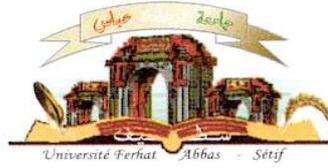


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES

N°...../SNV/2017

THÈSE

Présentée par

LAMAMRA Mebarka

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOLOGIE VÉGÉTALE

THÈME

**Activités biologiques et composition chimique des huiles
essentielles d'*Ammiopsis aristidis* Coss. (Syn. *Daucus aristidis* Coss.)
et d'*Achillea santolinoides* Lag.**

Soutenue publiquement le : **08/02/2018**

DEVANT LE JURY

President	Ramdani Messaoud	Pr. Université Ferhat Abbas. Sétif 1
Directeur	Laouer Hocine	Pr. Université Ferhat Abbas. Sétif 1
Co-directeur	Amira Smain	Pr. Université Ferhat Abbas. Sétif 1
Examineurs	Akkal Salah	Pr. Université Mentouri. Constantine
	Benahmed Merzoug	MCA Université Larbi Tébessi. Tebessa
	Dahia Mostefa	MCA Université Ziane Achour. Djelfa

Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles

الملخص

تظهر النباتات الطبية قدرات متزايدة الأهمية فيما يتعلق بنشاطيتها البيولوجية الشبه خالية أو الخالية تماما من الآثار الجانبية. لهذا الغرض، تمت دراسة نوعين نباتيين: *Ammiopsis aristidis* (*Daucus aristidis*) (العائلة الكرفسية) من غوفي (باتنة) وواد العرعار (بوسعادة, المسيلة) و *Achillea santolinoides* (العائلة النجمية) من الجلفة. تم الحصول على الزيوت الأساسية للأجزاء المختلفة من كل نبتة عن طريق التقطير المائي باستخدام جهاز الاستخلاص من نوع Clevenger. ثم تم إجراء التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بتقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة. وقد تم تقدير النشاطية ضد ميكروبية للزيوت الأساسية نوعيا على 6 سلالات ميكروبية بواسطة تقنية الانتشار على الوسط الصلب ثم كميًا عن طريق تحديد التركيز الأدنى المثبط. بموازاة ذلك، تم اختبار النشاطية المضادة للأوكسدة للزيوت الأساسية بواسطة تقنية DPPH واختبار تبييض حمض β كاروتين / حمض اللينوليك. كما تم كذلك تقييم النشاط المثبط لأستيل كولين استراز و بوتيريل كولين استراز للزيوت الأساسية بواسطة طريقة Ellman. واستخدمت الحشرة *Tribolium confusum* لاختبار التأثير المبيد للحشرات للزيوت الأساسية. وقد تم أيضا دراسة قدرة الزيوت الأساسية على حماية البروتينات من التمسخ. كشف التحليل الكيميائي للأجزاء المختلفة من *Ammiopsis aristidis* من غوفي والجزء الهوائي ل *Ammiopsis aristidis* من بوسعادة وجود α -pinene (بين 43.5% و 74.1%) و β pinene (بين 7.5% و 19.2%) كمكونات أساسية، على التوالي. تحتوي الزيوت في الأجزاء المختلفة من *Achillea santolinoides* أساسا على camphre (بين 60.8% و 62%) و 1.8 Cineole (بين 14.1% و 15.7%). وأظهر الاختبار المضاد للميكروبات نشاطا امتد بين المقاومة والحساسية لجميع السلالات المختبرة. القيم الواعدة للتركيز الدنيا المثبطة هي تلك المسجلة من زيت اوراق *A. aristidis* والجزء الهوائي من *A. santolinoides* (4.64 ملغ / مل و 3.12 ملغ / مل) ضد *S. aureus* على التوالي. زيت الأزهار ل *A. aristidis* اظهر أكبر نشاط مضاد للأوكسدة باستخدام فحص إزاحة الجذور الحرة DPPH بنسبة تثبيط $1.40 \pm 75.75\%$ ولكن نسبة تثبيط زيوت *A. santolinoides* كانت منخفضة نسبيا. وقد أظهرت هذه الزيوت أيضا تأثير مثبط لأوكسدة الدهون وقدرة على حماية البروتينات من التمسخ مرتبطين بالجرعة. الزيوت الأساسية ل *A. aristidis* من غوفي وبوسعادة لها نشاط تثبيطي معتدل لانزيمي AChE وBChE، بينما كان هذا النشاط منخفضا لزيوت *A. santolinoides* مقارنة ب *Ghalanthamine*. ووجد أن زيوت *Ammiopsis* و *Achillea* سامة لحشرة *Tribolium confusum* و قدرت الجرعة القاتلة (DL_{50}) ب (0.13 ميكرو لتر / سم² و 0.10 ميكرو لتر / سم² على التوالي).

