

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

Ministère de l'enseignement et de la recherche scientifique



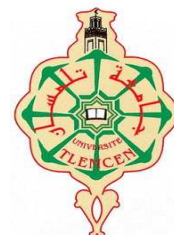
LASNABIO

Université ABOU BEKR BELKAID

Tlemcen

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MASTER : MOLÉCULES BIOACTIVES : SYNTHÈSE ET APPLICATION

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Présenté par :

Mr : BENSOUNA Adel

Thème

**Composition chimique et propriétés biologiques de
l'huile essentielle de *Centaurea acaulis* L (Nagour).**

Devant le jury composé de:

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

Remerciements :

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

La première personne que je tiens à remercier est Mr **DIB Mohammed el Amine**, d'avoir accepté de m'encadrer et qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de ma recherche, tout en y gardant un œil critique et avisé. Merci pour votre rigueur scientifique et vos conseils toujours judicieux et aussi d'avoir eu la patience de corriger mon mémoire et de m'avoir responsabilisé du début jusqu'à la fin de mon travail.

Un grand merci à Mr **TABTI Boufeldja** le doyen de la faculté des sciences pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, et aussi pour sa générosité et sa gentillesse.

Je remercie le président du jury Mr **GHALEM Saïd**, directeur du laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives–LASNABIO- de la faculté des sciences, c'est un honneur pour moi, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

J'exprime aussi ma reconnaissance à mes enseignants, le Professeur **Allali Hocine**, le Dr BENYAROU Meriem, le Dr MERAD Nouria et Dr DJABOU Nassim de l'Université de Tlemcen pour leur gentillesse, leur aide et précieux conseils.

Je tiens enfin à exprimer ma gratitude et mon profond respect à Monsieur le Professeur **Alain Musellide** du laboratoire de chimie des produits naturels de l'université de Corse, pour avoir accepté d'assister à ce jury.

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

Je remercie également le Professeur BENDAHOU Mourad pour les activités antifongiques, et mademoiselle Aissaoui Nadia pour les activités antibactériennes. Un merci spécial pour mes amis (es), Kamel, Ali, Rania, Fatima Zahra et mes camarades qui ont participé de près ou de loin pour accomplir ma recherche.

Je remercie le professeur **BOUAZZA Mohamed** du Laboratoire d'écologie et le Dr **KAZI TANI Choukry** du Laboratoire d'agronomie de l'Université de Tlemcen pour leur contribution à l'identification des espèces.

DEDICACES :

Au nom de Dieu, le clément ; le Miséricordieux !

Je dédie ce travail à :

Mon père Mohamed BENSOUNA :

Vous m'avez aidé pendant les périodes difficiles. Que Dieu tout puissant, le clément, le Miséricordieux vous protège, merci infiniment.

Maman : Fatiha BOUCHERIFI.

Vous m'avez appris la fraternité et accompagné moralement tout au long de ma vie et de ce travail. Que Dieu tout puissant, le miséricordieux vous protège, merci infiniment.

Ma femme : Wassila MASAKRI.

Merci de m'avoir accompagné jusqu'à la concrétisation de ce travail. Saches que je t'aime profondément, que Dieu, le clément, le miséricordieux bénisse notre union.

Nos enfants :

Mounir, Ines, Nour et Djihad. Merci pour votre bénédiction, vous êtes les dignes enfants de ce travail. Que Dieu, le clément, le Miséricordieux vous donne une longue vie.

Sommaire

Introduction :	1
Partie 1 : Synthèses Bibliographique.....	3
I : Description botanique de <i>Centaurea acaulis</i>	3
1. Généralité sur la plante :	3
1.1. Caractéristiques :	3
1.2. L'espèce : <i>Centaurea acaulis</i> :	3
2. Classification :	4
3. Description botanique :	4
4. Utilisation traditionnelle :	4
4.1. <i>Centaurea maroccana</i> :	5
4.2. <i>Centaurea chamaerhaponticum</i> Ball :	5
4.3. <i>Centaurea montana</i> L. :	5
4.4. <i>Centaurea pullata</i> L., et <i>Centaurea grisebachii</i> (Nyman)	5
5. Travaux déjà réalisées sur les huiles essentielles du genre <i>Centaurea</i> :	5
5.1. <i>Centaurea armena</i> et <i>sessilis</i> :	5
5.2. <i>Centaurea pannonica</i> et <i>Centaurea jacea</i> :	5
5.3. <i>Centaurea bracteata</i> et <i>Centaurea pannonica</i> ssp. <i>pannonica</i> :	6
5.4. <i>Centaurea amanicola</i> , <i>Centaurea consanguinea</i> DC, et <i>Centaurea ptosimopappa</i> :	6
5.5. <i>Centaurea sibthorpii</i> :	6
5.6. <i>Centaurea nicaeensis</i> All., <i>Centaurea parlatoris</i> Helder et <i>Centaurea solstitialis</i> L.	6
5.7. <i>Centaurea gracilentata</i> et <i>Centaurea ovina</i> ssp. <i>besserana</i> :	7
5.8. <i>Centaurea aladagensis</i> :	7
5.9. <i>Centaurea formanekii</i> et <i>Centaurea orphanidea</i> ssp. <i>Thessala</i> :	7
5.10. <i>Centaurea eryngiodes</i> Lam. et <i>Centaurea iberica</i> Trev.var. <i>hermonis</i> Bois. Lam	7
5.11. <i>Centaurea ragusina</i> L. :	8
5.12. <i>Centaurea pulcherrima</i> Willd. var. <i>pulcherrima</i> :	8
5.13. <i>Centaurea drabifolia</i> Sm. ssp. <i>detonsa</i> :	8
5.14. <i>Centaurea arachnoidea</i> et <i>Centaurea montis-borlae</i> :	9
5.15. <i>Centaurea nigrescens</i> et <i>Centaurea stenolepis</i> :	9
II : les huiles essentielles.....	9
1. Définition :	9
2. Approvisionnements :	10
3. Utilisation :	10

4. Les risques potentiels :	10
5. Classification des huiles essentielles pures :	11
III. L'hydrodistillation / l'entraînement à la vapeur :	11
IV : IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN MELANGE	13
1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) :	13
2. Le couplage en ligne Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse (CPG/SM) :	14
V : Activités biologiques des plantes aromatiques.....	14
Partie 2 : Résultats et discussion :	16
1. Criblage phytochimique de <i>centaurea acaulis</i> :	16
1.1. Groupes chimiques caractérisés :	16
1.2. Teneurs en eau :	17
2. Rendement des extractions :	17
3. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes et des racines de <i>Centaurea acaulis</i> :	17
4. Activité antioxydante.....	21
4.1. Test antioxydant par CCM	21
4.2. Piégeage du radical libre DPPH (2, 2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle):.....	22
4.3. Réduction du fer (FRAP) :	24
4.4. Test de blanchissement du β -carotène :	24
5. Evaluation de l'activité antibactérienne :	25
6. Test antifongique in vivo des hydrolats de <i>Centaurea acaulis</i> contre le développement de quatre champignons de <i>C. sinensis</i> :	27
7. Test de L'activité fongitoxique(antifongique in vitro) de l'huile essentielle de <i>Centaurea acaulis</i> contre le champignon pathogène <i>Penicillium sp</i> :	29
Conclusion :	29
Partie 3 : Matériel et méthodes	32
1. Provenance du matériel végétal et identification :	32
1.1. La teneur en eau :	32
2. Criblage phytochimiques :	33
2.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude :	33
i. Amidon :	33
ii. Saponosides :	33
iii. Tanins.....	34
2.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol	34
a) Flavonoïdes.....	34
b) Tanins.....	34

c) Composés réducteurs.....	34
d) Autres métabolites secondaires.....	34
3. Méthodes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles :.....	35
4. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles	35
4.1. Analyse par CPG/FID :.....	35
4.2. Couplage CPG/Spectrométrie de masse :.....	36
4.3. Méthodologie d'analyse :.....	36
5. L'évaluation de l'activité antioxydante :	37
5.1. Evaluation de l'activité antioxydante par CCM	37
5.2. Piégeage du radical libre DPPH (2, 2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle) :.....	38
5.2.1. Mode opératoire :	38
5.3. Réduction du fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :	39
5.3.1. Principe :.....	39
5.3.2. Mode opératoire :	39
5.4. Test de blanchissement du β -carotène (β -carotène bleaching method) :.....	40
5.4.1. Principe :.....	40
5.4.2. Mode opératoire	40
6. Tests de l'activité antimicrobienne :	41
6.1. Souches :.....	41
6.2. Evaluation de l'activité sur milieu gélosé:	41
7. Activité antifongique in vivo de l'huile essentielle de <i>Centaurea acaulis</i> contre le développement de champignons de <i>C. sinensis</i> :.....	42
7.1. Champignons pathogènes :	42
7.2. Test antifongique in vivo :	42
7.3. L'activité fongitoxique(Test antifongique in vitro) :	43
Références bibliographique.....	44

Abréviations :

H.E : Huile essentielle

C. acaulis : *Centaurea acaulis*

FID: Flame Ionisation Detector

CPG (CG): Chromatographie en Phase Gazeuse

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

CC : Chromatographie liquide sur Colonne ouverte

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

HPLC : Chromatographie liquide Haute Performance

SM : Spectroscopie de Masse

IRTF : Infra-Rouge de Transformée de Fourier

DPPH: 2, 2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle

FRAP: Feric Reducing Ability of Plasma

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

NI : Non-identifié

Ir : Indice de rétention

BHT: Hydroxytoluène butylé

BHA (hydroxyanisol butylé)

TBHQ : tert-butylhydroquinone

DO: Densité Optique

nm : Nanomètre

m : Mètre

C. sinensis : *Citrus sinensis*

COB : *Centaurea ovina Basserana*

CG : *Centaurea gracilenta*

RSA: *Radical Scavenging Activity*

PT: *pourcentage d'inhibition*

h : Heure

NH₄OH : Ammoniaque

NaOH : Hydroxyde de sodium

m : Mètre

nm : Nanometre

CO₂ : Dioxyde de carbone

g : Gramme

pH : Potentiel hydrogène

ml: Millilitre

MHz: Millihertz

H₂SO₄ : Acide Sulfurique

Mg : Magnesium

C° : Degré Celsius

N : Normalité

µl: Microlitre

N : Nord

% : Pourcentage

O: Ouest

INTRODUCTION

Pendant des siècles, l'Homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. La plupart de grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes.

Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles.

Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines[1].

La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethno pharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs.

Kerharo et Adam [2], rapportent qu'en médecine traditionnelle, certains organes de plantes, telles que les feuilles, les écorces, les racines sont utilisées dans le traitement d'affections courantes.

C'est pourquoi, il est important de faire une évaluation scientifique des plantes de notre pays afin d'en obtenir un maximum d'informations relatives à leur efficacité toxicologique, physiologique, pharmacodynamique, corrélée par les principes actifs qu'elles contiennent.

De telles études permettraient de mettre au point des médicaments utilisables dans les soins de santé primaire à moindre coût.

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications des leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux.

Ainsi, pour les plantes étudiées, plantes pour lesquelles il n'existe pas assez de travaux sur leurs huiles essentielles, notre préoccupation majeure était d'abord connaître la composition chimique des huiles essentielles qui en sont extraites avant d'envisager quelle pourrait être leurs activités biologiques et d'autres utilisations possibles. Dans ce contexte, nous nous sommes

intéressés à une famille de plantes des Astéracées, la *Centaurea acaulis*, pour lesquelles aucun travail scientifique n'avait été réalisé sur son huile essentielle et ses activités biologiques.

Dans cette optique, nos principaux objectifs se résument comme suit:

-Extraction des huiles essentielles des racines et des parties aériennes.

-Détermination de leur composition chimique par les différentes méthodes d'analyses : CPG et CPG-SM.

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

-Evaluation in vivo des activités antifongique contre le développement de quatre champignons de *Citrus sinensis*.

Le présent mémoire se subdivise en trois parties :

- La première partie passe en revue les généralités sur les huiles essentielles et la description botanique de l'espèce étudiée.
- La deuxième partie est consacrée aux résultats, leur interprétation et discussion.
- La troisième partie s'articule au matériel et méthodes utilisées.

