont été identifié par l'analyse spectrale RMN [18].

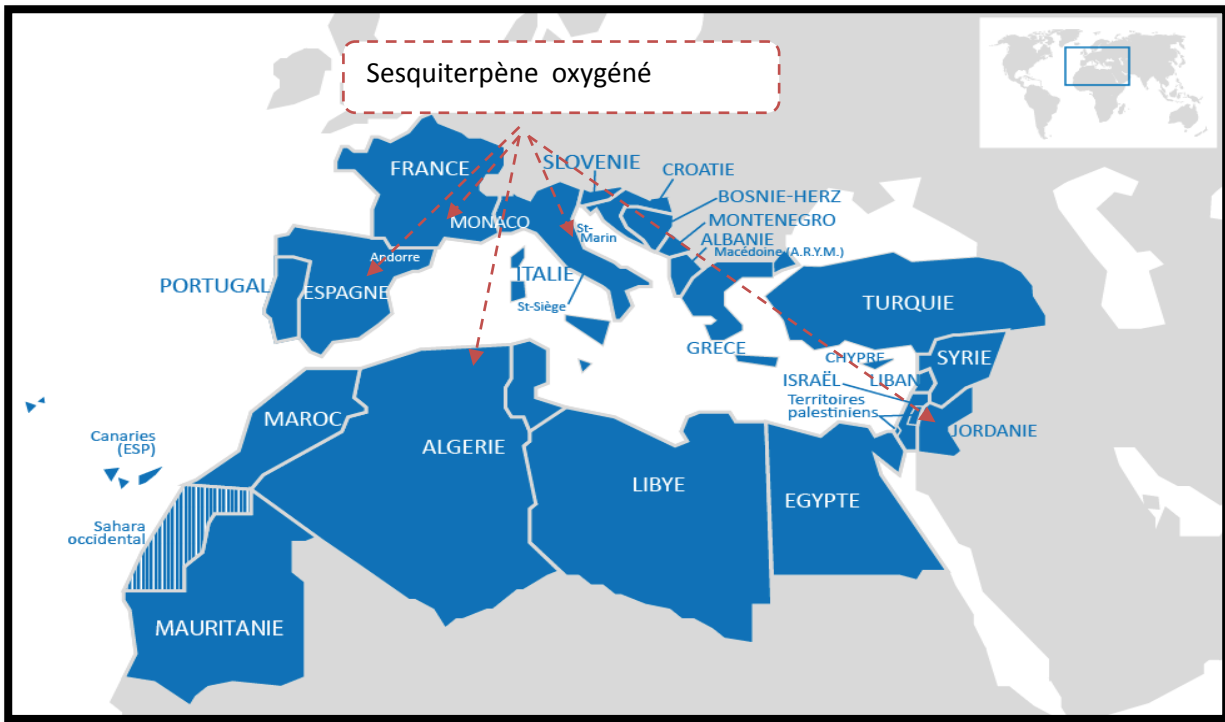




Les chercheurs	Pays	Année	Méthodes	Composés majoritaires
Imad Eddine et al	Algérie	2011	Hydrodistillation  Distillation	12-carboxyeudesma-3,11(13) diène (28.88%) ; acide linoléique (7.80%). 12-carboxyeudesma-3,11 (13) diène (56.81%); pentacosane (2.31%).[20]
Mahmoud et al	Jordanie	2010	Hydrodistillation	Fokienol 20.7% [21]
NICOLINODE et al	Italie	2002	Hydrodistillation	12-Carboxyeudesma-3,11(13) diène 62.37% [22]
Marie-Cécile et al	France	2006	Hydrodistillation	Fokienol 21.1% [23]
Sílvia M. Albano et al	Spain	2012	Hydrodistillation	Trans-nerolidol 8% [24]

**Tableau 3** : la composition chimique d'huile essentielle

D'après les données bibliographiques, l'*I. Viscosa* est riche en sesquiterpène oxygéné.



**Figure 7** : carte géographique de la répartition du sesquiterpène oxygéné

D'autre part, l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique a été évaluée par la méthode de DPPH et le test d'ABTS<sup>+</sup>, Les résultats révèlent un pouvoir antioxydant très fort de l'ordre de (IC<sub>50</sub> =40 µM) ; (IC<sub>50</sub> =30 µM). [25]

## II.2. *Inula Montana*

*I. Montana* est une espèce très peu étudiée chimiquement. D'après les données bibliographiques.

**Gonzalez-Romero et al., (2000)** ont pu isoler, à partir la partie aérienne d'*I. Montana* cinq lactones sesquiterpéniques (isoinuviscolide, gaillardine, 1 betahydroxy-3beta-acetoxy-eudesme-4(15) ,11(13)-dien-12-8beta-olide, pulchelline-C et pulchelline- E). [26]

D'autre part, l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique a été évalué par la méthode de DPPH. Les résultats révèlent un pouvoir antioxydant. (IC<sub>50</sub> =0.63mg/ml).[27]

## **CHAPITRE III**

*« Les métabolites secondaires »*

## I-INTRODUCTION

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante. La plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires.

La pharmacodynamie (discipline qui étudie l'effet des médicaments sur l'organisme) est utile pour justifier l'activité des principes actifs isolés ou associés. Par ailleurs, pour toute utilisation de plantes, il faut recourir soit à des médecins soit à des pharmaciens compétents dans ce domaine [28].

Les métabolites secondaires peuvent être classés en 3 principales familles : les alcaloïdes, les terpènes, et les polyphénols.

### *Les terpènes*

Les terpènes (= Terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. L'étude de leur métabolisme connaît un regain d'intérêt par suite du développement des méthodes analytiques auxquelles est venu s'ajouter l'outil moléculaire [29]. Ce sont des métabolites secondaires résultant de la condensation d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone. A ce jour, avec plus de 30000 molécules identifiées, les terpènes constituent l'une des plus polymorphes et des plus grandes familles de composés naturels. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre :

- **Monoterpènes** qui comptent deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone
- **Sesquiterpènes** qui contiennent 3 unités isoprènes soit 15 atomes de carbone
- **Diterpènes** qui comportent 4 unités isoprènes soit 20 atomes de carbone
- **Sesterpènes** qui comptent 25 atomes de carbone
- **Triterpènes** qui comportent 30 atomes de carbone
- **Tétraterpènes** qui contiennent 40 atomes de carbone

### *les alcaloïdes*

En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20% des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Ils ont une nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. La médecine les emploie le plus souvent à l'état pur et leur véritable valeur ne s'affirme qu'entre les mains du médecin car ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques.

### *Les composés phénoliques*

#### **I.3.1.Introduction**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [30]. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) [31]. Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées [30].

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. [31]

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules tracées jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) [31]

### *3.2 Classification*

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- Les flavonoïdes.
- Les tanins.
- Les stilbènes.
- Les lignanes et les coumestanes.
- Autres phytoestrogènes.
- Les saponines (triterpénoïde).

#### **1.3.2.1. flavonoïde**

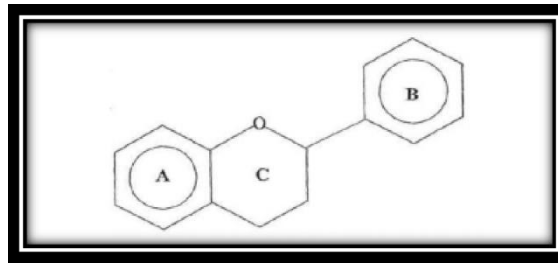
Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange [32], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus*=jaune) [33,34].

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en **1814**, mais ont été réellement découverts qu'en **1930** par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes [35].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [34,36]. Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits [37].

#### *❖ Structure chimique*

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [38]. Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 [39] en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [34].



**Figure 8** : schéma simplifié des flavonoïdes [40]

❖ *Classification*

**Tableau 4** : Principales classes des flavonoïdes [38]

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH <sub>3</sub>	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Isoflavones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
		Anth	H	OH	H
Isoflavones		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine



### ❖ *Distribution*

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens [41].

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux. On trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja. Les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes [42,32].

Le monde animal est très concerné par les flavonoïdes dont des chercheurs [43] ont isolé respectivement quinze et seize composés aromatiques à partir du lait de vache avec respectivement 6 et 5 composés importants dus principalement à la consommation des plantes par les herbivores.

On trouve aussi la chrysine, la quercétine, de la galangine dans les propolis ; sécrétion des bourgeons de nombreux arbres (le bouleau, le sapin, le saule...) récoltés par les abeilles, ces insectes les fabriquent en modifiant la propolis par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches [42].

Le tableau 5 représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments.

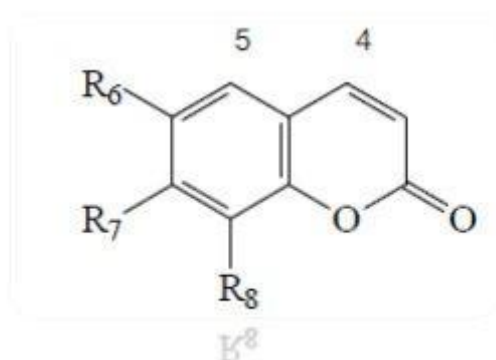
**Tableau 5** : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes [38].

<b>Flavonoïdes</b>	<b>Exemples</b>	<b>Aliments</b>	<b>Caractéristiques</b>
<b>FLAVONOLS</b>	Quercétine Kaempférol	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge,	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.
<b>Flavone</b>	Lutéoline Apigénine	Persil, céleri.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV, mobilité hromatographique et les réactions de coloration
<b>Flavanones</b>	Genisteine Daidzeine	Graines de soja et produits qui en dérivent.	Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.
<b>Flavan3-ols</b>	Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine	Vin rouge, thé noire, thé vert, cacao, chocolat	Flavan3ols ainsi que flavan3,4diols sont tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques
<b>Anthocyanidines</b>	Cyanidine Delphénidine	Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.	Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.

## Les coumarines

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide p-coumarique (**Figure 9**). Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants Organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Elles ont un spectre UV caractéristique.