الكلمات المفتاحية: العائلة الكرفسية - العائلة النجمية - الزيوت الأساسية - النشاط المضاد للميكروبات - النشاط

المضاد للأوكسدة - مضاد الكولين استراز- مبيد الحشرات.

Résumé

Les plantes médicinales montrent de plus en plus des effets significatifs concernant leurs pouvoirs biologiques totalement ou presque exemptes d'effets secondaires. Pour cet objectif, deux espèces ont fait l'objet de cette étude : *Ammiopsis aristidis* (syn : *Daucus aristidis*) (Apiaceae) provenant de Ghoufi (Batna) et Oued Arrar (Boussâada, M'sila) et *Achillea santolinoides* (Asteraceae) provenant de Djelfa. Les HE ont été obtenues par hydrodistillation en utilisant un appareil d'extraction de type Clevenger. L'analyse des HE a été faite par CPG/FID et CPG/SM. L'activité antimicrobienne des HE a été estimée qualitativement sur 6 souches microbiennes par la technique de diffusion sur gélose puis quantitativement en déterminant la CMI. En parallèle, l'effet antioxydant des HE a été testé par la technique du DPPH et par le test du blanchiment du β -carotène/acide linoléique. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et du butyrylcholinestérase des HE a été évaluée par la méthode d'Ellman. L'insecte *Tribolium confusum* a été utilisé pour tester l'effet insecticide de ces huiles. Ces dernières ont été également étudiées pour leurs pouvoirs dénaturants des protéines. L'analyse chimique des huiles des différentes parties d'*A. aristidis* de Ghoufi et la partie aérienne de Boussâada a révélé la présence de l' α -pinène (entre 43.5% et 74.1%) et β -pinène (entre 7.5% et 19.2%) comme composants majoritaires. Les huiles des différentes parties d'*A. santolinoides* contiennent principalement le camphre (entre 60.8% et 62%) et le 1,8 cinéole (entre 14.1% et 15.7%). Le test antimicrobien a montré une activité allant de la résistance à la sensibilité sur l'ensemble des souches testées. Les valeurs des CMI les plus prometteuses sont celles des huiles des feuilles d'*A. aristidis* et de la partie aérienne d'*A. santolinoides* avec des valeurs CMI de 4.64 mg/ml et de 3.12 mg/ml contre *S. aureus* respectivement. L'huile des fleurs d'*A. aristidis* présente l'activité antiradicalaire la plus importante en utilisant le test de piégeage du radical libre DPPH avec un pourcentage d'inhibition de $75.75 \pm 1.40\%$; cependant, l'activité des huiles d'*A. santolinoides* est relativement faible par rapport à celle du BHT. Ces huiles ont également montré une activité dose-dépendante de l'inhibition de la peroxydation lipidique et de la dénaturation des protéines. Les huiles d'*A. aristidis* de Ghoufi et de Boussâada ont une activité inhibitrice de l'AChE et du BChE modérée cependant les huiles d'*A. santolinoides* ont une activité anticholinestérase faible par rapport à celle de la Galanthamine. Les huiles d'*Ammiopsis* et d'*Achillea* se sont révélées toxiques à l'égard de l'insecte *Tribolium confusum* (DL_{50} : $0.13 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ et $0.10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ respectivement).

Mots clés: Apiaceae - Asteraceae - huiles essentielles - activité antimicrobienne - antioxydante, anticholinestérase - insecticide.