Partie 1 : Synthèses Bibliographique

I : Description botanique de *Centaurea acaulis* :

1. Généralité sur la plante :

1.1. Caractéristiques :

Le genre botanique *Centaurea*, à ne pas confondre avec les espèces du genre *Centaurium*, de la famille des Gentianacées, regroupe de nombreuses plantes de la famille des Astéracées (ou Composées), assez proches des Chardons et des circes, mais qui s'en distinguent notamment par leurs feuilles non épineuses. Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule, entourées d'un involucre de bractées. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. L'involucre est composé de bractées inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces [3]. ce genre comprend 500-600 espèces [4]

1.2. L'espèce : *Centaurea acaulis* :



Figure 1 : *Centaurea acaulis* L

La *Centaurea acaulis* ou centaurée acaule est une magnifique centaurée, qui semble surgir de terre. Très rare en France, elle n'est connue que dans quelques stations. Naturalisée en Espagne et en Sicile, elle est originaire d'Algérie. C'est une espèce non répertoriée dans les flores classiques. Nous avons très peu d'informations sur cette espèce. Elle s'expose en plein soleil. Nécessite un sol drainant. Tolère les sols pauvres, et la sécheresse. Elle est suffisamment robuste pour réussir en extérieur dans de nombreuses parties du pays [5].

La répartition géographique, centré sur la Méditerranée, en fait un excellent exemple pour les études de l'histoire biogéographique de cette région riche en biodiversité.

2. Classification :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Embranchement : Spermatophyta (Angiospermae)

Classe : Dicotyledones

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Centaurea*

Espèce : *Centaurea acaulis* [3]

3. Description botanique :

Plante : vivace, vert cendré, à souche couverte par les débris des anciennes feuilles

Tige : absente mais pédoncule pouvant mesurer plusieurs centimètres

Feuilles : à rachis raide, lyrées, à 10-15 lobes mous, ovales, un peu pointus, ondulés, le terminal plus grand

Bractées : longues, acuminées, épineuses

Involucre : globuleux, gros

Écailles : appliquées, scarieuses, à appendice décurrent, frangé à cilié

Fleurs : jaunes, en tête globuleuse

Fruit : akènes comprimés à aigrette double, l'interne conique, plus courte

Milieu principal : Lieux secs

Étage, altitude : Plaine

Répartition : Très rare, Gard, Hérault, Aude. Espagne, Italie, Algérie

Floraison : Avril

Autre synonymie : *Menomphalus acaulis* (L.) Pomel, *Colymbada acaulis* (L.) Holub.[6]

4. Utilisation traditionnelle :

Il n'ya aucune citation pour l'utilisation traditionnelle de *Centaurea acaulis*. Pour les propriétés thérapeutiques de quelques autres espèces du genre *Centaurea*, nous citons :

4.1. *Centaurea maroccana* :

Elle a un effet protecteur contre l'hépatotoxicité [7].

4.2. *Centaurea chamaerhaponticum* Ball :

Elle a un effet Contre les palpitations, et elle est utilisée pour le traitement des maladies du foie, de l'estomac et de l'intestin [8]

4.3. *Centaurea montana* L. :

Le thé de centaurée s'emploie en cas de dyspepsie (difficulté de digestion), et comme diurétique. On en fait aussi des compresses calmantes pour les yeux. Il combat aussi le refroidissement [7] [8].

4.4. *Centaurea pullata* L., et *Centaurea grisebachii* (Nyman)

Elle a un effet analgésique contre des douleurs abdominales induites par l'acide acétique. Car elles peuvent être thérapeutiquement utile pour atténuer la douleur inflammatoire [9].

5. Travaux déjà réalisées sur les huiles essentielles du genre *Centaurea* :

Ma recherche bibliographique n'a révélé aucun travail sur les huiles essentielles de *Centaurea acaulis*.

5.1. *Centaurea armena* et *sessilis* :

Les huiles essentielles de *Centaurea sessilis* séchés à l'air et *Centaurea armena* obtenues par hydrodistillation ont été analysées par CPG et CPG-SM. Une vingtaine de composants ont été identifiés dans les huiles essentielles et la principale composante de ces taxons est bêta-eudesmol dans les ratios de 12,4% et 19,3% pour *Centaurea sessilis* et *Centaurea armena*, respectivement. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle isolée des deux plantes ont montré une activité antibactérienne modérée contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Cependant aucune activité antifongique n'a été observée contre les champignons [10].

5.2. *Centaurea pannonica* et *Centaurea jacea* :

La composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de *Centaurea pannonica* (Heufel) Simonkai et *Centaurea jacea* L. (Asteraceae), ont été étudiés. Les huiles essentielles ont été analysées par CPG et CPG-SM. Quarante-cinq et vingt-neuf composés ont été identifiés dans les deux huiles, respectivement. L'huile de *Centaurea pannonica* était riche en acides gras (43,7 %), avec l'acide 9-octadécanoïque (34,0%) et (Z, Z) d'acide-9,12-octadécadiénoïque (8,6%) comme les principaux composés. En revanche, l'huile essentielle de *Centaurea jacea* a été dominée par les sesquiterpènes oxygénés (43,2%), dont l'oxyde

de caryophyllène (23,5 %) et spathulenol (8,9%) étaient les principaux constituants. Cependant, l'huile a été également caractérisée par une fraction d'acide gras importante (15,5%), avec l'acide 9-octadécanoïque (8,9 %) et l'acide hexadécanoïque (6,6%) étant les principaux composants. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont montré une activité antimicrobienne significative, en particulier contre les bactéries à Gram positif [11].

5.3. *Centaurea bracteata* et *Centaurea pannonica ssp. pannonica* :

Ce document porte sur les composants volatils des huiles essentielles provenant des parties aériennes et les racines de *Centaurea Bracteata* Scop. et les parties aériennes de *Centaurea pannonica* (Heuffel) *Simonkai ssp. pannonica*. Les composants volatiles, obtenues par hydrodistillation, ont été déterminés par analyse CPG et CPG-SM. Un total de 91 composés a été identifié. Tous les échantillons ont été caractérisés principalement par des hydrocarbures (de 7,1 à 34,1 %), des acides gras (de 9,7 à 45,9 %) et des sesquiterpènes oxygénés (de 15,2 à 16,6 %). Les principales composantes des échantillons étaient l'acide hexadécanoïque (de 8,1 à 31,1 %), nonacosane (de 0,6 à 13,4 %) et l'oxyde de caryophyllène (de 04.05 à 11.09 de %). Les monoterpènes, hydrocarbonés et oxygénés, étaient absents ou présents en faibles quantités dans toutes les huiles [12].

5.4. *Centaurea amanicola*, *Centaurea consanguinea* DC, et *Centaurea ptosimopappa* :

Les constituants volatils des parties aériennes de *Centaurea amanicola* Hub., *Centaurea consanguinea* DC., et *Centaurea ptosimopappa* endémiques de Turquie, ont été extraites par hydrodistillation et analysé par CPG et CPG-SM. 94 éléments au total ont été identifiés. Les sesquiterpénoïdes, les acides gras et les composés carbonylés sont les éléments les plus abondants dans les huiles. L'acide hexadécanoïque et le (Z, Z) acide-9,12-octadécadiénoïque ont été les principaux acides gras présents dans tous les échantillons examinés. L'étude de l'activité biologique des huiles a montré une action principalement contre les agents pathogènes Gram-positifs [13].

5.5. *Centaurea sibthorpii* :

Les constituants volatils des parties aériennes de *sibthorpii* *Centaurea* recueillis en Grèce ont été extraits par hydrodistillation et analysées par CPG et CPG-SM. 63 éléments au total ont été identifiés. Les acides gras et composés sesquiterpénoïdes étaient des éléments les plus abondants dans l'huile. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile sur bactéries Gram-positives et Gram-négatives, n'a montré aucune activité [14].

5.6. *Centaurea nicaeensis* All., *Centaurea parlatoris* Helder et *Centaurea solstitialis* L. :

Les constituants volatils des capitules de *Centaurea nicaeensis* All., *Centaurea parlatoris* Helder et *Centaurea* de *L. ssp. schouwii* (DC.) ont été extraites par hydrodistillation et analysé par CPG et CPG-SM. 113 éléments au total ont été identifiés. Les acides gras et les hydrocarbures sont les éléments les plus abondants dans les huiles. Le caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène ont été les principaux composés de la fraction de sesquiterpène. L'étude de l'activité biologique des huiles ne montre pas d'activité significative [15].

5.7. *Centaurea gracilentata et Centaurea ovina ssp. besserana* :

Les huiles essentielles de *Centaurea gracilentata* Velen. (CG) et *Centaurea ovina* Pall. Ex Willd. Ssp. *Besserana* (DC.) (COB), ont été étudiés par CPG et CPG-SM. Quarante-cinq composés représentant 90,1% de l'huile de CG, et 68 composés de COB, représentant 91,9 % de l'huile, ont été identifiés. Les huiles sont riches en sesquiterpénoïdes (33,4 % pour les CG et 27,3% pour COB), les hydrocarbures (28,3 % pour les CG et 10,7 % pour COB) et des composés carbonylés (12,7% pour les CG et 13,1% pour COB). Les acides gras étaient abondants que pour COB (31,3 %). Le bêta-eudesmol (12,8%), nonacosane (11,8%) et guiacol p- vinyle (7,5%) ont été reconnus comme les principaux constituants de CG , tandis que l'acide hexadécanoïque (21,4 %), spathulenol (7,9%), bêta-eudesmol (5,8 %) et l'oxyde de caryophyllène (5,7%) étaient les principaux composés pour COB [16].

5.8. *Centaurea aladagensis* :

La Composition chimique de l'huile des parties aériennes de *Centaurea aladagensis*, endémique en Turquie distillée à l'eau, a été analysée par CPG et CPG-SM. L'acide hexadécanoïque (39,3%), l'oxyde de caryophyllène (6,6%) et hexahydrofarnesyl acétone (4,3%) ont été trouvés comme constituants principaux de l'huile. L'huile a été testée contre 7 micro-organismes pathogènes humains [17].

5.9. *Centaurea formanekii et Centaurea orphanidea. ssp. Thessala* :

Les constituants volatils des parties aériennes de *Centaurea formanekii* Halacsy et les parties aériennes, les capitules et les racines de *Centaurea orphanidea* Heldr. et Sart. ex Boiss. ssp. *Thessala* (Hauskn.) de Grèce ont été extraites par hydrodistillation et analysée. Les principales composantes de *Centaurea formanekii* étaient l'acide hexadécanoïque (13,6%), delta-élémente (9,1%), et spathulenol (6,9%). Les principales composantes de *Centaurea orphanidea* ssp. *Thessala* étaient (26,1%) de spathulenol et l'oxyde de caryophyllène (13,2%) dans les parties aériennes, de l'acide hexadécanoïque (33,5 %) et heptacosane (6,3 %) dans les capitules , et l'ester méthylique de l'acide hexadécanoïque (22,0 %) et de β - chamigrène (14,0 %) dans les racines [18].

5.10. *Centaurea eryngiodes Lam. et Centaurea iberica Trev.var. hermonis Bois. Lam*

Les composants volatils des capitules de *Centaurea eryngioides* Lam. et *Centaurea iberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam. ont été obtenues par hydrodistillation et identifiées par CPG et CPG-SM. Au total, 91 composants, les acides gras et la plupart des hydrocarbures, ont été identifiés [19].

5.11. *Centaurea ragusina* L. :

Les huiles volatiles obtenues à partir des feuilles et des fleurs de *Centaurea ragusina* L. ont été évaluées pour l'activité antimicrobienne. Les compositions chimiques, déterminées par CPG et CPG-SM, étaient complexes, avec les sesquiterpènes comme la classe la plus abondante. Non-terpénique hydrocarbonées ont également été identifiées avec de grandes quantités, tandis que les acides et cétones ont été trouvés en grande quantité que dans l'huile des feuilles. Les aldéhydes, alcools, esters et autres composés ont été identifiés dans des quantités inférieures. L'effet antimicrobien des échantillons volatiles ont été étudiés à l'aide de la diffusion du disque et des essais de microdilution. Ils se sont révélés inhiber une large gamme de bactéries et de champignons, ce qui provoque une inhibition de la croissance in vitro à une concentration de 250 µg/mL. Les huiles volatiles affichées un grand potentiel anti-bactérien et antifongique [22].