Les coumarines (**Tableau 6**) présentent des effets cytotoxiques, antivirales, Immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), Hypotensives, elles sont aussi bénéfiques en cas d'affections cutanées. [44]



**Figure 9** : structure de base des coumarines [44]

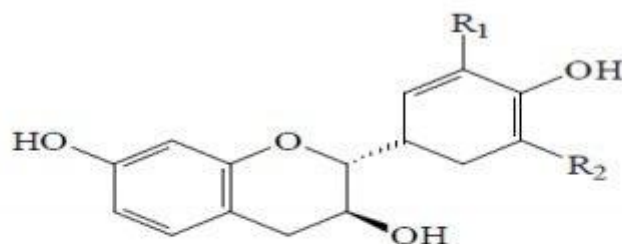
**Tableau 6**: Quelques exemples de coumarines

Nom de coumarine	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
Ombelliférone	H	OH	H
Herniarine	H	OCH <sub>3</sub>	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Scopanone	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Fraxéto	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH

## Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux et surtout les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Figure 10**) [45]. Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de

précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides. Ils sont abondants dans les organes végétaux jeunes. Deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique sont distingués : les tanins hydrolysables et les tanins vrais (non hydrolysables). Certains tanins auraient des propriétés anti-oxydantes et bactériostatiques [46].



$R_1 = R_2 = H$  : Afzéléchol

$R_1 = OH$  ;  $R_2 = H$  : Catéchol

$R_1 = R_2 = OH$  : Gallocatéchol

**Figure 10** : Structure de base des tanins.

#### ❖ *Les tanins hydrolysables*

Les tanins hydrolysables sont des esters du glucose et d'acides phénols que sont l'acide gallique (tanins galliques) et l'acide éllagique (tanins éllagiques). Leurs polymères sont appelés des tannoïdes. Ils sont caractéristiques des Angiospermes dicotylédones [46]

#### ❖ *Les tanins non hydrolysables*

Les tanins vrais, non hydrolysables sont des polymères de flavonols (catéchols) et de proanthocyanidols qui donnent par ébullition avec les acides minéraux dilués des composés insolubles amorphes et de couleurs rouges appelés phlobaphènes ou rouge de tanins [46].

# **Chapitre IV**

**«LES HUILES ESSENTIELLES »**

## I- -Historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C [47] Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques.

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice Gattefosse a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches [48].

## II-Définition

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16<sup>ème</sup> siècle par le médecin Suisse Paracelsus Von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel [49]. De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. D'après William Naves [1874-1936], aucune des définitions des huiles essentielles n'a mérité de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme « des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passent avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau » [50].

Cette définition a été reprise à peu de choses près par AFNOR et ISO : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » [51,52].

Pour certains auteurs comme Carette (2000), il est important de distinguer huile essentielle et essence ; cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme

végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée. En revanche, une huile essentielle est un extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenu par distillation par la vapeur d'eau, c'est-à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée.

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique [53,54]. Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent, en particulier les Labiées, les Ombellifères, les Myrtacées et les Lauracées [55].

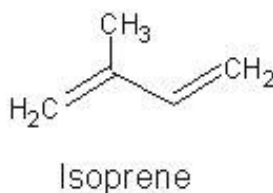
Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs [53, 56,57]. Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et/ou les graines [58,59].

### III- Chimie des huiles essentielles

#### III.1. Composition chimique

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvé en tant que composé majoritaire dans quelques unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc... Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés. De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques.

Les composés terpéniques sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonés (C5) ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène).



**Figure 11** : Structure de l'unité isoprénique

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné,

constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés [60].

Selon **Mailhebiau (1994) [61]**, cette structure varie en fonction :

- ❖ Nombre d'atomes de carbone qui la constitue.
- ❖ Caractère saturé ou insaturé des liaisons, et leur agencement : linéaire ou cyclique.
- ❖ La configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...).
- ❖ La nature des groupes fonctionnels : terpènes, alcools terpéniques, cétones, phénols.

**Tableau 7:** Nomenclature des terpènes [62]

Nombre d'atomes	Unité d'isoprène	Nomenclature
10	2	Monoterpènes (C10)
15	3	Sesquiterpènes (C15)
20	4	Diterpènes (C20)
25	5	Sesterpènes (C25)
30	6	Triterpènes (C30)
40	8	Tétraterpènes (C40)

### III.2. Utilisation des huiles essentielles [63]

Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que:

#### III.2.1. En pharmacie

Les H.Es peuvent être utilisés comme:

- l'aromatization des médicaments destinés à la voie orale.
- pour leurs actions physiologiques (Menthes, Verveine, Camomille).

#### III.2.2. Dans l'industrie

##### ❖ Parfumerie et cosmétologie

De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines H.Es constituent des bases des parfums. Exemples: Rose, Jasminen etc....

##### ❖ Alimentation



Les H.Es (huile de citron, de menthe, de girofle) sont très utilisées dans l'aromatisation des aliments (jus de fruits, pâtisserie).

## **IV- Extraction des huiles essentielles**

### **IV.1.historique**

Depuis longtemps, les hommes avaient cherché le moyen de séparer les éléments huileux des produits aromatiques. Ils réussirent en soumettant la matière à l'action de la chaleur. Les substances aromatiques étaient transformées en vapeur ; il suffisait de les recueillir et de les refroidir pour les obtenir sous forme liquide.

Ce procédé qui se faisait à feu nu, prit le nom de distillation. Il était certainement connu des Chinois et des Indiens depuis 20 siècles avant J.C. Les Egyptiens et les Arabes ont prévalu des caractéristiques médicinales et aromatiques des plantes : la conservation des momies, l'aromatisation des bains, la désinfection des plaies avec les onguents, les parfums et la fabrication des boissons aromatiques [63]

### **IV. 2.Méthode d'extraction**

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques [52,64].

Les huiles essentielles sont extraites principalement par les méthodes suivantes :

#### **IV.2.1. L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation (HD) est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une huile essentielle [65] ; dans son principe, elle correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau ; l'ensemble est ensuite porté à ébullition, à pression atmosphérique (**figure 12**). Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées sous forme d'un mélange azéotropique. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation. Le système « Clevenger », préconisé par la pharmacopée européenne [66], permet le recyclage de la phase aqueuse du distillat dans le bouilleur par cohobage [Clevenger, 1928]. Ainsi, l'eau et les molécules volatiles sont séparées, par leurs différences de densité, dans l'essencier en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageante (huile essentielle). La durée d'hydrodistillation, de trois à six heures en fonction de la matière végétale à traiter, peut avoir une influence sur le rendement en huile essentielle

et sur sa composition chimique

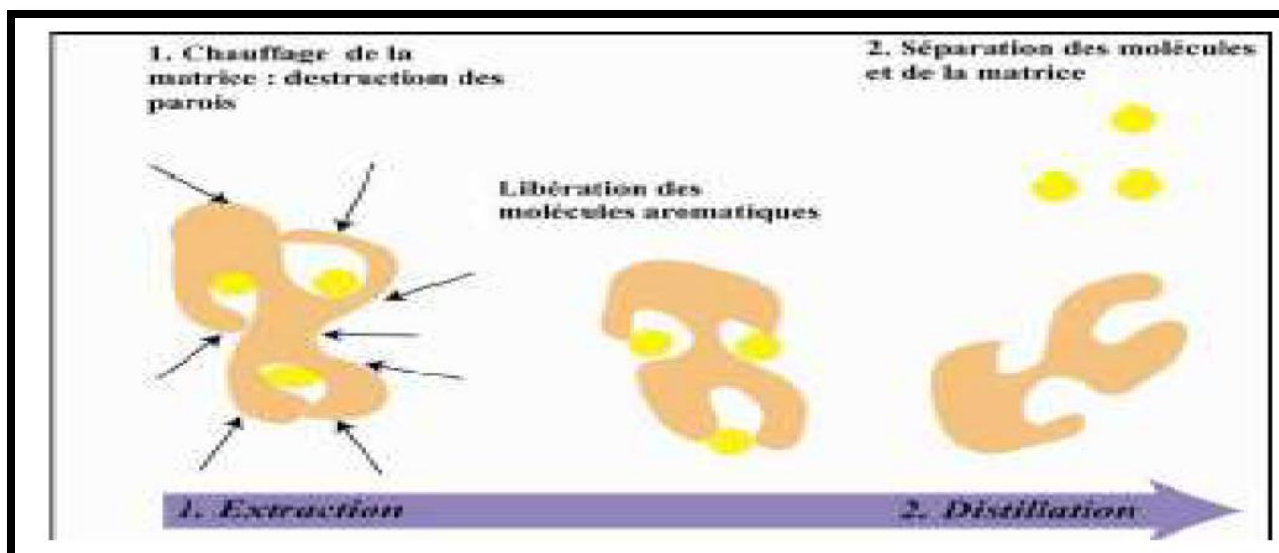


**Figure12** : Hydrodistillation à l'aide d'un système de type Clevenger.

#### **IV.2.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles des plantes aromatiques. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter [67]. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle »

**Figure 13.**Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique (l'huile essentielle).L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile[68]. Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quelque soit le « type » d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est explicité dans la **Figure13**



**Figure13** : Les étapes de l'extraction des huiles essentielles [68]

### **V- Méthodes d'analyses des huiles essentielles**

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants [69].

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

#### **V.1. Chromatographie en phase gazeuse(CPG)**

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une H.E, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative.

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile est une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte [70].