Abstract

Medicinal plants show increasingly significant capacities regarding their biological powers totally or almost free of side effects. For this purpose, two species were studied: *Ammiopsis aristidis* (syn: *Daucus aristidis*) (Apiaceae) from Ghoufi (Batna) and Oued Arrar (Boussâada, M'sila) and *Achillea santolinoides* (Asteraceae) from Djelfa. EOs of each plant was obtained by steam distillation of their different parts using a Clevenger type extraction apparatus. The Analysis of the EOs was carried out by gas chromatography coupled with mass spectrometry GC/FID and GC/MS. The antimicrobial activity of the EOs was estimated qualitatively on 6 microbial strains by the agar diffusion method and then quantitatively by determining the MIC. In parallel, the antioxidant effect of the EOs was tested by the DPPH method and the bleaching of β -carotene / linoleic acid assay. The inhibitory activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of the EOs was evaluated by the Ellman method. The insect *Tribolium confusum* was used to test the insecticidal effect of the EOs. These latter have also been the subject of the study of their denaturing power of proteins. Chemical analysis of the different parts of *A. aristidis* from Ghoufi and the aerial part from Boussâada revealed the presence of α -pinene (between 43.5% and 74.1%) and β -pinene (between 7.5% and 19.2%) as major compounds. The oils of the different parts of *A. santolinoides* contain mainly camphor (between 60.8% and 62%) and 1.8 Cineole (between 14.1% and 15.7%). The antimicrobial test showed an activity ranging from resistance to susceptibility on all strains tested. The most promising MIC values are those of leaves oil of *A. aristidis* and the aerial part of *A. santolinoides* with MIC values of 4.64 mg / ml and 3.12 mg / ml against *S. aureus* respectively. The flowers oil of *A. aristidis* exhibits the highest antiradical activity by DPPH free radical scavenging assay with an inhibition percentage of $75.75 \pm 1.40\%$ however the activity of *A. santolinoides* oils is relatively low compared to that of BHT. These oils have also shown a dose-dependent activity of the lipid peroxidation and protein denaturation inhibition. The oils of *A. aristidis* from Ghoufi and Boussâada have a moderate AChE and BChE inhibitory activity, but the oils of *A. santolinoides* have a low anticholinesterase activity compared to that of the Galanthamine. *Ammiopsis* and *Achillea* oils were found to be toxic to the *Tribolium confusum* insect (LD₅₀: 0.13 μ l / cm² and 0.10 μ l / cm² respectively).

Keywords: Apiaceae – Asteraceae - essential oils - antimicrobial activity - antioxidant activity- anticholinesterase- insecticide.

Sommaire

Remerciements.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des figures.....	III
Liste des abréviations.....	VI
Introduction.....	01

Partie Bibliographique

Chapitre I

Etude des plantes médicinales

I-1-La famille des Apiacées.....	4
I-1-1- <i>Ammiopsis aristidis</i> (Coss.) (Synonyme: <i>Daucus aristidis</i> Coss.).....	8
I-2-La famille des Asteracées.....	9
I.2.1. <i>Achillea santolinoides</i> (Lag.).....	11

Chapitre II

Etude des Huiles Essentielles

II-1-Définition	13
II-2-Répartition, localisation et fonction.....	13
II-3-Propriétés physiques des huiles essentielles.....	14
II-4-Composition chimique.....	15
II-4-a- Les composés terpéniques.....	15
II-4-b- Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane.....	16

II-5-Facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	18
II-6-Toxicité des huiles essentielles.....	18
II-7-Les procédés d'extraction des huiles essentielles.....	19
II-8-Les méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	23
II-9-Activités biologiques des huiles essentielles.....	25
II-9-a- Activité antimicrobienne.....	25
II-9-b- Activité antioxydante.....	26
II-9-c-Activité anticholinestérase.....	28
II-9-d- Activité insecticide.....	30
II-9-e- Activité anti-inflammatoire.....	31

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériels et méthodes

III-1-Matériel.....	32
III-1-1-Matériel végétal.....	32
III-1-2- Matériels des tests biologiques.....	33
III-1-2-a-Souches microbiennes.....	33
III-1-2-b- Les milieux de culture.....	33
III-1-2-c- Les antibiotiques.....	33
III-1-2-d- Les produits chimiques.....	33
III-2-Méthodes expérimentales	33
III-2-1-Extraction des huiles essentielles.....	33