5.12. *Centaurea pulcherrima* Willd. var. *pulcherrima* :

Les huiles essentielles de *Centaurea pulcherrima* Willd. var. *pulcherrima* (Asteraceae) ont été isolées par hydrodistillation (HD), micro-ondes (MD) et caractérisées par CPG et CPG-SM. Un total de 58 et 57 composés ont été identifiés, constituant plus de 93,7%, et 91,6% de la composition de l'huile volatile de *centaurea pulcherrima* var. *pulcherrima*, respectivement. Les hydrocarbures sesquiterpéniques se sont avérés être le principal groupe des constituants (HD: 42,4% contre MD: 51,5%). Le composant majeur des huiles de *Centaurea pulcherrima* var. *pulcherrima* était le germacrène-D (HD, 17,8% contre MD, 23,2%). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles isolés de la plante a également été étudiée, et ils ont montré une bonne activité antibactérienne contre les bactéries gram-positives [21].

5.13. *Centaurea drabifolia* Sm. ssp. *detonsa* :

Dans cette étude, la composition de l'huile essentielle et de la capacité antioxydante de *Centaurea drabifolia* ssp. *detonsa* ont été étudiés. La composition de l'huile essentielle a été identifiée à l'aide de chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse. Au total, 41 composés ont été décrits dans l'huile essentielle. Le germacrène D (44,829 %) a été déterminée en tant que composé principal de l'huile essentielle. Le contenu phénolique total, la capacité antioxydante totale, le taux d'oxydation de l'acide linoléique, IC₅₀ inhibition (en test DPPH) et CE₅₀ (en réduisant la puissance) valeur ont été jugés 40,454 mg/mL, 100,840 mg/mL, 65,639 %, 39,584 mg/ mL et de 0,603 mg/ mL, respectivement. Les résultats ont montré que l'extrait de *Centaurea drabifolia* ssp. *detonsa* a de

fortes propriétés antioxydantes et cette espèce peut être utilisée comme un antioxydant naturel dans la transformation des aliments et des industries pharmaceutiques [22].

5.14. *Centaurea arachnoidea et Centaurea montis-borlae* :

Les fractions volatiles des feuilles fraîches et capitules de *Centaurea arachnoidea et Centaurea Montis - borlae*, deux espèces endémiques à l'état sauvage dans les Alpes Apuanes (Toscane, Italie), ont été isolés par hydrodistillation et analysés par GC / FID et GC / MS. Le rendement en huile essentielle varie de 0,01% à 0,09 % par rapport à la matière fraîche. Une grande variété de composés volatils a été détecté dans les espèces et les organes de la plante examinés, tant en termes qualitatifs et quantitatifs. Les sesquiterpènes ont été les principaux constituants, allant de 18,9% à 73,2 %. Les alcools (de 1,6 à 25,8 %) , les aldéhydes (de 1,5 à 12,0 %), les hydrocarbures (1.8 à 11.9 %), les acides (0,2 à 25,4 %), les esters (de 0,2 à 1,3 %), les monoterpènes (0,7-1,4 %), et divers composés (de 0,6 à 2,6 %), ont également été détectées dans des quantités variables dans tous les organes [23].

5.15. *Centaurea nigrescens et Centaurea stenolepis* :

Les constituants volatils des parties aériennes de *Centaurea Willd*, recueillies en Roumanie et de deux échantillons de *Centaurea stenolepis* A. Kerner de la Bulgarie et de la Roumanie ont été obtenus par hydrodistillation et analysées par CPG et CPG-SM. Les principales composantes de *Centaurea stenolepis* étaient l'oxyde de caryophyllène (de 6,9 à 15,6%), hexahydrofarnesyl acétone (6.5 à 4.4%), heptacosane (6,0 à 4,9%) et guiacol p-vinyle (de 4,3 à 5,0%). Les principales composantes de *Centaurea nigrescens* étaient l'oxyde de caryophyllène (9,9%), bêta-eudesmol (9,5%), spathulenol (7,6%), heptacosane (6,1%) et guiacol p-vinyle (5,5%) [24].

II : les huiles essentielles

1. Définition :

Les huiles essentielles sont des mélanges de composants volatils et parfumés fabriquées par distillation à la vapeur d'eau, par extraction au moyen de solvants ou par pression à froid à partir de matières premières végétales.

Ces des substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes, des épices, etc....

Elles sont très concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur.

A la différence des huiles grasses (p. ex. l'huile de tournesol), elles s'évaporent totalement.

Les huiles essentielles sont considérées comme des produits de première transformation : On distingue trois catégories d'huiles essentielles : Les huiles brutes ou naturelles, les huiles rectifiées et les huiles fractionnées :

- Les huiles brutes ou naturelles sont obtenues par distillation d'une grande quantité de matières premières broyées (branches, aiguilles, écorces, bois, etc.). Elles ne sont pas raffinées.
- Les huiles rectifiées sont des huiles brutes purifiées, c'est-à-dire que certains résidus laissés lors de la distillation sont éliminés par l'entraînement à la vapeur.
- Enfin, les huiles essentielles de qualité supérieure sont des huiles fractionnées. On les obtient en séparant les composés volatils en diverses fractions, selon leurs points d'ébullition spécifiques [25].

2. Approvisionnements :

Selon l'essence produite et le système de distillation utilisé, une tonne de matière première permet d'extraire entre six et dix kilogrammes d'huile essentielle. Les producteurs peuvent obtenir cette matière première de trois sources distinctes.

Certains s'approvisionnent auprès des entreprises forestières. Ils ramassent les rémanents laissés sur les aires de récolte. D'autres tirent la matière première dont ils ont besoin de leurs propres coupes en forêt. Enfin, une autre source d'approvisionnement est les résidus des haies et des arbres. Malheureusement, il n'existe pas de statistique récente sur l'approvisionnement des usines d'huiles essentielles [25].

3. Utilisation :

Les huiles essentielles sont utilisées principalement comme fragrance pour parfumer une pièce ou un produit cosmétique, mais aussi comme médicaments et comme exhausteurs de goût dans les condiments.

Sont aussi employées en aromathérapie pour préserver ou améliorer la santé et la beauté des êtres humains.

Elles peuvent être utilisées pour usage externe (inhalations, compresses, massage, bains aromatisés, soins des cheveux, diffusion d'arôme, etc.) ou interne (infusions, sirops, pastilles, etc.).

Chaque huile essentielle a ses caractéristiques et ses fonctions qui lui sont propres [25].

4. Les risques potentiels :

Les huiles essentielles peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses et provoquer des réactions cutanées allergiques. Celles dont la viscosité est faible peuvent en outre, si elles sont avalées, pénétrer dans les poumons et les endommager (risque d'aspiration).

Eu égard à ces risques potentiels, les huiles essentielles entrent dans bien des cas dans la catégorie des produits chimiques dangereux et doivent, de ce fait, être classées, emballées et étiquetées conformément à la législation y relative [25].

5. Classification des huiles essentielles pures :

L'European Flavour and Fragrance Association (EFFA; association professionnelle européenne représentant des entreprises de l'industrie des arômes et des parfums) a publié un guide très utile pour la classification et l'étiquetage d'arômes et de parfums [26].

S'agissant de ces derniers, le guide contient également des indications importantes sur leur type et leur concentration.

Des extraits des annexes rédigées par l'EFFA sont reproduits dans le présent document.

En principe, les huiles essentielles pures doivent être considérées comme des substances, car elles figurent dans l'Inventaire européen des produits chimiques commercialisés.

Les fabricants qui ne sont pas en mesure de déterminer les composants des huiles pures peuvent se référer à la publication de l'EFFA susmentionnée, qui donne la classification de quelque 220 huiles essentielles pures en se fondant sur la concentration maximale de chaque composant [27].

III. L'hydrodistillation / l'entraînement à la vapeur :

L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation constituent les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic [28].

Le chauffage permet, dans une première étape de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur, de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique.

Le courant de vapeur ainsi créé permet l'entraînement d'un mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques. Il s'agit plus précisément de la formation d'un azéotrope entre l'eau et chacun des constituants du mélange qui permet dans la majorité des cas une volatilisation de ces métabolites secondaires à une température d'ébullition inférieure à celle de chaque composé et à celle de l'eau. Ainsi, des substances possédant des points d'ébullition assez élevés peuvent être

extraites. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier.

Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées et, en raison de sa plus faible densité, l'huile essentielle se place au dessus de la phase aqueuse.

La phase aqueuse contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat).

L'entraînement à la vapeur constitue la technique la plus utilisée et la plus aisée à mettre en œuvre pour la production d'huiles essentielles et elle reste sans doute la plus rentable, l'investissement matériel étant relativement peu important par rapport à celui des autres techniques.

La définition d'une huile essentielle donnée par la pharmacopée française est aussi restrictive puisqu'elle exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

Ceux-ci occupent cependant une place considérable sur les marchés de la pharmacie, des produits d'hygiène et de l'industrie cosmétique de la parfumerie, de nombreux secteurs de l'industrie agroalimentaire, mais aussi de la recherche.

L'hydrodistillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante dans le domaine de la recherche. Le phénomène physique est identique à celui décrit précédemment.

Cependant une verrerie adaptée a été mis en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle.

Ces phénomènes ont été rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clévenger [29].

L'existence de liaisons hydrogène et de liaisons de Van der Waals qui freinent la libre rotation et conduisent à un dégagement de chaleur. L'énergie cinétique est alors transformée partiellement en chaleur. Le chauffage de l'eau présente dans la plante provoque l'éclatement des glandes contenant l'huile essentielle. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par la vapeur d'eau contenue elle aussi dans la matière végétale. Un essencier de type Clévenger permet de condenser le distillat et de récupérer l'huile essentielle par simple décantation en tenant compte la différence de densité.

En effet, le terme « huile essentielle » nécessite l'utilisation du principe de l'hydrodistillation, de l'entraînement à la vapeur ou de l'expression à froid. Les deux modes d'extraction, bien que voisins, diffèrent cependant par la nature du chauffage. Or les phénomènes de

solubilité des composés organiques dans l'eau sont particulièrement importants dans une hydrodistillation ou encore dans un entraînement à la vapeur.

Les composés oxygénés plus polaires et plus solubles dans l'eau seraient distillés en priorité par rapport aux hydrocarbures terpéniques dont la température d'ébullition est pourtant plus faible.

Dans une huile essentielle obtenue par hydrodistillation, les composés oxygénés ont une plus grande affinité que les hydrocarbures pour la phase aqueuse et se retrouve donc dans l'hydrolat.

IV : IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN MELANGE

De manière schématique, il existe deux types de démarches analytiques. La première est la méthode chromatographique procédant par individualisation des composés du mélange. L'identification est réalisée à l'aide des indices de rétention, d'une part, et des spectres de masse, d'autre part. C'est la méthode conventionnelle d'analyse des huiles essentielles, mais aussi la méthode de référence du marché. La seconde méthode est le recours à la RMN du carbone 13 des mélanges ne nécessitant pas d'individualisation préalable, mais ne pouvant être appliquée que sous certaines conditions.

1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) :

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [30]. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme.

La reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Les variations les plus importantes sont observées lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire avec ceux de la littérature, particulièrement pour ce qui concerne la colonne polaire.[31]

De plus, les nombreux cas de coélution montrent que la comparaison des indices de rétention a sa limite pour l'identification de l'ensemble des composés.

Ainsi, la CPG bidimensionnelle couplée à une spectrométrie de masse (CPG/CPG/SM)(figure4), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant coéluer avec des composés plus abondants.[32]

2. Le couplage en ligne Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse (CPG/SM) :

Le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence [33][34]. En effet, le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe.

Deux modes d'ionisation sont possibles : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Dans ce dernier cas, on distingue l'ionisation Chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN).

Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles.

Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation [35]. Dans la source d'ionisation les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil.

V : Activités biologiques des plantes aromatiques

Les aliments lipidiques ne peuvent être stockés que pendant des périodes courtes à cause de la résistance insuffisante à l'oxydation par l'oxygène. Dans les aliments séchés, l'oxygène peut pénétrer très facilement dans la phase lipidique et la stabilité de ces aliments devient donc plus faible en présence d'eau. Ainsi, la stabilité des aliments séchés doit être testée, et si nécessaire, la fraction lipidique doit être préservée en rajoutant des antioxydants dans la formulation du produit alimentaire. L'oxydation des lipides est une cause majeure de la détérioration de la qualité des aliments contenant des matières grasses, d'où l'utilisation devenue de plus en plus fréquente des antioxydants.

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT), ces deux composés sont assez volatils et se décomposent rapidement à des températures élevées [36]. Il existe de sérieux problèmes concernant l'utilisation et la toxicité de ces deux produits synthétiques, tant au niveau de leur métabolisme que de leur accumulation dans les tissus de l'organisme humain [37] ; ainsi les préparations d'antioxydants naturels sont vivement recherchées. Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens.

Les huiles essentielles quant à elles, ainsi que les extraits aromatiques ont été utilisées pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l’Egypte ancienne, les techniques de l’embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l’HE, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les vieux ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l’HE étaient les principes actifs qu’on peut retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives. Dans les ouvrages les plus récents, l’utilisation des huiles essentielles dans l’aromathérapie laisse entrevoir une perspective d’alternative aux médicaments de synthèse. Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes :

* Fongistatique, insecticide, nématocide, herbicide, bactériostatique et antioxydante

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques [38]. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d’origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu’agents antimicrobiens. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique. Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc....L’HE de thym d’Espagne (*Thymus capitatus*) est souvent rapporté comme étant parmi les huiles les plus actives. Dans notre étude, nous n’allons-nous intéresser qu’à deux activités biologiques : les activités antioxydantes et antifongique [37].

Partie 2 : Résultats et discussion

1. Criblage phytochimique de *Centaurea acaulis* :

1.1. Groupes chimiques caractérisés :

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé les tests phytochimiques sur les deux parties de la plante (racines, partie aérienne).

Ces tests phytochimiques ont été réalisés selon la méthode décrite par **Bruneton** [39] pour détecter la présence des différentes familles de composés. Ils étaient basés sur l'observation visuelle d'un changement de couleur ou de formation de précipité après l'ajout des réactifs spécifiques.

Tableau 1: Prospection phytochimique des extraits des racines et des parties aériennes de *Centaurea acaulis*.

Extraits	Métabolites secondaires								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Racines	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Parties aériennes	+	+	+	-	+	+	-	-	-

1 : les tanins ; 2 : flavonoïdes ; 3 : Stérols et stéroïdes ; 4 : les alcaloïdes ; 5 : les saponosides ; 6 : Composés réducteurs ; 7 : les coumarines ; 8 : Amidon ; 9 : Anthocyanosides

(+) : présence ; (-) : absence

Les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques.

Le tableau 1 : montre la présence de divers composés, on remarque que les extraits de solvant montrent une inférence positive pour le test des tanins, des flavonoïdes, des stérols et stéroïdes, et des composés réducteurs pour les deux parties de la plante. Les saponosides étaient présents uniquement dans les parties aériennes, alors que le test des alcaloïdes, coumarines, amidon, anthraquinones et les anthocyanosides produit une inférence négative avec tous les extraits.

Les résultats montrent que cette plante est riche en composés phénoliques tel que les tanins et les flavonoïdes qui sont des substances reconnues pour leur propriété antioxydante [3]. Les tanins sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines avec une tendance à l'imperméabilité des couches externes et la protection des couches sous-jacentes.

1.2. Teneurs en eau :

% Eau = (masse eau ÷ masse végétal essai) × 100

Racine =15,62%

Partie aérienne =34,37%

Nous constatons que :

- Comme la plupart des végétaux, notre plante est riche en eau.
- Les Parties aériennes disposent d'un plus grand rendement comparativement aux racines.

2. Rendement des extractions :

Rendement en huile essentielle (en %) :

Racine =0,07%

Partie aérienne =0,16%

Il apparait au vu des résultats que les parties aériennes de la plante enregistrent des rendements de l'huile essentielle plus importante par rapport à ceux des racines (0.16 % contre 0.07 %).

3. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes et des racines de *Centaurea acaulis* :

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

Le matériel végétal a été récolté en mars 2014, dans les régions de Beni snous et Amieur dans la wilaya de Tlemcen où elle pousse en abondance. Il a été hydrodistillé durant 5 heures dans un appareillage de type Clevenger (**Figure 10 parties expérimentales**).

Après l'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes et des racines par hydrodistillation, la composition de l'huile essentielle a été analysée par CPG et CPG-SM. Le mode opératoire est détaillé dans la partie : matériels et méthodes.

L'analyse des huiles essentielles des racines et des parties aériennes nous a permis l'identification de 58 composés avec un pourcentage de 92.6 et 91.7-92.4 % respectivement pour les racines et les parties aériennes. Leurs indices de rétention et leur pourcentage relatif sont présentés dans le tableau 2.

Parmi ces derniers, 12 composés non terpéniques, 13 monoterpènes, 28 sesquiterpènes et 2 diterpènes ont été identifiés. L'identification des 57 composés est réalisée en comparant leur spectre de masse et leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque «aromes» propre au laboratoire de Corse (France).

Dans l'huile essentielle des racines, les sesquiterpènes oxygénés représentaient 33 % de la composition totale; en particulier, 32.1 % était représenté par le caryophyllène oxyde. Les sesquiterpéniques hydrocarbonés étaient représentés par 03 dérivés, mais leur pourcentage (10.5 %) était considérablement plus faible que les sesquiterpènes oxygénés.

Tableau 2 : Composition chimique de huile essentielle des racines et des parties aériennes de *Centaure acaulis*

N° ^a	Composés	RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Racines	S1	S2	Identification
1	Hex-3-én-1-ol (E)	812	791	1966	0,4	-	-	IR, SM
2	Hex-3-én-1-ol (Z)	831	825	1380	0,2	-	-	IR, SM
3	α-Thujène	922	923	1023	-	-	-	IR, SM
4	α-Pinène	936	931	1022	-	3,1	1,7	IR, SM
5	Sabinène	973	966	1120	-	-	0,5	IR, SM
6	β-pinène	978	970	1110	3,9	-	0,1	IR, SM
7	Myrcène	987	981	1159	-	1,7	0,9	IR, SM
8	p-Cymène	1015	1011	1265	-	tr	tr	IR, SM
9	Limonène	1023	1022	1197	-	4,8	2,7	IR, SM
10	(Z)-β-ocimène	1024	1026	1230	-	-	0,1	IR, SM
11	(E)-β-ocimène	1041	1037	1247	-	-	0,4	IR, SM
12	Nonanal	1083	1083	1394	-	0,7	0,7	IR, SM
13	Linalool	1081	1088	1544	-	1,2	tr	IR, SM
14	Terpinène-4-ol	1164	1162	1590	-	-	0,2	IR, SM
15	méthyl-Salicylate	1173	1170	1731	0,7	-	0,1	IR, SM

16	Décanol	1185	1185	1498	-	-	0,2	IR, SM
17	Dec-3-èn-2-one	1219	1221	1601	1,3	-	-	IR, SM
18	L'acétate de néryl	1342	1341	1725	-	-	tr	IR, SM
19	L'acétate de géranyl	1361	1361	1752	-	-	tr	IR, SM
20	α -Copaène	1379	1375	1488	-	-	0,6	IR, SM
21	β -Elemène	1388	1387	1589	-	-	tr	IR, SM
22	Dodécanal	1389	1390	1695	2,5	-	tr	IR, SM
23	(E)-β-Caryophyllène	1424	1418	1591	6,5	2,9	1,9	IR, SM
24	E- α -Bergamotène	1432	1432	1580	-	-	tr	IR, SM
25	α -Humulène	1456	1450	1665	0,5	-	0,4	IR, SM
26	γ -Curcumène	1474	1474	1685	-	-	-	IR, SM
27	Germacrène-D	1480	1478	1704	3,5	-	0,8	IR, SM
28	β -Selinène	1483	1482	1712	-	-	0,6	IR, SM
29	4-epi-Cubèbol	1487	1487	1870	-	-	0,2	IR, SM
30	Bicyclogermacrène	1494	1491	1727	-	-	0,1	IR, SM
31	α -Muuroène	1496	1493	1719	-	-	0,1	IR, SM
32	E-E- α -Farnesène	1498	1497	1744	-	-	-	IR, SM
33	β -Cadinène	1507	1506	1752	-	-	0,1	IR, SM
34	δ -Cadinène	1516	1515	1752	-	-	0,2	IR, SM
35	3-(Z)-benzoate d'hexènyl	1554	1550	2088	-	-	0,4	IR, SM
36	Germacrène-D-4-ol	1573	1567	2025	-	1,3	1,2	IR, SM
37	oxyde de caryophyllène	1576	1571	1980	32,1	29,6	27,6	IR, SM
38	Salvial-4-en-1-one		1580		-	2,2	2,1	IR, SM
39	Verridiflorol	1591	1584	2089	-	12,8	11,5	IR, SM
40	Epoxyde d'Humulène II	1601	1599	2044	1,1	3,9	3,7	IR, SM
41	Eudesmol	1619	1617	2197	-	2,3	0,9	IR, SM
42	epi-Cubénol	1624	1623	2059	-	-	1,9	IR, SM

43	τ -Muurolol	1634	1630	2103	-	-	2,1	IR, SM
44	β -Eudésmol	1644	1640	2232	-	6,7	7,2	IR, SM
45	α -Cadinol	1645	1641	2232	-	2,3	1,1	IR, SM
46	α -Eudésmol	1653	1649	2220	-	1,4	2,6	IR, SM
47	(Z, Z)-Farnésol	1653	1653	2163	-	1,4	3,1	IR, SM
48	NI	-	1661		27,9	-	-	IR, SM
49	Eudésm-4(15)-7-dién-1 β -ol	1672	1670	2347	-	2,3	3,2	IR, SM
50	(E, Z)-Farnésol	1687	1682	2311	-	-	-	IR, SM
51	Pentadécanol		1696		-	-	0,9	IR, SM
52	NI	-	1876		6,6	-	-	IR, SM
53	NI		1945		5,3	-	-	IR, SM
54	(Z)-Phytol	2080	2081	2572	-	0,1	0,1	IR, SM
55	Heneicosane	2100	2099	2101	0,5	3,3	2,1	IR, SM
56	(E)-Phytol	2114	2113	2591	-	5,2	6,3	IR, SM
57	Eicosane	2200	2201	2200	-	3,2	1,1	IR, SM
Total %					92,6	92,4	91,7	
Monoterpènes hydrocarbonés					3.9	9.6	6.4	
Monoterpènes oxygénés					-	1.2	0.2	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					10.5	2.9	4.8	
Sesquiterpènes oxygénés					33.2	66.2	68.4	
Diterpènes oxygénés					-	5.3	6.4	
Composés non-terpéniques					5.8	7.2	5.5	
Non Identifiés					39.8	-	-	

a: L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). b: Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRIa). c : Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa). dRIa : indices de rétention sur colonne polaire Rtx-RIp. f RI : indices de rétention; MS : spectre de masse en mode impact électronique.

Cependant trois composés dans les racines de *Centaurea acaulis* qui font plus de 39 % de la composition restent inconnus et leurs identifications est nécessaire.

L'huile essentielle des parties aériennes était constituée par un nombre plus important de composé par rapport aux racines (42 contre 16). Encore une fois, les sesquiterpènes oxygénés (66.2-68.4 %) ont été les produits les plus importants identifiés, principalement en raison de la forte proportion du caryophyllène oxyde (27.6-29.6 %), verridiflorol (11.5-12.8 %) et β -eudesmol (6.7-7.2 %). Les diterpènes oxygénés représentaient 5.3-6.4 % de l'huile essentielle, avec le (E)-phytol (5.2-6.3%) comme le principal composé.