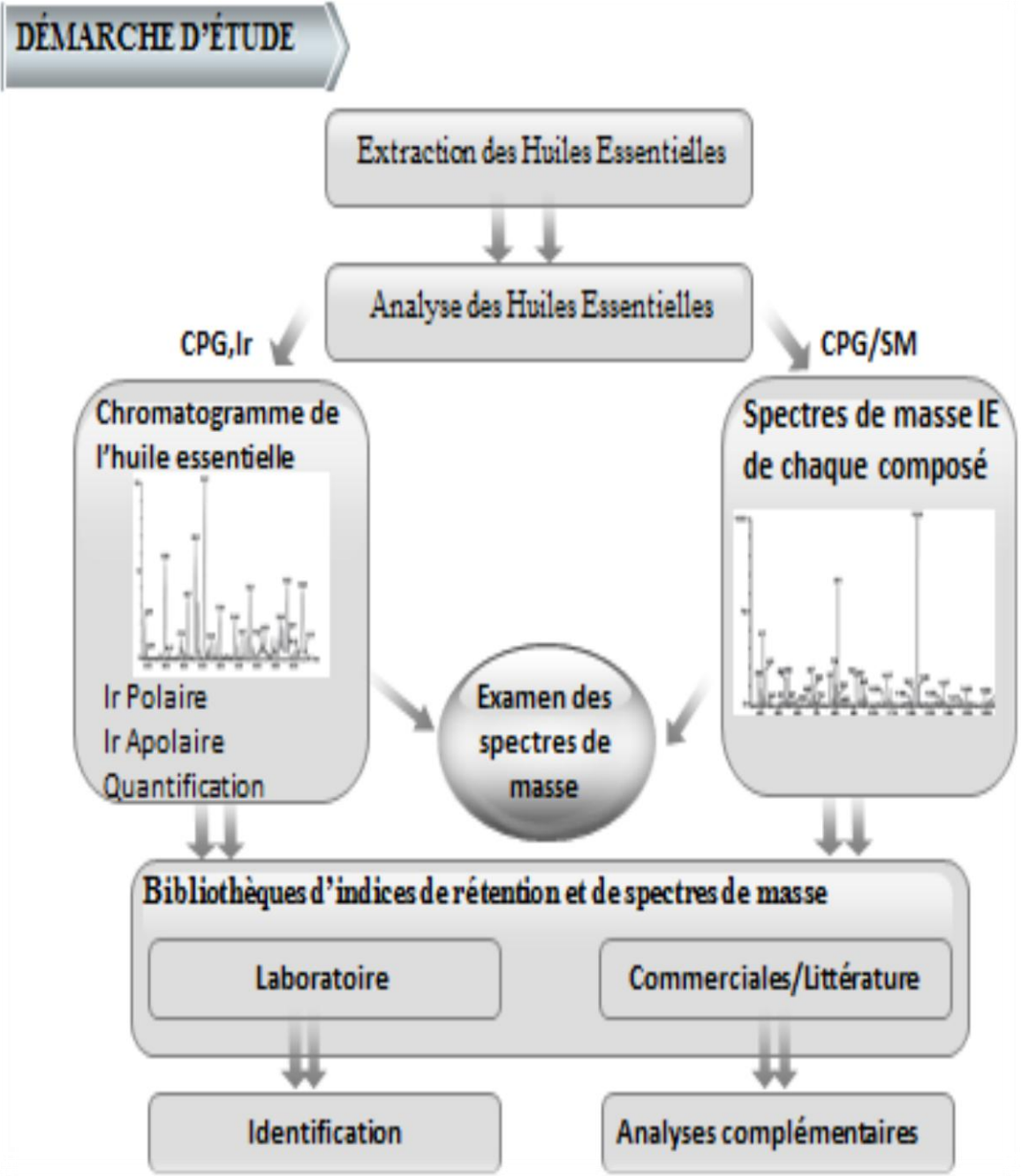
Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé.

## V.2.Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence. Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes

- ❖ **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ
- ❖ **Accélération** : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- ❖ **Séparation** : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge
- ❖ **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
- ❖ **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.



**Figure 14** : Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.

# Chapitre v

Activités biologiques

## Activite antioxydante

### I.1. Introduction

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. La méthode qualitative, utilisée pour repérer l'activité antioxydante des composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (**Li et al, 1999**).

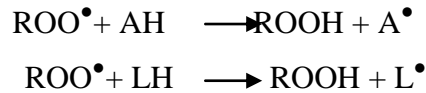
D'autres méthodes, moins pratiques, nécessitent la pulvérisation successive de deux solutions différentes. Une méthode à phase inversée de la chromatographie (CCM), combinée avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (**Maamri, 2008**)

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est directement reliée avec l'oxydation dans les nourritures et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent le balayage des radicaux de superoxyde ( $O_2$ ) ; le balayage de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ; le balayage d'acide hypochloreux (HOCl) ; le balayage du radical d'hydroxyle (OH) ou le balayage du radical de peroxyde (ROO) (**Maamri, 2008**).

La plupart des méthodes sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant (**Belkheiri, 2010**)

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

Selon **Huang et al, (2005)**, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro peuvent être divisées en deux grandes catégories suivant les réactions mises en jeu : Les tests basés sur le transfert d'un atome d'hydrogène dans lequel l'antioxydant et le substrat sont en compétition pour les radicaux peroxydes ROO•



Il existe de nombreuses méthodes de mesure de l'activité antioxydante (**Diouf et al, 2006**).

## I.2. Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante

### ➤ Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure activité antioxydant des composés phénoliques (**Blois, 1958 ; Brand-Williams et al, 1995**). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (**Molyneuxs, 2004**).

### ➤ Réduction de fer : FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le  $\text{Fe}^{2+}$  à un pH faible forme un complexe avec la 2, 4,6-tris (2-pyridyl)-1, 3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en  $\text{Fe}^{2+}$  (**Benzie et Strain, 1996 ; Pulido et al, 2000**). Ce test nous servira à évaluer l'activité anti-oxydante des composés purs uniquement.



## II- Activite antimicrobienne

### II.1.Introduction

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes qui sont présents dans l'air, dans le sol, dans les eaux douces, dans les eaux marines, à la surface de la peau et les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif, de l'arbre respiratoire et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes sont constitués par les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ils sont soit des hôtes naturels de l'homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), soit ils déterminent une infection et donc pathogènes.

Le monde bactérien est très vaste et les bactéries peuplent notre environnement. Elles assurent à la surface du globe, sur le sol et dans les eaux d'innombrables fonctions; elles exercent des actions bénéfiques (ex: bactéries fertilisantes du sol), mais d'autres peuvent provoquer des infections chez les plantes, les animaux et également chez l'homme [Khiati M (1998) **Guide des maladies infectieuses et parasitaires. OPU, Alger**]

### II.2.Techniques d'évaluations de l'activité antibactérienne

#### ➤ Méthode de l'aromatogramme

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme (**Abdesslam, 2006**), elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme (**Jacob, 1979**), méthode de VINCENT (**Pibiri, 2006**), méthode de diffusion dans la gélose (agar) (**Razakarivony et al., 2009**). Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'action antibactérienne. Elle permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle donnée. Elle peut être aussi adaptée pour tester d' autres agents antimicrobiens (**Wilkinson, 2006**).

#### ➤ Méthode de dilution

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice (CMI). Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Oussou et al., 2008; Derwich et al., 2010**).

**DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE**

# **Chapitre VI**

**MATERIALS ET METHODES**

## I-Matériels végétales

La matière végétale utilisée au cours de cette étude est récolté au mois de mars 2014 dans différents régions de l'ouest algérien (**figure 15**). L'identification des espèces végétales a été réalisée au niveau de deux laboratoires, Laboratoire de Biologie végétale et Laboratoire de Recherche Ecologie et gestion des Ecosystèmes naturels.

On rapporte ci-dessous les coordonnées des sites de récoltes pour chaque espèce :

➤ *Inule Visqueuse*

**Tableau 8:** Caractéristiques géographiques et bioclimatique *I.Viscosa*

<b>Nedrouma</b>	650	35°0'	1°73'	Semi-aride à hivers tempéré
<b>Mansourah</b>	1031	34°52'	1°20'	Semi -aride
<b>Ain fezza</b>	1000	34°50'	1°17'	Semi-aride
<b>Ain T'émouchent</b>	143	35°17'	1°22'	Semi -aride
<b>Honaine</b>	380	35°05'	1°27'	Semi-aride à hivers frais

(m) : mètre

➤ *Inula Montana*

**Tableau 9 :** Caractéristiques géographiques et bioclimatiques *I.Montana*

Région	Altitude(m)	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Oum el Alou	1022	34°49'	1°16'	Semi-aride tempéré

(m) : mètre

Les plantes ont été séchés à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelque jours. Une fois séchées les trois parties de la plante ont été réduites en poudre puis soumises à l'extraction.

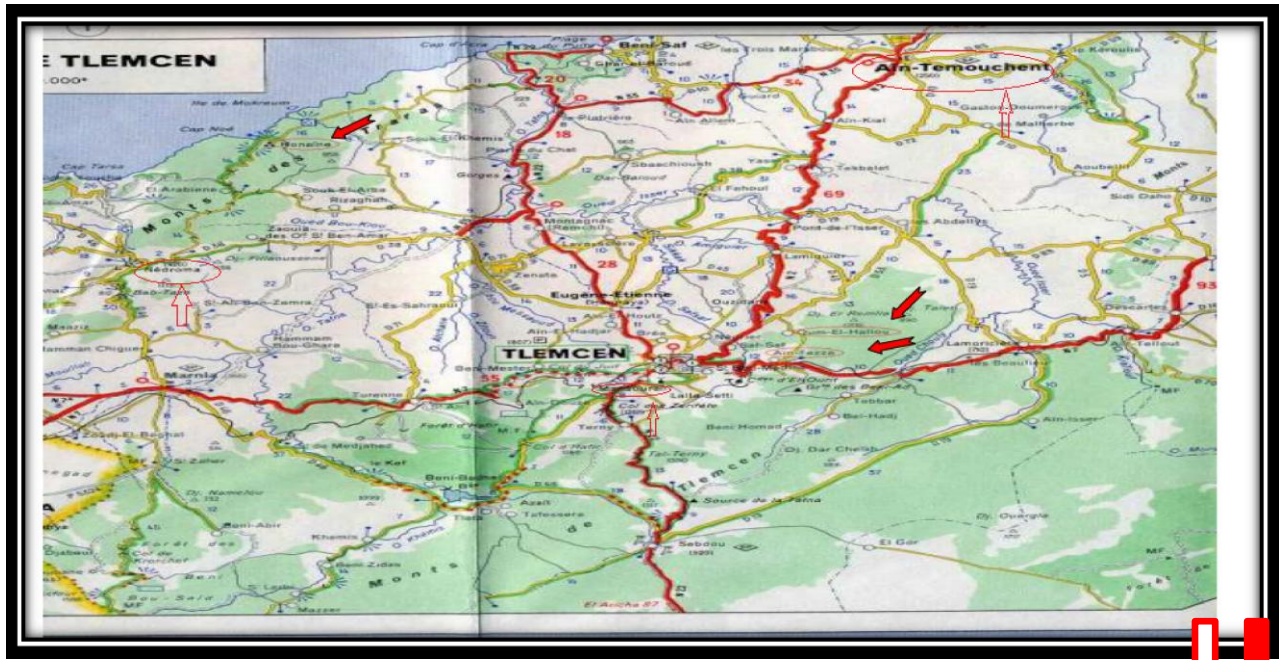


Figure 15

## II-Extraction de l'huile essentielle

### II.1.L'hydrodistillation

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'une chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, un ballon en verre où l'on place la matière végétal séchées et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon

#### ✓ Technique

350 g de la matière végétal sèche sont mises dans un ballon à fond rond, additionnées de 4 L d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant environ 4 heures. L'H.E est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile essentielle obtenue est gardée au réfrigérateur à 4 °C et à l'obscurité.