III-2-2-Analyse des huiles essentielles.....	35
III-2-3-Etude de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des huiles essentielles.....	35
III-2-3-1-Technique par contact direct.....	35
III-2-3-1-a-Méthode de diffusion.....	36
III-2-3-1-b- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	37
III-2-4-Test de l'activité antioxydante.....	38
III-2-4-1- Le test de piégeage du radical libre DPPH.....	38
III.2.4.2. Le test de blanchiment du β -carotène/acide linoléique.....	40
III.2.5. Activité anticholinestérase.....	41
III.2.6. Activité insecticide.....	42
III.2.6.1. Matériel animal.....	42
III.2.6.1.a. Récolte et élevage de l'insecte.....	43
III.2.6.2. Le test de toxicité par contact des huiles essentielles sur papier filtre.....	43
III.2.7. Activité anti-inflammatoire <i>in-vitro</i>	44
III.2.8. Analyses statistiques.....	44

Chapitre IV

Résultats et Discussion

IV-1-Extraction des huiles essentielles.....	45
IV-2-Analyse chimique des huiles essentielles.....	47
VI-3-Activité antimicrobienne	61
VI-4-Activité antioxydante.....	73
VI-5-Activité anticholinestérase.....	81
VI-6-Activité insecticide.....	84
VI-7-Activité anti-inflammatoire.....	86
Conclusion	89

Références bibliographiques	92
--	----

Annexes

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide de **ALLAH** qui m'a donné la force afin de l'accomplir.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles (LVRBN) et le laboratoire de phytothérapie appliquée aux maladies chroniques (LPAMC) de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Sétif 1.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mon promoteur, le professeur Hocine LAOUER, qui a su, à sa façon, me conseiller et m'orienter tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement les membres de ce jury:

- Monsieur le professeur M. RAMDANI, Professeur à l'université de Sétif 1
Je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.
- Monsieur le professeur S. AMIRA le Co-encadreur de cette thèse de l'université de Sétif 1, je le remercie pour sa disponibilité, sa patience et son encouragement.
- Monsieur le docteur M. BENAHMED de l'université de Tébessa, votre venue en tant qu'examineur m'honore, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements.
- Monsieur le professeur S. AKKAL, de l'université de Constantine Merci pour avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire, pour l'intérêt que vous portez à mon travail et pour le temps consacré afin de l'évaluer.
- Monsieur le docteur M. DAHIA, de l'université de Djelfa d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent au Pr. N. BOULAACHEB pour son aide à l'identification des plantes et au Pr. M. BOUNECHADA pour l'identification de l'insecte.

Je remercie également Madame I.E. ORHAN et Madame F.S. SENOL de l'université Gazi (Turquie) et B. DEMIRCI de l'université d'Anadolu (Turquie) pour leurs contributions et leurs aides concernant la réalisation des analyses chimiques des huiles essentielles et l'activité anticholinestérase.

Docteur F. AMIRA et Docteur H. BENABDALLAH de l'université de Sétif 1 ainsi que docteur A. ADJAOUD de l'université de Bejaia, permettez moi de vous remercier pour votre soutien, votre disponibilité ainsi que pour votre aide technique si précieux.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

Liste des tableaux

Tableau 1: Genres d'Apiaceae rencontrés en Algérie	5
Tableau 2: Composition chimique des huiles des différentes parties de <i>D. aristidis</i> de Ghoufi	49
Tableau 3 Composition chimique de l'huile de la partie aérienne de <i>D. aristidis</i> de Boussaàda.....	53
Tableau 4 : Composition chimique des huiles des différentes parties d' <i>A. santolinoides</i>	58
Tableau 5 : La sensibilité des micro-organismes à l'encontre de <i>D. aristidis</i>	62
Tableau 6 : Activité antibactérienne des antibiotiques standards. exprimée par.....	63
le diamètre d'inhibition en millimètre	
Tableau 7 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>D.aristidis</i> par.....	67
la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI).	
Tableau 8 : Diamètres d'inhibition des huiles d' <i>A. santolinoides</i> à l'encontre	69
des microorganismes testés.	
Tableau 9 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles d' <i>A. santolinoides</i> par	72
la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	
Tableau 10 : Les pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles de <i>D. aristidis</i>	74
et d' <i>A. santolinoides</i>	
Tableau 11 Pourcentages d'inhibition du β -carotène par les huiles	79
de <i>D. aristidis</i> et d' <i>A. santolinoides</i>	
Tableau 12 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et BChE	81
par les huiles de <i>D. aristidis</i> de Ghoufi et Boussaàda.	
Tableau 13 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et BChE.....	83
par les huiles d' <i>A. santolinoides</i>	
Tableau 14 : Les pourcentages de mortalité de <i>Tribolium confusum</i>	85
par les huiles de <i>D. aristidis</i> et d' <i>A. santolinoides</i> .	
Tableau 15 : Les pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique.....	86
des huiles de <i>D. aristidis</i> et d' <i>A. santolinoides</i> .	