Les Sesquiterpènes hydrocarbonés ont été moins représentés (2.9-4.8 %). Alors que les monoterpènes étaient représentés par α -pinene (1.7-3.1 %), myrcène (0.9-1.7 %) et le limonène (2.7-4.8 %).

L'huile essentielle de *Centaurea acaulis* est principalement composée par des sesquiterpènes, de plus une attention a été accordée au rôle pharmaceutique et médicinal de sesquiterpènes. De nombreuses études ont montré que les sesquiterpènes ont diverses activités biologiques, y compris antibactérien, activité cytotoxique et antifongique [40]. D'après la littérature [41][42], les sesquiterpènes étaient capables d'inhiber la croissance de certaines bactéries et des champignons au cours des essais in vitro. Le Caryophyllène oxyde, comme constituant relativement majeur dans l'huile de l'étude, est connu pour avoir des propriétés antibactériennes très efficaces [43].

4. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante est nécessairement faite par au moins deux méthodes différentes [44]. En effet la mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de *Centaurea acaulis* a été réalisée par quatre techniques chimiques (test antioxydant par CCM, le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer et le blanchiment du β -carotène).

4.1. Test antioxydant par CCM

Le chromatogramme de l'huile essentielle de *Centaurea acaulis* (figure 2) a été révélé par une solution de DPPH à la concentration de 0.2 mg/mL dans le méthanol. Le chromatogramme, présente des tâches jaunes sur un fond violet : ce sont des constituants, capables de réduire le radical DPPH oxydant, qui donnent des indications intéressantes sur l'activité anti-radicalaire des huiles essentielles.



Figure 2 : Plaque de CCM présentant des tâches à activité antioxydante avec le DPPH de l'huile essentielle de *Centaurea acaulis*

4.2. Piégeage du radical libre DPPH (2, 2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle):

L'activité antioxydante d'huile essentielle de *Centaurea acaulis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement (**Figure 3**) en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm.

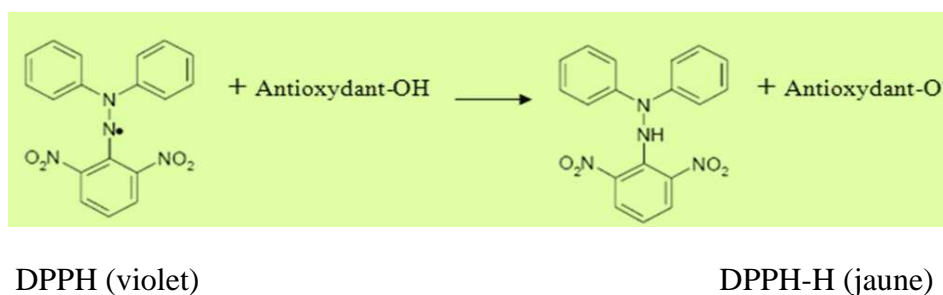


Figure 3: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions pour le BHT, et pour les huiles brutes.

Les différentes densités optiques ont permis de tracer pour chaque huile, une courbe d'allure exponentielle (**Figure 12 et 13 Partie expérimentale**), ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'huile dans le milieu réactionnel.

Tableau 3 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile de *Centaurea acaulis* et du BHT à différentes concentrations

Echantillons	Activité antioxydante				
	Concentration de l'huile ($\mu\text{g/mL}$)	100.45	110.44	120.48	150.67
Huile	Effet du balayage sur le DPPH (%)	22.85	42.56	60.9	76.2
racines	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)				114.2
	Concentration de l'huile ($\mu\text{g/mL}$)	54.95	65.94	81.42	109.9
Huile	Effet du balayage sur le DPPH (%)	38.21	45.30	83.49	95.36
P. aérienne	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)				73.01
	Concentration de BHT ($\mu\text{g/mL}$)	2	5	10	20
BHT	Effet du balayage sur le DPPH (%)	18.55	30.40	35.95	55.85
	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)				17.36

Nous avons calculé les IC₅₀ pour chaque huile à partir de l'équation logarithmique de la courbe tracée (**figure 12 et 13**). Nous remarquons en premier lieu que toutes nos huiles ont des activités moins importantes que l'antioxydant de référence, le BHT. En second lieu, l'huile de la partie aérienne est généralement la plus active par rapport à l'huile de la racine.

En vu des résultats si dessus, nous pouvons dire que les huiles essentielles de la partie aérienne de la plante ont des pouvoirs réducteurs, plus importants par rapport aux racines et ont atteint 50% de réduction pour une concentration de 73,01 mg/mL.

L'huile essentielle des racines à révélés des activités moins importantes que la partie aérienne, elle a atteint 50% de réduction à des concentrations proches de 114,2 $\mu\text{g/mL}$. L'huile de la plante a été en mesure de réduire le DPPH stable de couleur pourpre radical en couleur jaune DPPH-H et d'atteindre 50% de réduction avec une IC₅₀ comme suit: 114.2 $\mu\text{g/mL}$ pour les racines et 73.01 $\mu\text{g/mL}$ pour la partie aérienne (**Tableau 3**). La comparaison de l'activité de balayage DPPH des huiles essentielles étudiées avec celles exprimées par le BHT (17.36 $\mu\text{g/mL}$) a montré que toutes les huiles essentielles examinées exprimé un effet antioxydants intéressant mais qui reste inférieur au témoin BHT (17.36 $\mu\text{g/mL}$).

Le résultat du test de l'activité du balayage du DPPH de cette étude indique que les deux huiles essentielles ont été actives. Ceci suggère que les huiles essentielles contiennent des composés qui

sont capables de céder un atome d'hydrogène à un radical libre afin d'éliminer l'électron impair qui est responsable de la réactivité du radical.

D'après les résultats, le classement des huiles selon la méthode du piégeage du radical DPPH est confirmé par le classement obtenu par la méthode de réduction du fer.

4.3. Réduction du fer (FRAP) :

La figure 4: montre les potentiels de pouvoir réducteur des huiles essentielles de la plante test par comparaison avec un étalon l'acide ascorbique à 700 nm. Dans l'essai de pouvoir réducteur, la présence d'antioxydants dans l'échantillon aurait pour résultat la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} en donnant un électron. La quantité de complexe Fe^{2+} peut ensuite être contrôlée par la mesure de la formation du bleu de Perl à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance (DO) indique une augmentation de la capacité réductrice.

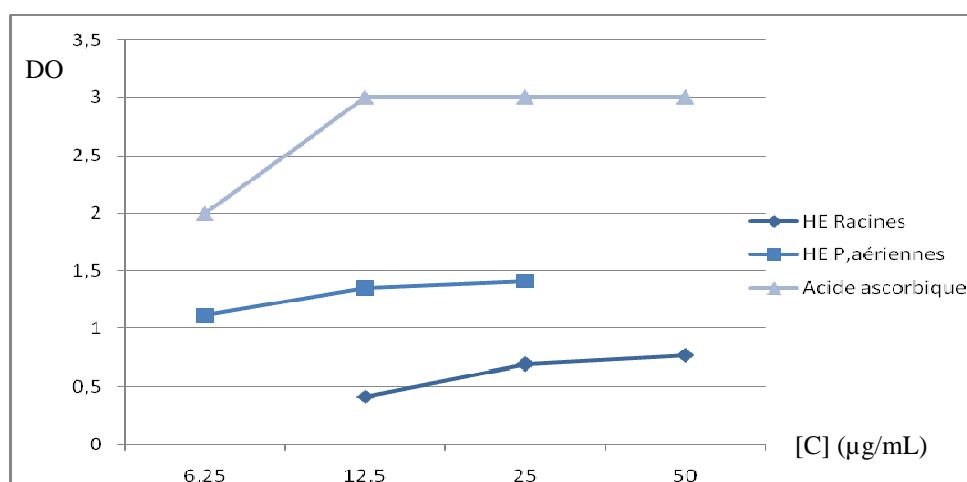


Figure 4 : Pouvoir réducteur des huiles des racines, des parties aériennes et de l'acide ascorbique de *Centaurea acaulis*

Les résultats montrent que le pouvoir réducteur des huiles essentielles des deux parties est dose dépendante (concentration dépendante), plus la concentration des huiles augmente plus la capacité réductrice augmente (**Figure 4**). Les huiles des deux parties de la plante recueillie présentent des activités antioxydantes nettement inférieures que celui de l'étalon (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale. Les huiles la partie aérienne sont généralement les plus actifs, puis les huiles des racines.

4.4. Test de blanchissement du β -carotène :

Dans le test de blanchissement du β -carotène, on utilise de l'acide linoléique, un acide gras polyinsaturé. On introduit du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie

spectrophotométriquement à 490 nm. Le caractère antioxydant de l'huile testé engendre une neutralisation des radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, prévenant ainsi l'oxydation et donc le blanchissement du β -carotène.

Ainsi, la capacité antioxydante de l'huile essentielle est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

Tableau 4 : Activité antioxydante de l'huile essentielle et de BHT par la méthode de dosage de blanchiment de β -carotène/acide linoléique à différentes concentrations

Echantillons	Activité antioxydante			
	Concentration de l'huile ($\mu\text{g/mL}$)	20	60	120
Huile	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	13.55	40.67	81.34
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			73.76
Racine	Concentration de l'huile ($\mu\text{g/mL}$)	10	20	50
	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	10.85	21.71	54.28
Huile Partie aérienne	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			46,05
	Concentration de BHT ($\mu\text{g/mL}$)	0.5	0.8	1.0
BHT	Inhibition du blanchiment du β -carotène (%)	37.68	60.28	75.36
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			0.66

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β -carotène/acide linoléique est proportionnel à la concentration. Toutes les huiles de la plante inhibent le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libre (Tableau 4). L'huile essentielle des parties aérienne révèle une intéressante activité avec une $\text{IC}_{50}= 46.05 \mu\text{g/mL}$ suivi par l'huile essentielle des racines avec $\text{IC}_{50}= 73.76 \mu\text{g/mL}$. Ces activités restent toujours inférieures au BHT à raison de $0.66 \mu\text{g/mL}$.

5. Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Centaurea acaulis* a été effectuée par la méthode de disques, et ce vis-à-vis de quatre souches bactériennes. Les souches étudiées sont représentées dans le tableau 5.

Tableau 5: Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) par la méthode de disques

Souches bactériennes	DD (mm)			
	Racines	Parties aériennes	Témoins	
			Ciprofloxacine	Gentamycine
Bactéries à Gram-positives				
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	8	33	21.33
<i>Bacillus cereus</i>	12	8	33.5	23
Bactéries à Gram-négatives				
<i>Escherichia coli</i>	6	6	36	21.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6	33	21.33

DD = diamètre de diffusion du disque

La méthode de disques permet de déterminer la susceptibilité des bactéries aux agents antibactériens. Après 15 min de l'application des disques, les boîtes Pétri sont incubées à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18 à 24 h. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition uniformément circulaire (mm). Le choix des souches de référence sensibles aux antibiotiques sont de préférence employées, diverses combinaisons sont possibles, mais un panneau devrait au moins se composer d'une bactérie à Gram positif et une autre à Gram négatif [45]. Sur cette base, le choix des souches bactériennes pour la réalisation de ces tests antimicrobiens a été fait de façon à obtenir un représentant de chaque classe. Les résultats des tests préliminaires de l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des deux parties de la plante sont présentés dans le tableau 5.

Les résultats montrent une activité antibactérienne de l'huile essentielle de la racine vis-à-vis des souches bactériennes à Gram positif, le plus grand diamètre étant de 12 mm (racines) contre *Bacillus cereus* et de 10 mm (racines) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (**figure 6**). La zone d'inhibition de la partie racinaire se rapproche de la zone d'inhibition de la gentamycine surtout vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*.

Par contre, aucune activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries à Gram négatif n'a été observée (**figure 5**).

Cette résistance aux agents antimicrobiens remarquée chez des bactéries test à Gram négatif peut être expliquée par la présence de la double paroi chez ces dernières [46]. En plus, l'utilisation intensive des antibiotiques a provoqué une augmentation inquiétante de la multi-résistance des bactéries pathogènes et l'émergence de nouveaux pathogènes.