**Figure 16** : Montage de l'hydrodistillation.

### *II.2. Le rendement*

Le rendement d'une extraction se calcule par le rapport entre la masse de huile essentielle extraite et la masse de la matiere vegetale.

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$RHE (\%) = M'/M \times 100$$

## **III- Caractérisation des huiles essentielles**

L'analyse de la partie volatile est réalisée par les techniques suivantes

### ➤ 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 (60m x 0,22mm d.i, épaisseur du film 0,25µm) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (1mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C.

La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 45 mm à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µL. Pour chacun des composants, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

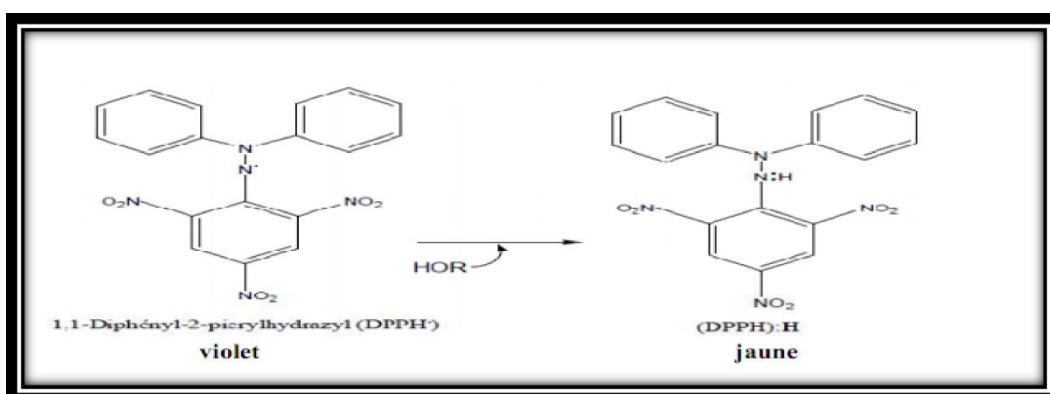
#### ✓ Couplage CPG/Spectrométrie de masse

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.

#### IV- aluation de l'activité anti-oxydante

##### IV .1. Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH<sup>•</sup> (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH<sup>•</sup> est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Figure 17**). [88]



➤ *Mode opératoire*

Une solution éthanolique de 27 µl/ml de DPPH° est mélangée avec différentes concentrations des H.E et l'hydrolat. On met de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai puis on ajoute 1mL de solution de DPPH, après incubation à l'obscurité pendant 30 min à la température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometer, optizen pop)

➤ *Expression des résultats :*

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

$$\% \text{ DPPH réduit} = [(\text{DO contrôle} - \text{DOE}) / \text{DO contrôle}] \times 100$$

DOcontrôle : absorbance du DPPH à t0.

DOE : absorbance après ajout de l'échantillon à tester.

#### IV .2.Méthode de la réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm [89]. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [90].

➤ *Mode opératoire*

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par Oyaizu (1986). En effet, 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) à 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml  $\text{FeCl}_3$  (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometer, optizen pop)

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

➤ *Expression des résultats*

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

*V-valuation de l'activité antimicrobienne*

L'activité antimicrobienne a été déterminée par deux méthodes :

➤ *Méthode de diffusion ou des aromatogrammes*

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle. La sensibilité des souches à l'huile essentielle a été testée par la méthode décrite par **Bauer et Kirby**. une culture de 18 h testées sur bouillon Müller-Hinton a été préparé à une concentration de  $10^8$  UFC/ml, ensuite ensemencé sur gélose Müller –Hinton. Un disque de 6mm de diamètre stérile imprégnée avec 10µL d'huile a été placé au centre de la plaque inoculée [91].

➤ *Méthode de dilution*

La concentration minimale inhibitrice a été calculée par la méthode de microplaque. L'huile a subi une dilution successive par  $\frac{1}{2}$  dans des tubes contenant le bouillon Müller-Hinton par l'ajoute de tween 80 à une concentration de 1%(v/v) pour obtenir une solution homogène .on a préparé une seconde solution qui contient seulement le bouillon Müller –Hinton et de tween 80 à une concentration de 1%, cette concentration a été utilisée en tant qu'un blanc.

Les inoculums de 107 UFC/ml ont été dilués de 1/100 pour une concentration de 105 UFC/ml. sur les microplaques, 180 µl de la suspension bactérienne 105 UFC/ml ont été déposés à l'intérieur des puits. Ensuite 20µl des solutions des extraits ont été ajouté. la concentration finale du tween 80 dans chaque puits est 0.1% (v/v) et les concentrations finales de l'huile vari de 0.007% 4%.



## VI- Tests phytochimiques

Les espèces sélectionnées font l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents composés chimiques existant dans la plante. Deux solvants de polarités différentes (eau, éthanol) ont été utilisés, au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration.

### ➤ Extraction par solvants organique (soxhlet)

L'extraction est conduite dans un extracteur de type soxhlet. La partie de la plante étudiée a été séchée et broyée, 25g de la matière végétale est placée dans une cartouche en papier filtre, elle doit être fermée pour empêcher l'organe de la plante d'être emporté par les

solvants (éthanol et l'eau), le tout est mis au fond du siphon. Dans un ballon, on introduit 250 ml de solvant et des fragments de pierre ponce. La durée d'extraction est de 9 heures. Le mélange est filtré et l'extrait est soumis aux tests suivants.



**Figure 18** : la matière végétale sèche

Les essais phytochimiques sont menés en utilisant les méthodes usuelles décrites pour la plupart par **Harborne (1998)** :

- Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes sont mis en évidence par la réaction à la cyanidine.
- La caractérisation des tanins est faite par la réaction au chlorure ferrique.
- La recherche des alcaloïdes est réalisée à l'aide des réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes. Deux réactifs voire trois sont utilisés à savoir le réactif de Dragen dorff, le réactif de Mayer et le réactif de Wagner.
- La recherche des saponosides est basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses contenant des saponosides de mousser après agitation.
- La recherche des stérols et des terpènes peut être réalisée par la réaction de Liebermann -Burchard. [92]

### **I-Composition chimique de l'H.E des parties aérienne d'*I.Viscosa***

L'espèce de l'*I.Viscosa* a été récoltée dans les stations de Nedrouma et Ain Témouchent pendant le mois d'avril 2013. Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger avec un rendement 0.05- 0.09%.

L'analyse chromatographique (CPG-Ir & CPG/SM) des huiles essentielles des deux stations S1 (Nedrouma) et S2 (Ain Témouchent) a permis d'identifier 58 composés, représentant 91.1% à 54.5% de la composition totale des huiles essentielles. Les identifications sont établies au Laboratoire de l'université de Corse et à l'aide des bibliothèques commerciales.



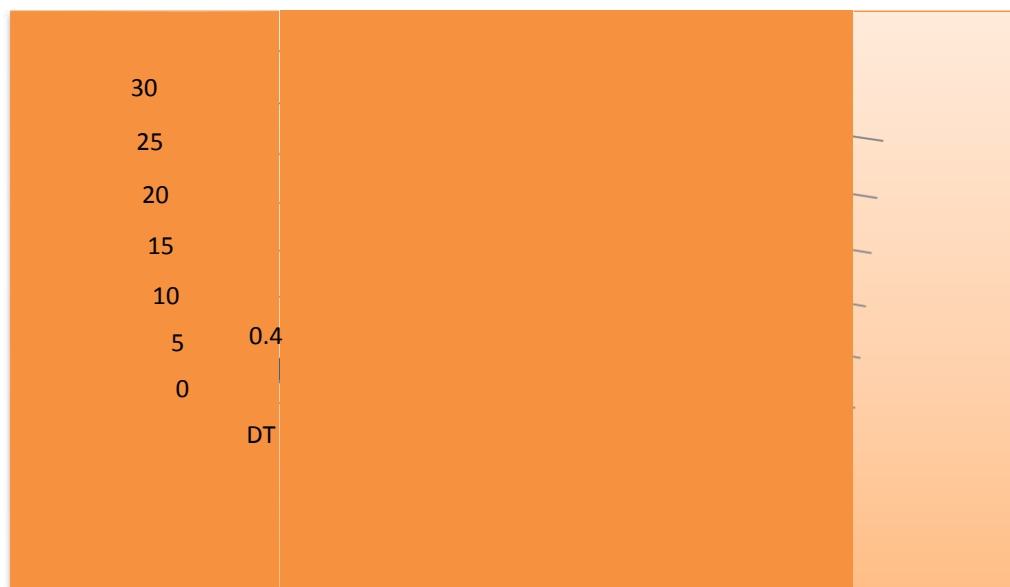
**Figure 19** : situation des zones d'étude

Les résultats des analyses sont regroupés dans le Tableau 10 ci-dessous :