Liste des figures

Figure 1: Répartition géographique mondiale des Apiaceae	4
Figure 2: Echantillon d' <i>Ammiopsis aristidis</i>	8
Figure 3: <i>Achillea santolinoides</i>	11
Figure 4: Structure chimique de quelques composés des HEs	17
Figure 5: Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile	20
Figure 6: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction sous micro-ondes.....	21
Figure 7: Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinesterase.....	29
Figure 8: Images satellites montrent les 3 localités des plantes recueillies	32
Figure 9: Appareil de distillation type Clevenger	34
Figure 10: Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne	37
Figure 11: Forme libre et réduite du DPPH	39
Figure 12: Les mécanismes chimiques de la méthode d'Ellman	41
Figure 13: Un adulte de <i>Tribolium confusum</i> (Duval).....	43
Figure 14: Rendement en huile essentielle des différentes parties de <i>D. aristidis</i>	45
Figure 15: Rendement en huile essentielle des différentes parties d' <i>A. santolinoides</i>	46
Figure 16: Pourcentage des différentes classes chimiques des huiles de <i>D. aristidis</i>	48
Figure 17: Structure des composants majoritaires des huiles de <i>D. aristidis</i>	49
Figure 18: Pourcentage des composants majoritaires dans les huiles de <i>D. aristidis</i>	49
Figure 19: Pourcentage des différents composants de l'huile de la partie aérienne.....	51
de <i>D.aristidis</i> de Ghoufi	
Figure 20: Pourcentage des différents composants de l'huile des tiges.....	52
de <i>D. aristidis</i> de Ghoufi	
Figure 21: Pourcentage des différents composants de l'huile des feuilles.....	52
de <i>D. aristidis</i> de Ghoufi.	
Figure 22 : Pourcentage des différents composants de l'huile des fleurs	53

de *D. aristidis* de Ghoufi.

Figure 23 : Pourcentage des différents composants de l'huile de la partie aérienne.....54

de *D. aristidis* de Boussaada.

Figure 24 : Pourcentage des différentes classes chimiques.....57

des huiles d'*A. santolinoides*

Figure 25 : Structure des composants majoritaires des huiles d'*A. santolinoides*.....57

Figure 26 : Pourcentage des composants majoritaires dans les huiles d'*A. santolinoides*.....58

Figure 27 : Pourcentage des différents composants de l'huile de59

la partie aérienne d'*A. santolinoides*.

Figure 28 : Pourcentage des différents composants de l'huile.....59

des feuilles d'*A. santolinoides*.

Figure 29 : Pourcentage des différents composants de l'huile.....60

des fleurs d'*A. santolinoides*.

Figure 30: La sensibilité des micro-organismes à l'encontre.....62

de *D. aristidis* à la dilution 1/2.

Figure 31 : CMI des huiles de *D. aristidis* vis-à-vis *S. aureus* et *E. coli*.....67

Figure 32 : Structure de la paroi bactérienne.....68

Figure 33:La sensibilité des micro-organismes à l'encontre.....70

d'*A. santolinoides* à la dilution 1/2.

Figure 34 : CMI des huiles d'*A. santolinoides* vis-à-vis *E. coli*, *S. aureus* et *B. cereus*.....72

Figure 35 : Les pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles de *D. aristidis*.....74

Figure 36 : Les pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles d'*A. santolinoides*.....75

Figure 37 : Courbe de l'activité antioxydante du BHT (référence).....75

Figure 38 : Courbe de l'activité antioxydante de la partie aérienne de *D. aristidis*.....75

Figure 39 : Courbe de l'activité antioxydante des tiges de *D. aristidis*.....76

Figure 40 : Courbe de l'activité antioxydante des feuilles de *D. aristidis*.....76

Figure 41 : Courbe de l'activité antioxydante des fleurs de *D. aristidis*.....76

Figure 42 : Courbe de l'activité antioxydante de la partie aérienne d'*A. santolinoides*.....77

Figure 43 : Courbe de l'activité antioxydante des feuilles d'*A. santolinoides*.....77

Figure 44 : Courbe de l'activité antioxydante des fleurs d'*A. santolinoides*.....77