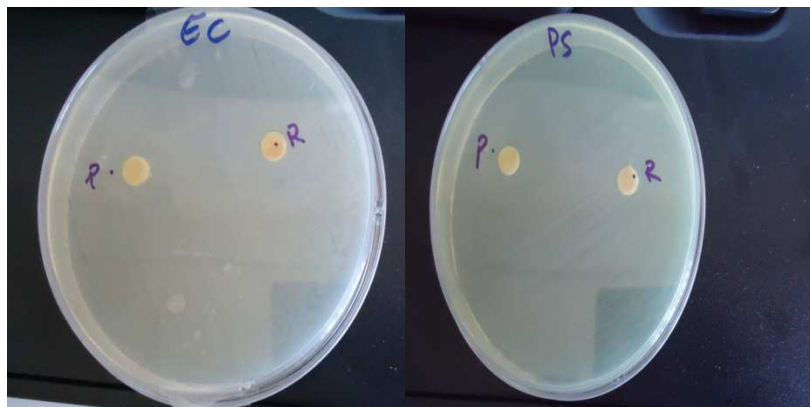


Figure 5. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la plante vis-à-vis des bactéries à Gram négatif : à droite : vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ; à gauche : vis-à-vis d'*Escherichia coli*



Figure 6 .Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la plante vis-à-vis des bactéries à Gram positif : à droite : vis-à-vis de *Bacillus cereus* ; à gauche : vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

6. Test antifongique in vivo des hydrolats de *Centaurea acaulis* contre le développement de quatre champignons de *C. sinensis* :

Les résultats du test in vivo de la pourriture des agrumes par les hydrolats de *Centaurea acaulis* sur les quatre souches (B, C, E et I), sont présentés dans la figure 14 Selon les résultats des tests, les hydrolats ont montrés une activité antifongique intéressante, même à la fin du 10^{ème} jour.



Figure 7 : Oranges non pourries dans lequel l'hydrolat de *Centaurea acaulis* est appliqué 30 minutes avant l'inoculation par les pathogènes, et maintenu pendant 10 jours à 25 °C



Figure 8 : Oranges pourries non traitées par l'hydrolat de *Centaurea acaulis* après l'inoculation par les pathogènes

7. Test de L'activité fongitoxique(antifongique in vitro) de l'huile essentielle de *Centaurea acaulis* contre le champignon pathogène *Penicillium sp* :

Tableau 6 : Effet de l'huile essentielle de *Centaurea acaulis* contre le champignon pathogène *Penicillium sp* par la technique pétriplate inversé.

Tests	Pourcentage d'inhibition de la zone mycélium du <i>Penicillium sp</i> (PI (%))		
	HEs (µL)	10	50
Racines	4	16	20
Partie aériennes	11	36	48

Le criblage de l'activité antifongique est réalisé par la technique pétriplate inversé. Les meilleures activités ont été obtenues avec l'huile essentielle de la partie aérienne avec un taux d'inhibition de 48 %. La partie racinaire inhibe au maximum 20% de la croissance mycélienne de la moisissure.

Selon la littérature, toutes les huiles essentielles possèdent une activité fongitoxique. La partie aérienne possède une bonne activité approchant les 50%. Selon ces résultats, on peut suggérer que la partie aérienne de cette plante peut être utilisée comme source alternative d'agents antifongiques pour la protection des humains ou des plantes contre les infections ayant pour origine les moisissures.

CONCLUSION

Centaurea acaulis est une plante à effet thérapeutique de la racine à la partie aérienne, prometteuse pour ses activités antimicrobienne et antioxydante.

Le screening phytochimique réalisé sur les parties aériennes et les racines, a révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et stéroïdes, des saponosides, composés réducteurs, et des huiles essentielles.

Les rendements des huiles essentielles réalisés sur les différentes parties de la plante sont relativement importants, notamment pour les parties aériennes où les rendements sont les plus élevés avec plus de 0.16%. L'analyse des huiles essentielles des racines et des parties aériennes nous a permis l'identification de 58 composés. Parmi ces derniers, 12 composés non terpéniques, 13 monoterpènes, 28 sesquiterpènes et 2 diterpènes ont été identifiés. Cependant trois composés dans l'huile essentielle des racines de *Centaurea acaulis* qui font plus de 39 % de la composition sont restés inconnus.

Le pouvoir antioxydant des huiles sont moyens à faible en général, avec des IC_{50} inférieurs à 74 $\mu\text{g/mL}$ pour les parties aériennes et de 115 $\mu\text{g/mL}$ pour les racines. Ces résultats sont confirmés par deux méthodes, la réduction du fer et le test de blanchissement du β -carotène.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est moyenne à bonne sur les souches testées et des études plus poussées sont nécessaire.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antifongique in vivo des hydrolats de *Centaurea acaulis* sur quatre champignons phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryza*, *Penicillium italicum* et *Fusarium solani*), responsables de la pourriture des oranges. Les résultats ont montré que les hydrolats possèdent une activité antifongique très intéressante et qui pourraient être utilisés pour la gestion de ces pathogènes comme source alternative de fongicides écologiques ou une alternative idéale pour contrôler les infections pendant le stockage des oranges.

Aussi nos perspectives pour l'avenir seront :

- Extraction et isolement des produits du métabolisme secondaires et de tester leur activités biologiques.

- Tester les différentes familles ou molécules isolées, in vitro et in vivo sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique des molécules actives isolées.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de *Centaurea acaulis* comme plante médicinale traditionnelle qui sera peut être très largement utilisée par les populations du nord de l'Afrique.

Partie 3 : Matériel et méthodes

1. Provenance du matériel végétal et identification :

Les racines et les parties aériennes de *Centaurea acaulis* été collectées en mois de février 2014 dans la région de Beni Snous ,Amayer et Zenata dans la wilaya de Tlemcen.

Le matériel végétal est constitué de racines et de la partie aérienne de *Centaurea acaulis*. Ces différents organes ont été lavés sous un courant d'eau continu pendant 5min, découpés en petits morceaux triées, séparées et séchées à l'ombre dans un endroit bien aérée pendant 10 jours, ensuite les parties végétales ont été bien conservées jusqu'à leur utilisation à des fins pratiques pour les différents extractions des principes actifs, notant qu'avant le lavage une quantité est récupérée pour la détermination de la teneur en eau (taux d'humidité).

L'identification de la plante a été faite par le Docteur **Kazi Tani Choukry** du département d'agronomie et le Professeur **BOUAZZA Mohamed** du département de Biologie de l'université : Abou Bakr Belkaid de Tlemcen où un spécimen a été déposé.

1.1. La teneur en eau :

Elle est déterminée par la Méthode gravimétrique qui consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

Matériel :

Balance analytique de précision, Etuve réglée à 110°C, Verre de montre, Pince, Spatule métallique, Capsules en verre.

Technique :

- Nous avons opéré sur un échantillon homogène, broyé ou concassé.
- Faire une prise d'essai de 1 à 2 g (peser au mg près).
- Dessécher de façon à obtenir une masse constante après plusieurs pesées consécutives.

Calcul:

- Masse végétal essai = masse avant étuve - tare
- Masse végétal eau =masse avant étuve – masse après étuve
- % Eau = (masse eau ÷ masse végétal essai) × 100

2. Criblage phytochimiques :

2.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau chaude :

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 mL d'eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure (**Figure 9**). Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux tests suivants.



Figure 9 : Montage d'un extracteur de Soxhlet

i. Amidon :

Le test effectué consiste à :

- Chauffer 5 mL de l'extrait aqueux avec 10 mL d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition ;
- Ajouter quelques gouttes du réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée [47] .

ii. Saponosides :

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 mL de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée :

Pas de mousse = test négatif

Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif

Mousse de 1-2 cm = test positif

Mousse plus de 2 cm = test très positif [48]

iii. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, 1 mL de l'extrait aqueux, 1 mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins [48].

2.2. Epuisement du matériel végétal avec l'éthanol

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, 10 g de matériel végétal est mis en présence de 60 mL d'éthanol. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Ensuite, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux tests suivant:

a) Flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 mL de l'extrait éthanolique avec 1 mL d'HCL concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes [49].

b) Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 mL de l'extrait éthanolique, 2 mL d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée.

Un test est révélé par l'apparition d'une coloration bleu- noire (tanins galliques), bleu-verte (tanins cathéchiques) [48] .

c) Composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 mL de l'extrait éthanolique avec 2 mL d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique [48].

d) Autres métabolites secondaires

✓ Coumarines

1 g d'échantillon de la poudre végétal est placé dans un tube à essai en présence de quelque gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant quelques minutes.

Puis on ajoute 0,5 mL de NH_4OH dilué (10%) et on va mettre deux taches sur un papier filtre qui sont examinées sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines [50] .

✓ *Stérols et triterpènes*

Elle se fait sur une macération de 24 h à 5 % dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageant était verte ou violette [48].

✓ *Alcaloïdes*

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 h de 10 g de la poudre végétale dans 50 mL de H₂SO₄ dilué au 1/10 à la température ambiante du laboratoire. Après filtration sur un papier lavé à l'eau distillée et de manière à obtenir environ 50 mL de filtrat, 1mL du macéré est introduit dans deux tubes à essai puis 5 gouttes de réactif de Mayer ont été ajouté dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner ont été ajouté dans le deuxième. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes [49].

✓ *Anthocyanes*

2 mL d'infusé aqueux sont ajoutés à 2 mL de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes[49].

3. Méthodes utilisées pour l'extraction des huiles essentielles :

Les hydrodistillations ont été réalisées avec un appareil de type Clevenger (Figure 10), pendant une durée de 5 h. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre ambré à une température de 4°C. Les rendements sont calculés par rapport à la masse de végétal frais.



Figure 10: Montage d'hydrodistillation de type Clevenger

4. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles

4.1. Analyse par CPG/FID :

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composants, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i; épaisseur du film : 0,25 µm)

respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (1mL/min) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C/mm, puis en un palier de 45 mm à 230°C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'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.

4.2. Couplage CPG/Spectrométrie de masse :

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

4.3. Méthodologie d'analyse :

Une huile essentielle, fractionnée ou non, est analysée simultanément par CPG/Ir et CPG/SM. Le calcul des indices de rétention, polaires et apolaires, et la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir. L'analyse par CPG/SM (**Figure 11**) permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, l'une élaborée au laboratoire de Corse et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées [51]. Chaque proposition du logiciel de comparaison des spectres de masse est assortie d'une note de concordance qui reflète la validité de la structure proposée. Si la note de concordance est correcte, on compare les indices de rétention du constituant proposé à ceux présents dans la bibliothèque élaborée au laboratoire, ou dans des bibliothèques commerciales [52], ou répertoriés dans la littérature.



Figure 11 : Instrumentation pour le couplage CPG/SM

5. L'évaluation de l'activité antioxydante :

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, 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.

5.1. Evaluation de l'activité antioxydante par CCM :

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

Butanol-Acétate d'éthyle-Eau (65 : 15 : 25) pour les extraits polaires, tandis que les extraits apolaires ont été développés dans le système de solvants éther-acétate d'éthyle (50 : 50). Après migration, les chromatogrammes ont été séchés à l'aide du séchoir électrique puis révélés à l'aide d'une solution de DPPH à la concentration de 2 mg / mL (M / V) dans le méthanol. En présence de substances antioxydantes, le DPPH est réduit et passe de la couleur pourpre au jaune.

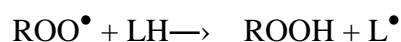
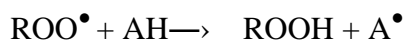
Sur les plaques CCM, les zones d'activités antiradicalaires apparaissent en jaune-clair sur fond violet après un temps optimal de 30 mn [53] .

La plupart des méthodes sont basées sur l'utilisation des 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.

Les tests basés sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT, Hydrogen Atom Transfer), dans lequel l'antioxydant et le substrat sont en compétition pour les radicaux peroxyles ROO^\bullet :



Il existe de nombreuses méthodes de mesure de l'activité antioxydante :

5.2. Piégeage du radical libre DPPH (2, 2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle) :

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm.