N°	Composés	TR	S1(%)	S2(%)
1	$\alpha$ -pinene	14.36	35.39	
2	Sabinene	16.10	2.43	
3	$\beta$ -pinene	16.38	1.51	
4	mycene	16.91	2.93	
5	$\alpha$ -phellandrene	17.77	1.84	
6	p-cymene	18.64	1.27	
7	$\beta$ - phellandrene	19.22	37.76	
8	$\gamma$ -terpinene	20.84	1.60	
9	linalool	22.68	0.42	
10	Terpinen-4-ol	27.91	0.46	
11	myrtenol	28.60	0.11	
12	Bornyl acetate	34.97	1.36	
13	E- $\beta$ -caryophyllene	43.83	1	3.72
14	Caryophyllene oxyde	52.61	1.25	
15	$\beta$ -eudesmol	56.35	0.14	6.95
16	Epi- $\alpha$ -bisabolol	58.19	1.63	0.98
17	nonanal	22.54		0.07
18	$\gamma$ -terpinolene	28.38		0.45
19	decanol	29.10		0.29
20	tridecene	35.54		0.24
21	Theaspirane I	35.97		0.20
22	Cis-3-hexenyl tiglate	36.83		0.45
23	Theaspirane II	37.22		0.02
24	Geranyl acetone	44.55		0.11
25	Guaia-6,9-diene	45.04		0.91
26	$\alpha$ -humulene	45.79		1.14
27	alloaromadendrene	46.32		0.47
28	$\alpha$ -curcumene	46.97		0.14
29	$\gamma$ -muurolene	47.20		0.85
30	Gemacrene	47.58		0.07
31	Cis- $\beta$ -guaiene	47.82		1.19
32	ledene	48.31		0.23
33	$\alpha$ -muurolene	48.70		0.13
34	$\gamma$ -cadinene	49.06		0.17
35	$\beta$ -curcumene	49.25		0.08
36	Cis/trans calamenene	49.38		0.16
37	cadinene	49.57		0.61
38	E-nerolidol	51.38		0.27
39	Cis-3-hexenyl benzate	51.61		0.62
40	spathulelenol	51.90		0.81
41	Caryophyllene oxyde	52.91		11.50
42	globulol	53.36		4.33
43	copaborneol	53.80		0.21
44	$\beta$ -oplapenone	54.04		0.36
45	Humulene epoxyde II	54.23		0.76
46	aromadendrene	55.18		2.42
47	$\gamma$ -eudesmol	55.56		0.69
48	Epi-cubenol	55.69		1.57
49	$\alpha$ -eudesmol	55.83		1.23



Concernant l'huile essentielle de la partie aérienne du *I. viscosa* (S2), les résultats mentionnés dans le Tableau 11, permettent de tracer l'histogramme 2.

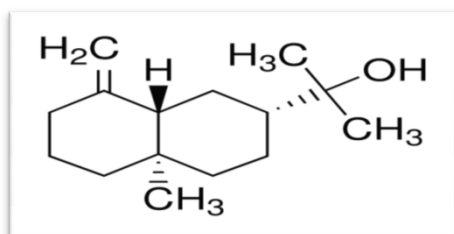


**Histogramme 2 :** Composition chimique de l'huile de *I.Viscosa*

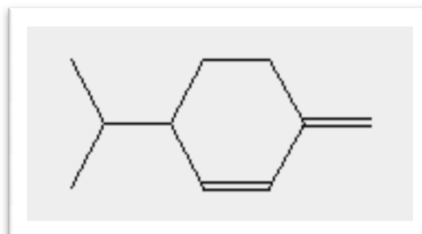
L'histogramme 2 montre les classes de composés caractéristiques de l'huile essentielle d'*I.Viscosa* (S2). Cette huile essentielle est proportionnellement composée de sesquiterpènes oxygéné (27,16%) avec  $\beta$ -eudesmol (6.95%) comme composé majoritaire, sesquiterpènes hydrocarbonés (24.48%) le composé principal est l'oxyde de caryophyllène (11.50%) ; Les oxygénés non terpéniques (1.47 %).

On révèle, en outre, la faible présence de ces deux classes ci-dessous:

- Mono terpènes oxygéné (0.74%)
- Diterpène (0.41%).



**Figure 21 :**  $\beta$ -eudesmol



**Figure 20 :**  $\beta$ - phellandrene

---

Après avoir réalisé une série d'analyses, on a constaté que la composition de l'*I.Viscosa* n'est pas la même entre Ain Temouchent et Nedrouma. On comparant nos résultats avec les travaux déjà fait dans différents endroits dans le monde, on remarque aussi une différence de composition et cela et dû aux facteurs environnementaux « sol- la température ... »

## *II-Composition chimique de l'H.E des parties aérienne d'I.Montana*

Les extractions des H.Es de la partie aérienne d'*Inula Montana* récoltée en mars 2013 dans la région de Tlemcen, sont réalisées par la technique d'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le rendement moyen obtenu est de l'ordre de 0,01%. L'analyse chromatographique (CPG-Ir & CPG/SM) de l'huile essentielle a permis d'identifier 35 composés, représentant 72.6% de la composition totale des huiles essentielles.

**Tableau 11** : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes *I. Montana*

N°	Composés	RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>d</sup>	%
1	tricyclene	920	922	1014	Tr
2	α-thujene	932	924	1025	Tr
3	<b>α-pinene</b>	<b>936</b>	<b>933</b>	<b>1025</b>	<b>32</b>
4	α-fenchene	941	943	1039	0,6
5	camphene	950	945	1061	0,3
6	<b>sabinene</b>	<b>973</b>	<b>967</b>	<b>1122</b>	<b>4,3</b>
7	β-pinene	978	972	1112	1,4
8	<b>myrcene</b>	<b>987</b>	<b>983</b>	<b>1160</b>	<b>3,3</b>
9	α-phellandrene	1020	999	1165	1,5
10	<b>3-carene</b>	<b>1050</b>	<b>1008</b>	<b>1150</b>	<b>9,6</b>
11	p-cymene	1050	1010	1266	0,5
12	<b>limonene</b>	<b>1050</b>	<b>1023</b>	<b>1201</b>	<b>4,3</b>
13	β-phellandrene	1030	1023	1209	1,4
14	(E)-β-ocimene	1010	1037	1247	0,7
15	γ-terpinene	1010	1049	1243	0,7
16	(E)-sabinene hydrate	1010	1053	1445	0,2
17	<b>terpinolene</b>	<b>1020</b>	<b>1080</b>	<b>1281</b>	<b>3,2</b>
18	(Z)-sabinene hydrate	1070	1084	1537	0,8
19	linalool	1030	1084	1549	0,2
20	3-octyl acetate	1130	1107	1330	0,2
21	veratol	1120	1113	1713	0,1
22	(Z)-verbenol	1070	1128	1642	0,3
23	lyratol	1100	1146	1778	0,1
24	terpinen-4-ol	1140	1162	1591	2
25	α-terpineol	1160	1181	1691	0,1
26	dihydro-neo-carveol III	1280	1212	1795	tr
27	linalylacetate	1290	1239	1552	0,2
28	(E)-anethole	1240	1261	1815	0,1
29	bornylacetate	1290	1269	1562	0,7
30	5-isopropyl-3methyl phenol	1270	1298	2258	tr
31	α-terpinylacetate	1350	1333	1686	1,8
32	(E)myrtanylacetate	1360	1370	1479	0,1
33	β-bourbonene	1360	1384	1518	0,1
34	β-elemene	1390	1386	1584	0,2
35	β-funebrene	1490	1411	1591	1,6
	d'identification %				72.6%

<sup>a</sup>Ordre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1) <sup>b</sup>RI<sub>lit</sub> : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de **König et Coll., 2001 et NIST, 2005**. <sup>c</sup>RI<sub>a</sub> : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique ; tr : trace (<0.05%) ; % : pourcentages des composés. Stations: TLEMCEN. Réf1, Composés identifiés à partir des données de la littérature **König et Coll., 2001**; Réf2, Composés identifiés des données du NIST

---

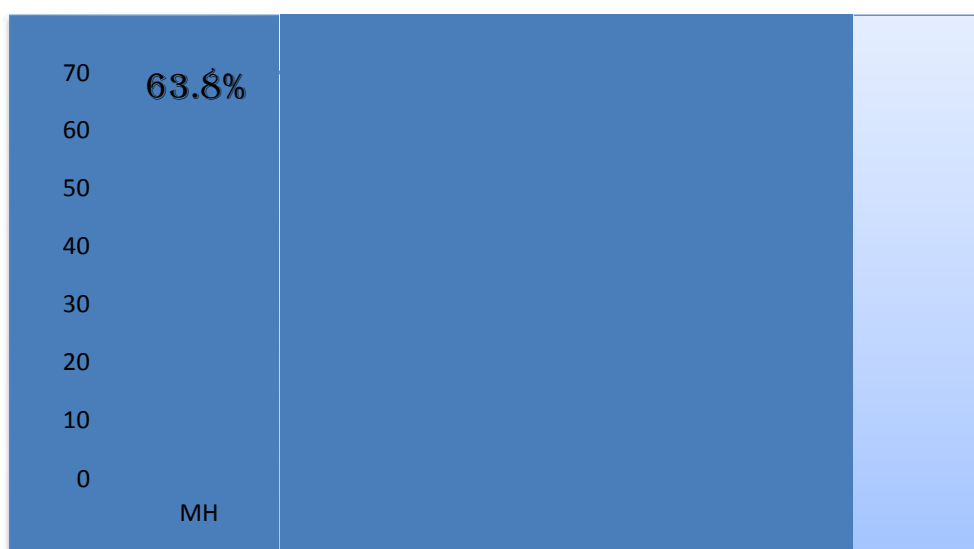
L'histogramme 3 montre les classes de composés caractéristiques de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*I. Montana*. Les analyses chromatographiques (CPG-Ir & CPG/SM) révèlent que :

L'huile essentielle de la partie aérienne de l'*Inula Montana*, est principalement dominée par la classe des monoterpènes hydrocarbonés (63.8%), On note que cette famille est caractérisée par l'abondance du  $\alpha$ -pinène (32%). Les monoterpènes oxygénés (3.9 %) sont nettement dominés par le terpinen-4-ol (2%).