Figure 45 : Les pourcentages d'inhibition du β -carotène par les huiles de *D. aristidis*.....80

Figure 46 : Les pourcentages d'inhibition du β -carotène par.....	80
les huiles d' <i>A. santolinoides</i>	
Figure 47 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et BChE.....	82
par les huiles de <i>D. aristidis</i> de Ghoufi et Boussaàda.	
Figure 48 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et BChE.....	84
par les huiles d' <i>A. santolinoides</i>	
Figure 49 : Les pourcentages de mortalité de <i>Tribolium confusum</i>	85
par les huiles de <i>D. aristidis</i> et d' <i>A. santolinoides</i> .	
Figure 50 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation	87
protéique des huiles de <i>D. aristidis</i>	
Figure 51 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation.....	87
protéique des huiles d' <i>A. santolinoides</i>	

Liste des abréviations

µl: microlitre

ADN: acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de NORmalisation

ATCC : American Type Collection Culture

BHT : Butylhydroxtoluene

CFU: Colony forming units

CLHP: chromatographie liquide à haute performance

CMI : concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthyl sulfoxide

DO : densité optique

DPPH : Diphénylpicrylhydrazine

GC/MS: Gas chromatography/ mass spectrometry

HEs: huiles essentielle

MH: milieu de Mueller Hinton

ml : millilitre

mM : milliMolaire

mm: millimètre

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standartrd

PI : pourcentage d'inhibition

RMN: résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactive oxygen spices

UV : Ultra-violet

ANOVA : Analyse of Variance

DL₅₀ : Dose qui tue 50% de la population

INRS –IAF institut national de la recherche scientifique : Institut Armand Frappier

INTRODUCTION

Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales ont des propriétés importantes, plusieurs médicaments pharmaceutiques ont été dérivés de plantes, ces derniers passent dans l'esprit de la population pour efficacité et tolérance du fait de son origine naturel faisant partie de la médecine douce (**Hami et al., 2011**) . Ces plantes naturelles ont joué un rôle très significatif dans la découverte des médicaments (**Newman et Cragg, 2007**). Il est reporté qu'au minimum 119 composés dérivés de 90 espèces de plantes peuvent être considérés comme des médicaments importants. La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde en développement et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande spécifique aux plantes aromatiques et médicinales et à leurs produits dérivés (**Benayad, 2013**).

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant l'efficacité et la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, le développement de la résistance des micro-organismes aux divers antibiotiques préoccupent les spécialistes en médecine. D'un autre côté, l'utilisation des additifs tels que les antioxydants est suspectée d'avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur.

D'autre part, l'un des principaux problèmes de santé publique est la maladie d'Alzheimer qui touche 24 millions de personnes à travers le monde (100 000 cas en Algérie) dont 20 % ont plus de 85 ans. Un nouveau cas est diagnostiqué toutes les sept secondes, et il est probable que cette fréquence augmente dans les années à venir à cause du vieillissement de la population. A l'heure actuelle, il n'existe pourtant aucun traitement curatif. Seules des stratégies destinées à atténuer les symptômes de la maladie sont proposées. L'une d'elles consiste à augmenter le taux d'acétylcholine dans le cerveau en inhibant l'acétylcholinestérase, enzyme responsable de la dégradation de ce neurotransmetteur. L'un des traitements les plus prometteurs à ce jour est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase issu d'un lycopode (*Huperzia serrata* Thunb.), l'huperzine A. Cependant, ce composé est un alcaloïde, tout comme la galanthamine et la Rivastigmine® ; or les alcaloïdes ne sont pas des molécules sans risque. Il y a donc un réel intérêt à identifier de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase à partir de plantes, présentant à la fois une forte activité, une toxicité moindre, ainsi qu'une demi-vie plus longue (**Benamar, 2008**).

Dans le secteur agricole, la consommation des céréales et des légumineuses alimentaires se fait toute l'année. Le stockage rend possible la disponibilité quasi permanente de ces denrées sur le marché et assure les semences pour les campagnes agricoles futures. Pendant le stockage les insectes s'attaquent aux graines, et si aucune protection n'est faite, après sept mois de stockage, la perte des denrées peut être totale (**Ngamo et Hance, 2007**).