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picrylhydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance [54].

5.2.1. Mode opératoire :

Selon le protocole décrit par SANCHEZ-MORENO [55]. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol (6×10^{-5} M). 50 μ l des solutions d'huile ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 950 μ L de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité radicalaire} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle} \times 100$$

- **Calcul des IC₅₀ :**

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC₅₀ (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testée [56].

Figure 12 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH d'huile essentielle des

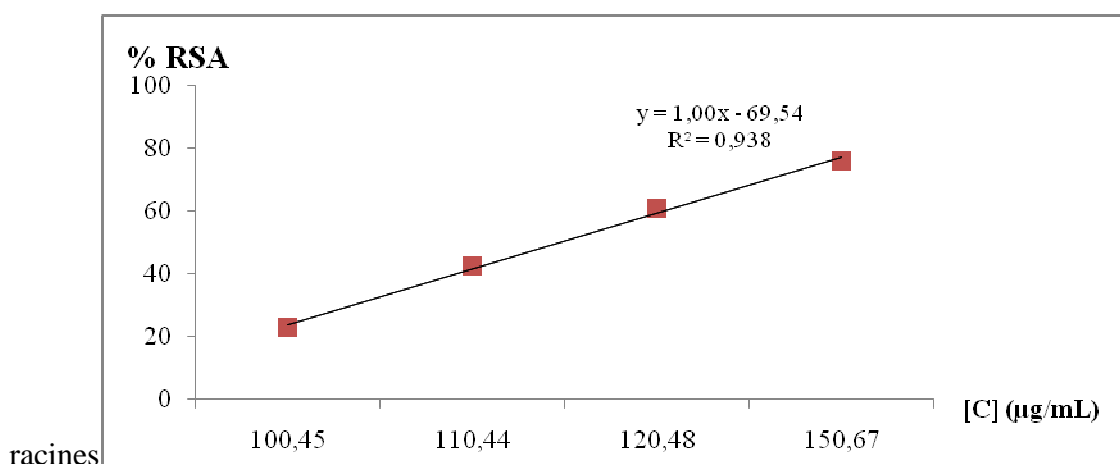
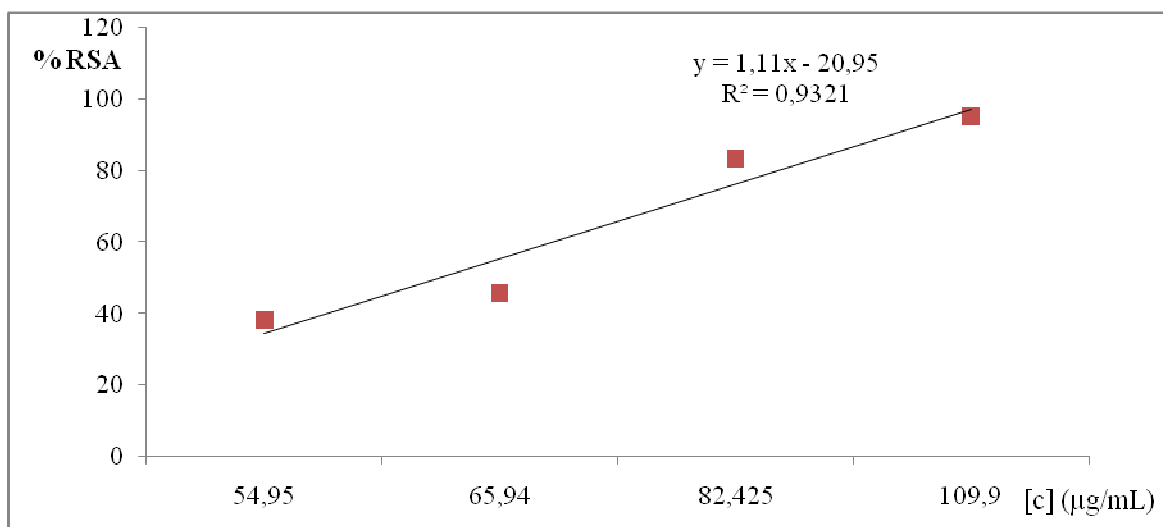


Figure 13 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH d'huile essentielle de la partie aérienne



N.B : Le BHT et l'acide ascorbique sont utilisées comme contrôle positif, dans les deux méthodes de l'évaluation de l'activité antioxydantes (DPPH et réduction du fer), et aux mêmes conditions expérimentales.

5.3. Réduction du fer: FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :

5.3.1. Principe :

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotométrie (**Figure 14**) à 700 nm.



Figure 14 : spectrophotomètre UV

5.3.2. Mode opératoire :

Cette méthode est déterminée en utilisant la technique d'Oyaizu [57]. Les différentes concentrations de l'extrait dans l'eau distillée (1 mL) sont mélangées avec 2.5 mL de la solution

tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 mL de ferricyanure de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ (1%). Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 20 min. Après, 2.5 mL de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min (**Figure 14**). A la fin, 2.5 mL du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 2.5 mL de l'eau distillée et 0.5 mL de $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ (0.1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

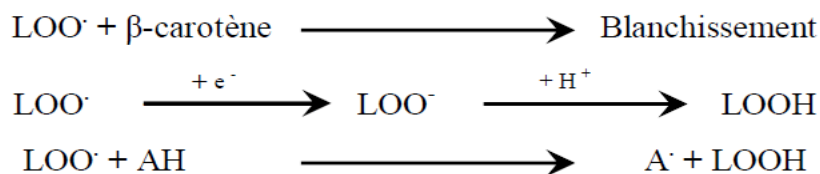


Figure 15 : centrifugeuse : SIGMA

5.4. Test de blanchissement du β -carotène (β -carotène bleaching method) :

5.4.1. Principe :

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *Centaurea acaulis* est mesurée selon la méthode de Tepe [58]. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique [58].



5.4.2. Mode opératoire

Dissoudre 2 mg de β -carotène dans 1 mL de chloroforme. La solution obtenue est introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du

chloroforme, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2.5 mL sont transférés dans des tubes auxquels sont additionnés 350 µL de chaque huile à différentes concentrations.

Un tube contenant 2.5 mL d'émulsion et 350 µL d'éthanol servira de témoin négatif. L'absorbance est immédiatement mesurée à 470 nm, D'autres lectures sont faites à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h, et 48h) [58]. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

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

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

Où :

-**AAR** : activité anti-oxydante relative.

-**Abs** Échantillon : absorbance de l'échantillon après 48 heures.

-**Abs** BHT : absorbance du BHT après 48 heures.

6. Tests de l'activité antimicrobienne :

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'huile essentielle. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé [45].

6.1. Souches :

Les souches utilisées sont quatre souches bactériennes.

Souches bactériennes		ATCC
Bactéries à Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
Bactéries à Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25912
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

6.2. Evaluation de l'activité sur milieu gélosé:

La méthode de disques permet de déterminer la susceptibilité des bactéries aux agents antibactériens. Cette technique est réalisée selon les recommandations de Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI M02-A10. [59]

L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur milieu gélosé non sélectif. 3 à 5 colonies bien distinctes sont suspendues dans l'eau physiologique 0.85 %, ensuite, la suspension est ajustée au standard 0.5 McFarland avec un spectrophotomètre à 625 nm qui correspond à une densité optique de 0.08 – 0.1. Donc, la suspension bactérienne contient approximativement $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

Des disques en papier filtre Wattman n° 4 de 6 mm de diamètre sont stérilisés par autoclavage, puis imprégnés par 04 µl de l'huile essentiel de la plante (partie racinaire et aérienne). Le milieu de culture recommandé est la gélose Mueller Hinton à pH 7.2 à 7.4.

L'ensemencement se fait par écouvillonnage de l'inoculum sur la gélose grâce à des stries serrées tout en tournant la boîte à 60° à trois reprises. Ensuite, les disques sont déposés dans les boîtes sur la gélose préalablement ensemencé.

Après 15 min de l'application des disques, les boîtes Pétri sont incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 h.

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition uniformément circulaire (mm) [60] .

7. Activité antifongique in vivo de l'huile essentielle de *Centaurea acaulis* contre le développement de champignons de *C. sinensis* :

7.1. Champignons pathogènes :

Quatre isolats fongiques causant la pourriture des oranges : *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Oryza*, *Penicillium italicum* et *Fusarium solani* ont été utilisées pour cette expérience [61].

7.2. Test antifongique in vivo :

Pour le test antifongique in vivo, nous avons utilisé la méthode décrite par Dikbas et al. [62], Les oranges sélectionnés pour les expériences ont été lavées dans de l'éthanol (70%) pendant 2 min, puis rincer deux fois avec de l'eau distillée stérile (10 min chacune) et séché à l'air. La surface des oranges stérilisée ont été blessés avec un clou à une profondeur uniforme de 3 mm. Les inoculums fongiques contenant 10^6 spores/mL a été préparée par raclage la matière de spores à partir de la surface des colonies avec un coton-tige humide et remise en suspension du matériau dans l'eau distillée contenant 0,5% de Tween 80. Pour le test de l'activité antifongique in vivo contre les 04 isolats fongiques, les hydrolats de *Centaurea acaulis* ont été appliqués directement à la concentration de 10 µg/mL et 25 µg/mL. Les hydrolats de *Centaurea acaulis* de la plante (racinaire et aérienne) et inoculum fongique ont été pulvérisés séparément sur les oranges blessés. Fruits non

inoculés avec l'agent pathogène ont été utilisés comme contrôle négatif. Les fruits ont été scellés dans des boîtes en plastique polyéthylène avec un taux d'humidité et incubées entre 20-25 °C, état de stockage.

7.3. L'activité fongitoxique (Test antifongique *in vitro*) :

L'activité fongitoxique a été évaluée par la technique d'empoisonnement de la nourriture[63]. Une pré-culture a été réalisée ; sur une boîte de Pétri, contenant le Sabouraud solide, un disque a été déposé au centre de la boîte provenant d'une culture pure, l'incubation se fait durant 7 jours.

Les extraits sont additionnés à 20 mL de milieu Sabouraud, les mélanges sont coulés sur des boîtes de Pétri. Après, un disque (6 mm de diamètre) du mycélium de la moisissure coupé de la périphérie de la pré-culture de 7 jours est déposé au centre des boîtes puis incubé à 25°C± 2 pendant 7 jours. La lecture est réalisée à partir du 3^{ème} jour en mesurant les diamètres des zones de croissance de l'hyphe par rapport au contrôle et le pourcentage d'inhibition mycélienne est calculé par la formule suivante :

$$T = \frac{D_b - D_a}{D_b} \times 100$$

Avec :

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

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

D_b : Le diamètre de témoin (mm).

Références bibliographique

- [1] A. Gurib-Fakim, « Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow », *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, n° 1, p. 1-93, févr. 2006.
- [2] A. Sofowora, *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. KARTHALA Editions, 2010.
- [3] « Quezel. P et Santana S. - Books - NCBI ». .
- [4] Mishio.T, Houma.T et Iwashina.T, « Yellow flavonoids in *Centaurea ruthencia* as flower pigments. Biochemical systematics and Ecology », p. 34, 2006.
- [5] « Die Wurzel von *Centaurea acaulis* (Rejagnou) und ihre Anwendung in der Färberei und Medicin nach Reboud. », *Arch. Pharm. (Weinheim)*, vol. 186, n° 1-2, p. 147-149, janv. 1868.
- [6] D. Roux, *Les nouvelles plantes qui soignent*. Alpen Editions s.a.m, 2005.
- [7] Schauenberg et Paris, « *Centaurea maroccana* Ball. Endémique d'Afrique du Nord », 2006.
- [8] Bellakhder, « Pharmacopée du Maroc », 1997.
- [9] S. Djeddi, A. Karioti, M. Sokovic, C. Koukoulitsa, et H. Skaltsa, « A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties », *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 16, n° 7, p. 3725-3731, avr. 2008.
- [10] N. Yayli, A. Yaşar, C. Güleç, A. Usta, S. Kolayli, K. Coşkunçelebi, et S. Karaoğlu, « Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena* », *Phytochemistry*, vol. 66, n° 14, p. 1741-1745, juill. 2005.
- [11] T. Milosević, C. Argyropoulou, S. Solujić, D. Murat-Spahić, et H. Skaltsa, « Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea pannonica* and *C. jacea* », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 5, n° 10, p. 1663-1668, oct. 2010.
- [12] C. Formisano, F. Senatore, S. Bancheva, M. Bruno, A. Maggio, et S. Rosselli, « Volatile components of *Centaurea bracteata* and *C. pannonica* subsp. *pannonica* growing wild in Croatia », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 5, n° 10, p. 1649-1654, oct. 2010.
- [13] C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Celik, M. Bruno, et S. Rosselli, « Volatile constituents of aerial parts of three endemic *Centaurea* species from Turkey: *Centaurea amanicola* Hub.-Mor., *Centaurea consanguinea* DC. and *Centaurea ptosimopappa* Hayek and their antibacterial activities », *Nat. Prod. Res.*, vol. 22, n° 10, p. 833-839, 2008.
- [14] C. Formisano, E. Mignola, F. Senatore, S. Bancheva, M. Bruno, et S. Rosselli, « Volatile constituents of aerial parts of *Centaurea sibthorpii* (Sect. *Carduiformes*, Asteraceae) from Greece and their biological activity », *Nat. Prod. Res.*, vol. 22, n° 10, p. 840-845, 2008.