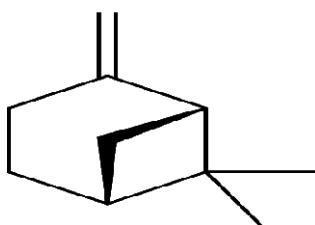
Une autre classe de composés présente dans l'huile essentielle est celle des sesquiterpènes hydrocarbonés (1.9%) qui sont nettement dominés par le  $\beta$ -funebrene (1.6%).

D'autres classes sont présentes telles que :

- Les oxygénés non terpéniques (3%) Cette classe est dominée par le  $\alpha$ -terpinylacetate (1.8%).



**Histogramme 3 :** Composition chimique de l'huile de l'*I. Montana*



**Figure 22 :**  $\alpha$ -pinène



### III-Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles

#### ➤ ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES

L'activité antioxydante des H.Es est évaluée par deux méthodes : le test de la réduction du radical libre du DPPH et le test de réduction du fer (FRAP). La comparaison et la validation des résultats sont effectués avec un contrôle positif utilisant l'acide ascorbique ET BHT.

#### ➤ Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le radical DPPH· est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire et la simplicité de l'analyse. L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH· à 517 nm, qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes :



L'activité antioxydante des H.Es de *L'Inula Viscosa* et *Inula Montana* est évaluée par la mesure des absorbances à différentes concentrations. La comparaison et la validation des résultats sont effectués avec un contrôle positif utilisant l'acide ascorbique.

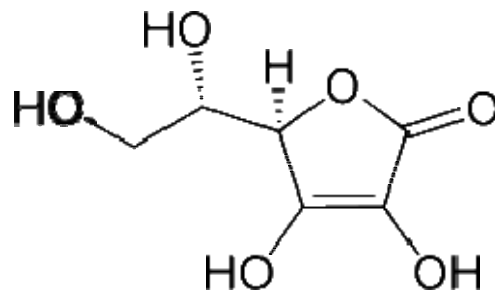


Figure 23 : structure de l'acide ascorbique

L'ensemble des résultats sont regroupés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : % inhibition de H.E d'*I.Viscosa* & *I.Montana* après 30 mn

Cc (mg/ml)	0.05	0.09	1.2	1.5	2	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
H.V	25.5	39.6	52.9	59.3	63.23	0.97
Cc (mg/ml)	0.05	0.062	0.072	0.08	0.09	0.066
H.M	36.9	47.5	53.4	59.2	68	
Cc(mg/ml)	0.04	0.05	0.06			0.049
AA	39	51	65			

A la lumière de la lecture des résultats mentionnés dans le Tableau 12 : on en déduit que l'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de différentes concentrations et du témoin acide ascorbique. L'huile essentielle de l'*I.Montana* pouvait ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC<sub>50</sub> de 0.066 mg/ml montrant une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique avec IC<sub>50</sub> 0.049 mg/ml. L'activité de l'huile de l'*Inula Viscosa* est plus faible parce que le pourcentage d'inhibition est de 25.5% à concentration de 0.05 mg/ml donc IC<sub>50</sub> est plus fort 0.97 %

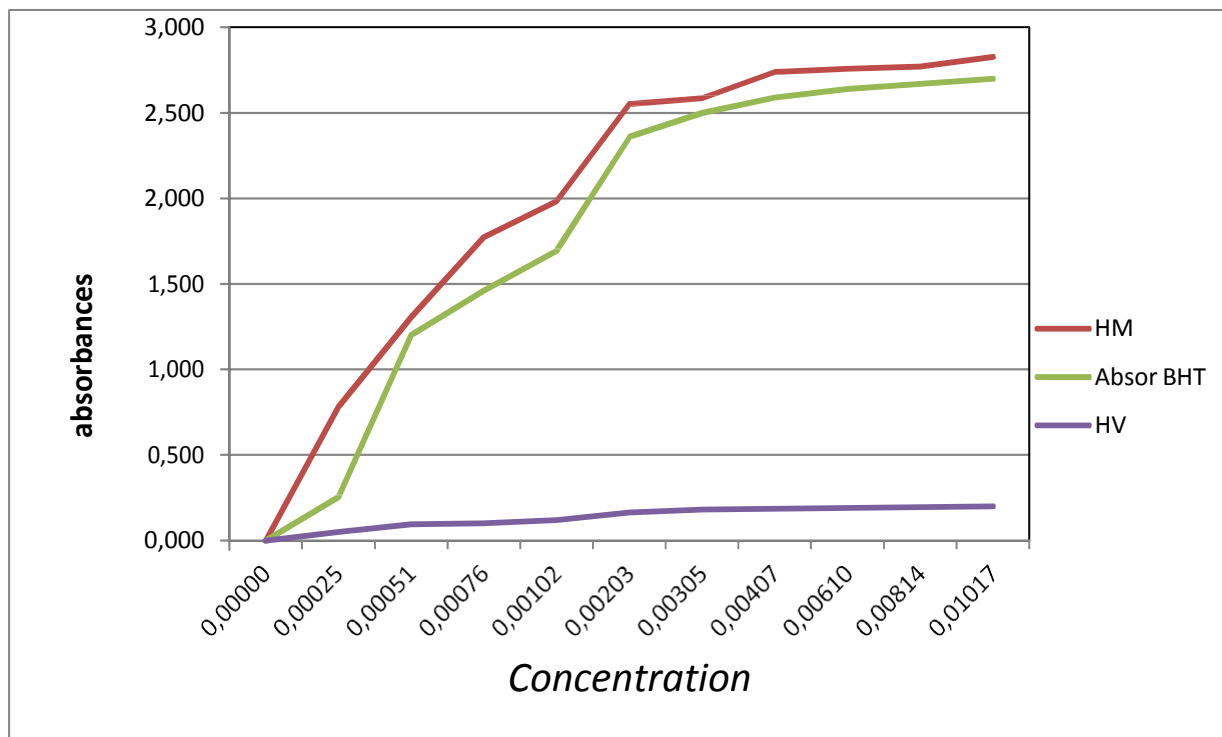
➤ *Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)*

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> en fer ferreux Fe<sup>2+</sup>. La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants. [93].

Concentration (mg/mL)	0,00000	0,00025	0,00051	0,00076	0,00102	0,00203	0,00305	0,00407	0,00610	0,00814	0,01017
Absor BHT	0,000	0,781	1,305	1,774	1,982	2,552	2,585	2,738	2,757	2,770	2,826
HM	0,000	0,254	1,200	1,460	1,693	2,360	2,500	2,590	2,640	2,670	2,700
HV	0	0,05	0,095	0,1	0,12	0,164	0,18	0,186	0,19	0,196	0,2

**Figure 24 :** Pouvoir réducteur des H.Es et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

Les résultats obtenus dans la figure 24, montrent que la capacité à réduire le fer est presque la même pour huile d'*Inula Montana* et elle est plus élevée par rapport huile d'I.



Viscosa qui a présenté une très faible activité avec des valeurs observées de densités optiques (DO) qui ne dépassent pas le 0.5mg/ml (DO=0.2) à une concentration de 0.01017 mg/ml. Donc l'inule montagne présente une activité anti oxydante intéressante par rapport BHT.

### 🔗🔗🔗-Évaluation de l'activité antibactérienne

Dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de microbiologie à l'agroalimentaire biomédical et à l'environnement Département de Biologie, Université de Tlemcen, on a évalué les activités antibactériennes des huiles essentielles étudiées vis-à-vis de huit souches bactériennes de référence.

➤ **Quatre bactéries à Gram positives** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 ; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ; *Bacillus cereus* ATCC 11778.

➤ **Trois bactérie à gram négative** : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 ; *Escherichia coli* ATCC 25922.

➤ **Levure** : *Candida albicans* ATCC 10231

**Tableau 13 : Activités antibactériennes des huiles essentielles**

Souches	<i>Huiles essentielles</i>			
	<i>Inula Viscosa</i>		<i>INULA Montana</i>	
	Diamètres D'inhibitions	CMI (mg/mL)	Diamètres D'inhibitions	CMI (mg/ml)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	/	6	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	9	/	6	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	/	6	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<b>8</b>	<b>4.00</b>	<b>10</b>	<b>0.25</b>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<b>7</b>	<b>2.00</b>	<b>7</b>	<b>1.00</b>
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778.	6	/	6	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6	/	6	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	6		6	

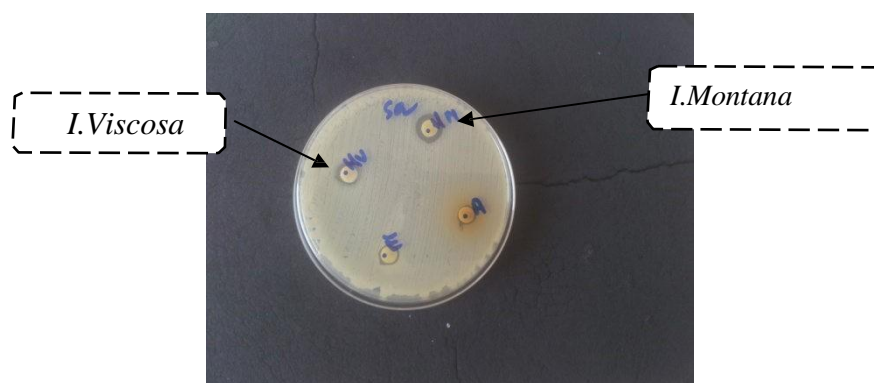
D'après le tableau nous constatons facilement que l'huile essentielle des *Inules* n'a pas une bonne activité, nous avons enregistré les plus grands diamètres d'inhibition allant de 7 à 10 mm et les CMI les plus intéressantes allant de 0.25 à 4 mg/ml.