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation des insecticides chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus pratiquée pour lutter contre les insectes ravageurs. Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces insecticides a provoqué une contamination de la chaîne alimentaire, et l'apparition d'insectes résistants (**Bounechada et Arab, 2011**). Toutes ces raisons militent en faveur de la recherche de méthodes alternatives en particulier, l'utilisation des extraits de plantes à propriétés insecticides et/ou insectifuges qui soient peu coûteuses et efficaces faciles à adopter pour les producteurs du tiers monde.

D'un autre côté, l'utilisation des anti-inflammatoires pour réduire les douleurs lors des inflammations, présentent des risques de toxicité gastro-intestinales et cardiovasculaires. Pour cette raison, il est nécessaire de découvrir d'autres anti-inflammatoires ayant moins d'effets secondaires pour être utilisés particulièrement dans le traitement des inflammations chroniques.

Donc, la recherche des nouveaux agents thérapeutiques se lance fort, et l'objectif reste toujours de découvrir des armes thérapeutiques efficaces. Les produits naturels donc donnent une grande chance pour découvrir une médication effective contre les maladies qui n'ont pas été traitées, par l'effet thérapeutique directe, après une modification semi-synthétique ou bien par une nouvelle synthèse d'un modèle moléculaire à partir des produits naturels (**Cragg et al., 1997**).

Les plantes aromatiques sources de ces produits sont largement répandues dans la nature. L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier certaines plantes, poussant à l'état spontané à la région de Ghoufi (Batna), d'Oued Arrar (Boussâada, M'sila) et de Djelfa.

Ce travail a pour objet l'extraction et l'analyse chimique puis l'étude des activités biologiques des huiles essentielles de deux espèces appartenant à deux familles botaniques différentes; la famille des Apiacées représentée par l'espèce *Ammiopsis aristidis* (synonyme: *Daucus aristidis*) et la famille des Asteracées représentée par l'espèce *Achillea santolinoides*

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties. La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'étude des plantes médicinales. Le second chapitre traite la valorisation des ressources végétales par une meilleure connaissance de la composition chimique et des activités biologiques des huiles essentielles. Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, puis l'extraction des huiles essentielles et enfin, l'étude de ses activités biologiques. Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, la liste des références bibliographiques et les annexes.

Chapitre I
Etude des plantes
médicinales

I.1. La famille des Apiacées

Les Apiaceae anciennement appelées Umbellifères, étaient déjà connues des anciennes civilisations chinoise et indienne du Mexique, ainsi que des Grecs et des Romains. Elles semblent être la première famille de plantes à fleurs reconnue en tant que telle par les botanistes vers la fin du XVI^e siècle. Ce fut aussi le premier groupe de plantes faisant l'objet d'une étude systématique publiée par Robert Morison en 1672 (**Heywood *et al.*, 1996**).

Il s'agit d'une famille très homogène, une des plus faciles à reconnaître, grâce à ses inflorescences en ombelles généralement composées, inversement les espèces sont parfois difficiles à distinguer les unes des autres. Les Apiacées renferme de nombreuses espèces économiquement importantes, certaines sont des plantes alimentaires (carotte, fenouil, céleri...), d'autres sont des condiments utilisés depuis longtemps en cuisine à cause des huiles essentielles produites par leurs canaux sécréteurs (persil, coriandre, carvi...). En phytothérapie, on leur attribue principalement des propriétés digestives (**Bruneton, 1999; Reynaud, 2002**).

a. Répartition

Cette famille comprend environ 300 – 455 genres et 3000 – 3750 espèces (**Tabanca *et al.*, 2006**) se répartissant dans toutes les régions tempérées, avec, toutefois, une prédilection pour l'hémisphère Nord (Figure 1). Les genres présentent une répartition entre les divers continents, avec une prédominance pour le continent asiatique.



Figure 1: Répartition géographique mondiale des Apiaceae (**Pimenov *et al.*, 1993**).

La famille des Apiacées occupe une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces (tableau 1) (Quezel et Santa, 1963).