- [15] F. Senatore, C. Formisano, A. Raio, G. Bellone, et M. Bruno, « Volatile components from flower-heads of *Centaurea nicaeensis* All., *C. parlatoris* Helder and *C. solstitialis* L. ssp. schouwii (DC.) Dostál growing wild in southern Italy and their biological activity », *Nat. Prod. Res.*, vol. 22, n° 10, p. 825-832, 2008.
- [16] C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Bancheva, M. Bruno, A. Maggio, et S. Rosselli, « Volatile components from aerial parts of *Centaurea gracilentia* and *C. ovina* ssp. *besserana* growing wild in Bulgaria », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 6, n° 9, p. 1339-1342, sept. 2011.
- [17] Y. Bülent Köse, G. Işcan, B. Demirci, K. H. C. Başer, et S. Celik, « Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis* », *Fitoterapia*, vol. 78, n° 3, p. 253-254, avr. 2007.
- [18] M. B. Jemia, C. Formisano, S. Bancheva, M. Bruno, et F. Senatore, « Chemical composition of the essential oils of *Centaurea formanekii* and *C. orphanidea* ssp. *thessala*, growing wild in Greece », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 7, n° 8, p. 1083-1086, août 2012.
- [19] F. Senatore, N. A. Arnold, et M. Bruno, « Volatile components of *Centaurea eryngiodes* Lam. and *Centaurea iberica* Trev.var. *hermonis* Bois. Lam.,two Asteraceae growing wild in Lebanon », *Nat. Prod. Res.*, vol. 19, n° 8, p. 749-754, déc. 2005.
- [20] O. Politeo, M. Skocibusic, I. Carev, F. Burcul, I. Jerkovic, M. Sarolic, et M. Milos, « Phytochemical profiles of volatile constituents from *Centaurea ragusina* leaves and flowers and their antimicrobial effects », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 7, n° 8, p. 1087-1090, août 2012.
- [21] N. Kahriman, G. Tosun, N. Y. İskender, Ş. Alpay Karaoğlu, et N. Yayli, « Antimicrobial activity and a comparative essential oil analysis of *Centaurea pulcherrima* Willd. var. *pulcherrima* extracted by hydrodistillation and microwave distillation », *Nat. Prod. Res.*, vol. 26, n° 8, p. 703-712, 2012.
- [22] G. Zengin, A. Aktumsek, G. O. Guler, Y. S. Cakmak, et Y. Kan, « Composition of essential oil and antioxidant capacity of *Centaurea drabifolia* Sm. subsp. *detonsa* (Bornm.) Wagenitz, endemic to Turkey », *Nat. Prod. Res.*, vol. 26, n° 1, p. 1-10, 2012.
- [23] L. Viegi, M. Boracchia, R. Cecotti, et A. Tava, « Volatile components of two endemic species from the Apuan Alps (Tuscany, Italy), *Centaurea arachnoidea* and *C. montis-borlae* (Asteraceae) », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 5, n° 8, p. 1285-1290, août 2010.
- [24] C. Formisano, F. Senatore, S. Bancheva, M. Bruno, A. Maggio, et S. Rosselli, « Volatile components of aerial parts of *Centaurea nigrescens* and *C. stenolepis* growing wild in the Balkans », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 5, n° 2, p. 273-278, févr. 2010.
- [25] Mélanie Turgeon, « PROFIL DES PRODUITS FORESTIERS PREMIÈRE TRANSFORMATION HUILES ESSENTIELLE ». Ministère des Ressources naturelles Secteur des forêts Direction du développement de l'industrie des produits forestiers, déc-2001.

- [26] *Huiles essentielles. Recueil, normes - AFNOR.* .
- [27] M. Turgeon et Q. (Province) D. du développement de l'industrie des produits forestiers, *Profil des produits forestiers*: première transformation: huiles essentielles. Ministère des ressources naturelles, Direction du développement de l'industrie des produits forestiers, 2001.
- [28] G. Gilly, *Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse*. Editions L'Harmattan.
- [29] A. Muselli, M. Pau, J.-M. Desjobert, M. Foddai, M. Usai, et J. Costa, « Volatile Constituents of *Achillea ligustica* All. by HS-SPME/GC/GC-MS. Comparison with Essential Oils Obtained by Hydrodistillation from Corsica and Sardinia », *Chromatographia*, vol. 69, n° 5-6, p. 575-585, mars 2009.
- [30] J. Tranchant, *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. Masson, 1982.
- [31] Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung,, « The identification of individual components in flavouring and flavoured foods ». Federation of European Chemical Societies, 1991.
- [32] L. Mondello, A. Casilli, P. Q. Tranchida, G. Dugo, et P. Dugo, « Comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with rapid scanning quadrupole mass spectrometry in perfume analysis », *J. Chromatogr. A*, vol. 1067, n° 1-2, p. 235-243, 2005.
- [33] P. Longevialle, *Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques*. Paris, New York: Masson, 1981.
- [34] E. Constantin, P. Traldi, D. Favretto, et A. Schnell, *Spectrométrie de masse: principes et applications*, 2e édition revue et augmentée. Paris Londres New York: Tec & doc-Lavoisier, 1996.
- [35] F. C. Marie E Lucchesi, « Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. », *J. Chromatogr. A*, vol. 1043, n° 2, p. 323-7, 2004.
- [36] A. L. Branen, « Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene », *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 52, n° 2, p. 59-63, févr. 1975.
- [37] R. C. Lindenschmidt, A. F. Tryka, M. E. Goad, et H. P. Witschi, « The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice », *Toxicology*, vol. 38, n° 2, p. 151-160, févr. 1986.
- [38] Department of Food Technology, Kaunas University of Technology, Radvilėnu pl. 19, LTU, B. D, P. A, V. P. R, et G. D, « Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil, *Food Res. Int.*, vol. 33, n° 9, p. 785-791, 2000.
- [39] J. Bruneton, *Pharmacognosie*: *Phytochimie, Plantes médicinales*. Paris; Cachan: Tec & Doc Lavoisier, 2009.

- [40] M. Seto, T. Miyase, K. Umehara, A. Ueno, Y. Hirano, et N. Otani, « Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity », *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 36, n° 7, p. 2423-2429, 1988.
- [41] R. R. P. Machado, W. Valente Júnior, B. Lesche, E. S. Coimbra, N. B. de Souza, C. Abramo, G. L. G. Soares, et M. A. C. Kaplan, « Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis », *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 22, n° 5, p. 1011-1017, oct. 2012.
- [42] F. Şahin, M. Güllüce, D. Daferera, A. Sökmen, M. Sökmen, M. Polissiou, G. Agar, et H. Özer, « Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey », *Food Control*, vol. 15, n° 7, p. 549-557, oct. 2004.
- [43] A.-L. S. Prokopios Magiatis, « Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. », *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.*, vol. 57, n° 3-4, p. 287-90.
- [44] S. P. Wong, L. P. Leong, et J. H. W. Koh, « Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants », *Food Chem.*, vol. 99, n° 4, p. 775-783.
- [45] P. Cos, A. J. Vlietinck, D. V. Berghe, et L. Maes, « Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept” », *J. Ethnopharmacol.*, vol. 106, n° 3, p. 290-302, juill. 2006.
- [46] F. Peláez, J. Collado, F. Arenal, A. Basilio, A. Cabello, M. T. D. Matas, J. B. García, A. G. Del Val, V. González, J. Gorrochategui, P. Hernández, I. Martín, G. Platas, et F. Vicente, « Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity », *Mycol. Res.*, vol. 102, n° 6, p. 755-761, juin 1998.
- [47] J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Technique & documentation-Lavoisier, 1999.
- [48] *Naturally Occurring Bioactive Compounds*. Elsevier, 2006.
- [49] S., G. H. & Gurib-Fakim A, *Plantes médicinales 2*. PROTA, 2013.
- [50] D. Yeo, R. Dinica, H. F. Yapi, B. Furdui, M. Praisler, A. J. Djaman, et J. D. N'Guessan, « Évaluation de l'activité anti-inflammatoire et screening phytochimique des feuilles de *Annona s enegalensis* », *Thérapie*, vol. 66, n° 1, p. 73-80, janv. 2011.
- [51] M. El Amine Dib, N. Djabou, J.-M. Desjobert, H. Allali, B. Tabti, A. Muselli, et J. Costa, « Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation », *Chem. Cent. J.*, vol. 4, p. 16, sept. 2010.

- [52] D. Joulain et W. A. König, *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. Hamburg: E.B.-Verlag, 1998.
- [53] M. C. Maior et C. Dobrotă, « Natural compounds with important medical potential found in *Helleborus* sp. », *Cent. Eur. J. Biol.*, vol. 8, n° 3, p. 272-285, mars 2013.
- [54] O. M. Atrooz, « The Antioxidant Activity and Polyphenolic Contents of Different Plant Seeds Extracts », *Pak. J. Biol. Sci.*, vol. 12, n° 15, p. 1063-1068, déc. 2009.
- [55] A. I. Al-Humaid, H. M. Mousa, R. A. El-Mergawi, et A. M. Abdel-Sala, « Chemical Composition and Antioxidant Activity of Dates and Dates-Camel-Milk Mixtures as a Protective Meal against Lipid Peroxidation in Rats », *Am. J. Food Technol.*, vol. 5, n° 1, p. 22-30, janv. 2010.
- [56] M. A. Torres, J. D. G. Jones, et J. L. Dangel, « Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens », *Plant Physiol.*, vol. 141, n° 2, p. 373-378, janv. 2006.
- [57] M. Oyaizu, « “Studies on products of the browning reaction » », *Japanese Journal of Nutrition*, p. vol. 44, no. 6, pp. 307-315., 1986.
- [58] Tepe, B.; Sokmen, M.; Akpulat, H. A.; Sokmen, A., « Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey », *FOOD CHEMISTRY*; 95, 2; 200-204, p. 5 Pages, 2006.
- [59] CLSI-Publishes-2009-Antimicrobial-Susceptibility-Testing-Standards.
- [60] R. Radji et K. Kokou, « Classification et valeurs thérapeutiques des plantes ornementales du Togo », *VertigO - Rev. Électronique En Sci. Environ.*, n° Volume 13 Numéro 3, déc. 2013.
- [61] L. Tabti, M. E. A. Dib, N. Gaouar, B. Samira, et B. Tabti, « Antioxidant and Antifungal Activity of Extracts of the Aerial Parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns Against Four Phytopathogenic Fungi of *Citrus sinensis* », *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 9, n° 1, p. 49-54, févr. 2014.
- [62] Neslihan Dikbas Recep Kotan, « Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits », *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 8, p. 209-214, 2009.
- [63] K. M. Soliman et R. I. Badeaa, « Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi », *Food Chem. Toxicol.*, vol. 40, n° 11, p. 1669-1675, nov. 2002.