L'huile d'*I. Viscosa* a montré une activité plus faible contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 avec un diamètre d'inhibition à partir de 7 et 8 mm et la CMI entre 2 à 4 mg/ml. par contre l'huile essentielle de l'*I. Montana* inhibe faiblement la souche *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 avec un diamètre de 7 mm et une concentration minimale inhibitrice de 1 mg/ml.

Les souches de Gram négative telles que : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 ; *Escherichia coli* ATCC 25922, et deux souche de Gram positive *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ; *Bacillus cereus* ATCC 11778. et *Candida albicans* ATCC 10231 (levure) ont été complètement résistant à cette H.E parce que ni diamètre d'inhibition ni CMI ont été observé.

L'huile de l'*I. Montana* a montré à une activité modeste contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec le diamètre de 10mm et la CMI égale 0.25 mg/ml (figure25)

## Résultat & interprétation



**Figure 25:** la zone d'inhibition de *Staphylococcus* par huile de l'*I.Montana* et *I.Viscosa*

### IV-Examen phytochimique

Dos nos jours, la découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remède thérapeutiques. ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à caractérisée les différents catégories de molécules existantes dans les palntes. ces dernières peuvent servir, non seulement , à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques, mais comme matériaux économiques.

Pour cela, nous avons soumis la parties aérienne de l'*I.Viscosa* et *I.Montana* aux tests phytochimiques. au cours de ces tests deux solvants de polarité croissante (ethanol, eau) sont utilisés. les résultats obtenus de la plante sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

#### ➤ **Tableau 14:** épuisement a l'éthanol

<i>Famille de composés</i>	<i>I.Viscosa</i>	<i>I.Montana</i>
<b>Alcaloïde</b>	+	+
<b>Flavonoïde</b>	++	++
<b>tanins</b>	++	++
<b>Composés réducteurs</b>	+	+
<b>stéroïde</b>	-	-
<b>coumarine</b>	-	-

#### **Tableau 15 :** épuisement à H<sub>2</sub>O

<i>Famille de comosés</i>	<i>I.Viscosa</i>	<i>I.montana</i>
<b>amidon</b>	-	+
<b>saponoside</b>	++	++
<b>Tanins</b>	+	+
<b>Alcaloïdes sel</b>	-	-

+++ : test très positif, ++ : test moyennement, + : test faiblement positif ; - : test négative.

A partir des résultats du screening phytochimique , nous pouvons conclure que :

les alcaloïdes sont très faiblement présents dans la partie de plante, Les flavonoïdes et les tanins sont caractérisés avec une dominance importante ; des tests positifs a liqueur de Fehling peuvent l'existence des composés réducteurs avec une quantité variable .les saponosides sont présent fortement dans les deux plantes, enfin les tests prouvent .absence des alcaloïdes sel, coumarines, stéroïde dans la partie aérienne de l'*I.Viscosa* et *I. Montana*. Les résultats montre que les deux plantes sont riche en composés polyphénols.

# **CONCLUSION GENERALE**

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydante et antibactérienne a concerné deux plantes, appartenant à la famille des astéracées très fréquemment employées en Algérie.

La composition chimique, des huiles essentielles extraites des parties aériennes de *Inula Viscosa* et *I.Montana* provenant de différentes stations de l'ouest d'Algérie, a fait l'objet d'une étude détaillée par une analyse chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG, Ir et CPG/SM).

L'huile essentielle de l'*I.Montana* est, également, étudiée pour la première fois. Elle renferme en majorité des monoterpènes hydrocarbonés (63.8%), On note que cette famille est caractérisée par l'abondance du  $\alpha$ -pinène (32%). Les monoterpènes oxygénés (3.9 %) sont nettement dominés par le terpinen-4-ol (2%).

L'étude de la variabilité interspécifique et intra spécifique de l'*Inule* Visqueuse sur les différentes stations réparties dans l'ouest d'Algérie. Les résultats des analyses des huiles essentielles en fonction de l'évolution végétative de la plante révèlent que la composition chimique des huiles essentielles des deux *Inules* varie, considérablement, par rapport à la période de la récolte.

Dans la seconde partie de cette étude, une évaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles obtenues est réalisée. L'activité antibactérienne des huiles essentielles est menée sur des souches ; Les résultats montrent que les huiles essentielles de l'*Inula Montana* sont actives contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. D'autre part, l'activité antioxydante des H.Es est également, testée avec deux méthodes, à savoir la réduction relative du radical (DPPH) et le test de réduction de fer (FRAP). Les tests montrent un pouvoir antioxydant intéressant des huiles essentielles de l'*Inula Montana*.



## LISTE DES FIGURES

**Figure 1 :** les *Inules*

**Figure 2 :** carte géographique de L'*Inule*

**Figure 3 :** *Inule Visqueuse* (fleur -feuille)

**Figure 4 :** *Inula Viscosa*

**Figure 5 :** Structures des sesquiterpènes isolés d'*Inula Viscosa*

**Figure 6 :** Structures des sesquiterpènes isolés d'*Inula Viscosa*

**Figure 7 :** carte géographique de la répartition du sesquiterpène oxygéné

**Figure 8 :** schéma simplifié des flavonoïdes

**Figure 9 :** structure de base des coumarines

**Figure 10 :** Structure de base des tanins

**Figure 11 :** Structure de l'unité isoprénique

**Figure12 :** Hydrodistillation à l'aide d'un système de type Clevenger.

**Figure13 :** Les étapes de l'extraction des huiles essentielles

**Figure 14 :** Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.

**Figure 15 :** carte géographique montrant les stations de récolte

**Figure 16 :** Montage de l'hydrodistillation.

**Figure 17 :** Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH•

**Figure 18 :** la matière végétale séchée

**Figure 19 :** situation des zones d'étude

**Figure 20 :**  $\beta$ - phellandrene

**Figure 21 :**  $\beta$ -eudesmol

**Figure 22 :**  $\alpha$ -pinène

**Figure 23 :** structure de l'acide ascorbique

**Figure 24 :** Pouvoir réducteur des H.Es et de l'acide ascorbique par la méthode FRAP

**Figure 25:** la zone d'inhibition de *Staphylococcus* par huile de l'*I.Montana* et *I.Viscosa*

# LISTE DES HISTOGRAMMES

**Histogramme 1 :** Composition chimique de l'huile de l'*I.Viscosa* (SI)

**Histogramme 2 :** Composition chimique de l'huile de l'*I.Viscosa*

**Histogramme 3 :** Composition chimique de l'huile de l'*I.Montana*

# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 :** Taxonomie d'*Inula viscosa*

**Tableau 2:** Taxonomie d'*Inula Montana*

**Tableau 3 :** la composition chimique d'huile essentielle

**Tableau 4 :** Principales classes des flavonoïdes

**Tableau 5 :** Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes

**Tableau 6:** Quelques exemples de coumarines

**Tableau 7:** Nomenclature des terpènes

**Tableau 8:** Caractéristiques géographiques et bioclimatique de l'*I. Viscosa*

**Tableau 9 :** Caractéristiques géographiques et bioclimatiques de l'*I. Montana*.

**Tableau 10:** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes *I-Viscosa* (S1 & S2)

**Tableau 11 :** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes *I. Montana* **Tableau**

**12 :** % inhibition de H.E d'*I. Viscosa* & *I. Montana* après 30 mn

**Tableau 13 :** Activités antibactériennes des huiles essentielles

**Tableau 14:** épuisement a l'éthanol

**Tableau 15 :** épuisement à H<sub>2</sub>O

- [1] Lucchesi M. E., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Université de La Réunion, 72p
- [2] Bigo C. 2011, La phytothérapie utilisée dans l'érythisme cardiaque .Thèse de doctorat en pharmacie.
- [3] Kansole M, 2009, Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de leucas Martinicensis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia Opposita Vahl et ORTHOSIPHON PALLIDUS Royle ex Benth. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies.
- [4] Decaux I. (2002) Phytothérapie: mode d'emploi. Ed Le Bien Public :p 6-7.
- [5] Palomo N. (2011) La gestion des plantes médicinales chez les communautés autochtones Nahuas de la Huasteca Potosina, Mexique . Université de Montréal Nadja Palomo Contreras.
- [6] Vernex-Lozet C. (2011) Les possibilités de la phytothérapie en Geriatrie canine. Thèse de doctorat Université de Lyon.
- [7] Strang C, Larousse medical. Ed Larousse.2006.
- [8] Al-Yahya, M.A., Muhammad, I., Mirza, H.H., El-Feraly, S.F., 1998. Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytother. Res.* 12, 335–339.
- [9] Lev, E., Amar, Z., 2000. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. *J. Ethnopharmacol.* 72, 191–205.
- [10] Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J., Palevitch, D., 1987. Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *J. Ethnopharmacol.* 19, 145–151.
- [11] Lastra, C., Lopez, A., Motilva, V., 1983. Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Planta Med.* 59, 497–501.
- [12] Pignatti, S., 1982. *Flora d'Italia*, vol. 3. Edagricole, Bologna, Italy
- [13] FAURON.R- MOATI.R- DONADIEU.Y (1983) Guide pratique de phytothérapie. Ed. MALOINE. pp 811.
- [14] FOURNIER.P. (1947) Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. LECHEVALIER. Tome 1 pp 176-178.
- [15] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris.
- [16] Dupont, F., Guignard, J.L. (2007). Abrèges botanique systématique moléculaire. 14ème édition révisée, Masson.

- [17] Victoriano Hernández ; Del Caro A., Piga A. 2007, Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences*, 81, 480–4
- [18] Anna Andolfi, De-Miguel-Yanes J.M., Manning A.K., Shrader P., McAteer J.B., Goel A., Hamsten A., Procardis F.C.S., Florez J.C., Dupuis J., Meigs J.B., .Inuloxins A–D, 2013, phytotoxic bi- and tri-cyclic sesquiterpene lactones produced by *Inula viscosa*: Potential for broomrape and field dodder management *Phytochemistry* , 86, 112–120
- [19] Erjon Mamoci ;Buysschaert M., Hermans M.P., 2011, Chemical Composition and In Vitro Activity of Plant Extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against Postharvest Fungi .*Molecules* , 16, 2609-2625.
- [20] Imad Eddine Haoui ,Ratiba Derriche , Leila Madani , Zahia Oukali ., 2011, Analysis of the chemical composition of essential oil from, Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [21] Mahmoud A, Al-Qudah, Abdulazim S, . 2010, Chemical Compositions of the Essential Oil from the Jordanian Medicinal Plant *Dittrichia Viscosa* . *Jordan Journal of Chemistry*, 5 : 4, 343-348
- [22] NICOLINO DE LAURENTIS; Del Caro A., Piga A. 2002 Chemical investigations of volatile constituents of *Inula viscosa* (L.) Aiton (Asteraceae) from different areas of Apulia, .*Delpinoans*, , 44, 115–119.
- [23] Marie-Cécile Blanc, Kojima I., Umezawa K.,. 2006, Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: analysis by <sup>13</sup>C-NMR and antimicrobial activity. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, 21 ,324–332
- [24] :Sílvia M. Albano; Keller A.C., Ma J., Kavalier A., He. K, Brillantes A.M.B., Kennelly E.J.,. Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and Acetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants. *ACG*.2012,6:1,35-48.
- [25] Sílvia M. Albano Khanna K., Rizvi F., Chander R., 2012 Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and Acetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants .*molecule*.,6: 35,48 .
- [26]: Gonzalez-Romero, M.A., Villaescusa-Castillo, L., Diaz-Lanza, A.M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Inula montana* L. *Z Naturforsch C*, 55(9-10): 697-700.
- [27] Benhamou Nabila. 2007 Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l’Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *AFS*.

- [28] Kansole M. 2009, Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de leucas Martinicensis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia Opposita Vahl et ORTHOSIPHON PALLIDUS Royle ex Benth. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies
- [29] Paris R.R., Moyses H. (1965) Précis de matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Ed Paris.
- [30] Urquiaga I. et Leighton F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, 33 (2) : 55-64.
- [31] Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- [32] Piquemal G. 2008. Les flavonoïdes
- [33] Karaali A., Boyacioğlu D., Güneş G. et Özçelik B. 2004. Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey
- [34] Malešev D. et Kuntić V. 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society.*, 72 (10) : 921-939
- [35] Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M. 2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition.*, 74 : 418-425.
- [36] Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*, 3 (4) : 162-169.
- [37] Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. et Monar A. 2004. Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, 77 (1-2) : 361-366.
- [38] W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J. 2007. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137.
- [39] Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferrero M. J. P. 2007. Self

organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18 (5) : 891-899.

[40] Gonzalez A. G., Abad T., Jimenez I. A., Ravelo A. G., Luis J. G., Aguiar Z., Andres L.S., Plasencia M., Herrera J.R., Moujir L. (1989) *Biochemistry and Systematic Ecology* 17: 293.

[41] Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K. and El Bachiri A., 2009. Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int. J. Agric. Biol.*, 11: pp. 205-208

[42] Koul O., Walia S. and Dhaliwal G.S. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4(1): pp.63–84

[43] Kulisic T., Radonic A., Katalinic V. and Milos M., 2004. Use of different methods for the testing activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85: pp.633-640

[44] Lesley B., 1996. *Plantes médicinales et aromatiques*, Ed. Lavoisier. Paris. pp. 58-61

[45] Lo Cantore P., Iacobellis N.S., De Marco A., Capasso F. and Senatore F., 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller)

[46] Lucchesi M. E., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Université de La Réunion, 72p.

[47] Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010, *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Ed.* Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.

[48] Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289p.

[49] Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253.

[50] Garnéro J., 1996. Huiles essentielles. *Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physicochimiques ; K 345-1*, 39p.

[51] ISO, 1997. Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle - Vocabulaire, 2p.

[52] AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6<sup>ième</sup> édition. AFNOR, Paris.

[53] Bruneton J., 1999. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier 3<sup>ème</sup> édition, Paris.

[54] Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP, 87p

[55] Benayad N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.

[56] Hazzit M., 2002. Arômes alimentaires. Thèse magister, USTHB, Alger. 96p.

[57] Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C. and Padurariu C., 2009. Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, pp.36-39.

[58] Bruneton J., 1993. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier, 2<sup>ème</sup> édition, Paris. 915p.

[59] Anton R. and Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.

[60] Pibiri M.C, 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p :177.

[61] : Maihebiau P., 1994. La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P: 635.

[62] Marriotta P-J., Shelliea R., Cornwellb C. 2001, Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, Vol. 936, Issues: 1–2, pp. 1–22.

63 Jean-François cavalli 2002. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SMet RMNdu carbone-13 d'huiles essentielles de madagascar. Thèse Université de Corse Pascal Paoli.

[64] Ziming Wang, Lan Ding, Tiechun Li, Xin Zhoua, Lu Wang, Hanqi Zhang, Li Liu , Ying Li, Zhihong Liu, Hongju Wang, Hong Zengb, Hui H, 2005. *Journal of chromatography A*, 1102 (2006).

[65] Meyer-Warnod B., Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, *Perfumer & Flavorist*, 1984, 9, 93-103.

[66] Pharmacopée Européenne, 3<sup>ème</sup> édition, Conseil de l'Europe. Sainte Ruffine : éd.

Maisonneuve S.A, 1997, 1918 pages.

[67] luicita. lagunez rivera. 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France



- [68] M.E. LUCCHESI. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. 2005, Thèse de Université de la Reunion.
- [69] Pibiri M.C, 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p :177
- [70] Skoog D.A., Holler F.J. & Nieman T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. 1ère édition, Ed. De Boeck Université, p: 945
- [71] Li, P ; Anu, H ; Jari, S ; Teijo, Y ; Heikki, V ; 1999, TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology , *Chemistry and Nutrition*, 10 : 123-187
- [72] Maamri, S., 2008, Etude de Pistacia atlantica de deux régions de sud algérien : Dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de Magister en biochimie et microbiologie appliqués, p 26.
- [73] Belkheiri, N. ,2010, Dérivés phénoliques et activités antiathérogènes. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'université de Toulouse, p 113.
- [74] Frankel, E. N; Meyer. A. S. 2000. "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants", *Journal of Science and Food*
- [75] Huang, D; Ou, B; Prior, R.L. 2005, "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856. *Agriculture*, 80: 1925-1941
- [76] Diouf, P.-N; Merlin, A; and Perrin, D. (2006). Antioxidant properties of wood extracts and colour stability of woods. *Annals of Forest Science*, 63: 525-534.
- [77] Molyneux, P; (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Song Klama Karin J.Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.
- [78] Benzie, I.F.F; Strain, J.J. 1996, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*, 239: 70- 6
- [79] Pulido, R; Bravo, L; Saura-Calixto, F. 2000, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay, *J Agric Food Chem*, 48 (8): 3396 -3402.
- [80] Khiati M (1998) Guide des maladies infectieuses et parasitaires. OPU, Alger
- [81] Abdesselam Z., 2006. Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*, pp.6-16.
- [82] Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R., 1979. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: pp. 26-30.
- [83] Pibiri M.C., 2006. Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp. 28-52.

- [84] Razakarivony A.A., Andriamihaja B. & Razanamahefa B., 2009. Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. *Actes du symposium biomad*. Université d'Antananarivo. 28p.
- [85 ] Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII, pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytochemistry : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p
- [86] Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennnd K.N., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., 2008. Etude chimique et activite antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. Vol.24, №1, pp. 94-103
- [87] Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 3 (4):pp.3818-3824.
- [88] Parejo I; Viladomat F; Bastida J; Rosas-Romero A; Flerlage N; Burillo J; Codina C. 2002, Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*; 50: 6882–90
- [89] Oyaizu, M. 1986, Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- [90] Hubert J., 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines. *Thèse de doctorat*. № 2435. Institut National Polytechnique de Toulouse, 64p.
- [91] F. Benbelaid et al, Antimicrobial activity of essential oil of *Lavandula multifida* L.
- [92] Harborne J.B., 1998, *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Ed. Springer, Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2012
- [93] Karagozler, A; Erdag, B; Calmaz Emek, Y. 2008. Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, 111: 400-407

The knowledge of the traditional healers often represents a base for pharmacological and phytochimic research on the natural drugs. This work concentrated initially on the extraction of essential oil and the medicated water of two species of inula: *Inula Viscosa* and *Inula Montana*. Then the evaluation of their antioxydant and antimicrobial activity in vitro and chemical composition by spectral analysis CPG/SM. The got results show that the H.E and the medicated water of the two species have an important antioxydant power sight the presence of the flayonoïdes, on the other hand they have a moderated antimicrobial power. Keywords: *Viscosa inula*, *Montana Inula*, essential Oil, Activities Biological.

المعرفة من المعالجين التقليديين غالبا ما يكون أساس للبحوث الدوائية والنباتية على الأدوية الطبيعية. وقد ركز هذا العمل في المقام الأول على استخراج الزيت العطري من نوعين *inule* الراسن الراسن الفسكوز ومونتانا. وتقييم مضادات الأكسدة، ونشاط مضادات الميكروبات في المختبر والتركيب الكيميائي عن طريق التحليل الطيفي GC / MS النتائج التي تم الحصول عليها تبين أن هذين النوعين من ET ديك مضادات الأكسدة الهامة لوجود مركبات الفلافونويد، من خلال أنها ضد قدرة مضادات الميكروبات معتدلة. الكلمات الرئيسية: *Viscosa inula*, *Montana Inula* ، نشاطات البيولوجية.

La connaissance des guérisseurs traditionnels représente souvent une base pour la recherche pharmacologique et phytochimique sur les médicaments naturels. Ce travail s'est concentré en premier lieu sur l'extraction de l'huile essentielle de deux espèces d'inule : *Inula Viscosa* et *Inula Montana*. Puis l'évaluation de leurs activité antioxydante et antimicrobienne in vitro et composition chimique par analyse spectrale CPG/SM. Les résultats obtenus montrent que l'H.E des deux espèces ont un pouvoir antioxydant importants vue la présence des flavonoïdes, par contre elles ont un pouvoir antimicrobien modéré. Mots clés: *Inula Viscosa*, *Inula Montana*, Huile essentielle , Activités Biologiques.