Tableau 1 : Genres d'Apiacées rencontrés en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

N°	Genre	Nombre d'espèces	Nombre de sous espèces	Espèces endémiques
1	<i>Ammi</i>	2		
2	<i>Ammiopsis</i>	1		
3	<i>Ammodaucus</i>	1		
4	<i>Ammoides</i>	2		1 (<i>A. atlantica</i>)
5	<i>Anethum</i>	1		
6	<i>Anthriscus</i>	2		
7	<i>Apium</i>	1		
8	<i>Balansaea</i>	1		1 (<i>B. glaberrima</i>)
9	<i>Bifora</i>	1		
10	<i>Brachyapium</i>	2		
11	<i>Bunium</i>	7		4 (<i>B. fontanesii</i> , <i>B. chaberti</i> , <i>B. elatum</i> , <i>B. crassifolium</i>)
12	<i>Bupleurum</i>	14		5 (<i>B. plantagineum</i> , <i>B. atlanticum</i> , <i>B. montanum</i> , <i>B. balansae</i> , <i>B. oligactis</i>)
13	<i>Capnophyllum</i>	1		
14	<i>Carum</i>	2		2 (<i>C. montanum</i> , <i>C. foetidum</i>)
15	<i>Caucalis</i>	4		1 (<i>C. bifrons</i>)
16	<i>Chaerophyllum</i>	1		
17	<i>Conium</i>	1		
18	<i>Conopodium</i>	1		
19	<i>Coriandrum</i>	1		
20	<i>Crithmum</i>	1		
21	<i>Cuminum</i>	1		
22	<i>Danaa</i>	1		
23	<i>Daucus</i>	11	8	1 (<i>D. reboudii</i>)
24	<i>Echinophora</i>	1		
25	<i>Elaeoselinum</i>	2		
26	<i>Eryngium</i>	7		
27	<i>Ferula</i>	5		2 (<i>F. Cossoniana</i> , <i>F. vesceritensis</i>)
28	<i>Foeniculum</i>	1	3	
29	<i>Helosciadium</i>	3		
30	<i>Heracleum</i>	1	2	
31	<i>Hippomarathrum</i>	1	2	

32	<i>Hohenackeria</i>	2		
33	<i>Hydrocotyle</i>	1		
34	<i>Kundmannia</i>	1		
35	<i>Magydaris</i>	2		
36	<i>Malabaila</i>	1	1	
37	<i>Margotia</i>	1		
38	<i>Oenanthe</i>	6		1(<i>Oe. Virgata</i>)
39	<i>Orlaya</i>	3		
40	<i>Petroselinum</i>	1		
41	<i>Peucedanum</i>	3		1(<i>P. munbyi</i>)
42	<i>Physocaulos</i>	1		
43	<i>Pimpinella</i>	2		1(<i>P. battandieri</i>)
44	<i>Pituranthos</i>	4	5	4(<i>P. reboudii</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>P. battandieri</i> , <i>P. chloranthus</i>)
45	<i>Reutera</i>	1		
46	<i>Ridolfla</i>	1		
47	<i>Sanicula</i>	1		
48	<i>Scandix</i>	3	2	
49	<i>Seseli</i>	4		
50	<i>Sison</i>	1		
51	<i>Smyrniium</i>	2		
52	<i>Thapsia</i>	3		
53	<i>Tinguarra</i>	1		
54	<i>Tordylium</i>	1		
55	<i>Torilis</i>	2	3	
56	<i>Turgenia</i>	1		

Un simple regard du contenu de cette liste permet de constater la diversité générique algérienne de cette famille. Les genres *Bupleurum* et *Daucus* sont les plus riches au niveau spécifique avec respectivement 14 et 11 espèces, alors que la majorité est représentée par une ou deux espèces.

La position systématique de la famille selon la Classification de **Cronquist (1981)** est la suivante:

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae (L.).

b. Caractères généraux des Apiacées :

La famille des Apiacées est homogène sur le plan morpho-anatomique, Il s'agit de plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, parfois arbustives. Les feuilles sont alternes, composées, rarement simples. Souvent, les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige. La tige est souvent creuse par résorption de la moelle. Certaines ont une racine tuberculeuse (carottes) ou même un véritable tubercule, certaines possèdent un rhizome (angéliques), Les fleurs sont blanches ou, plus rarement, jaunâtres, verdâtres ou rosée, toujours de dimensions réduites sont réunies en ombelles simples ou composées, munies de bractées à la base appelées involucelles. , Elles comptent 5 pétales et 5 étamines et un ovaire à deux loges. Les fruits sont formés de 2 méricarpes accolés à un axe central, le carpophore, se séparant à maturité. Chaque méricarpe présente deux faces: commissurale (plane) et dorsale (convexe). La face dorsale porte au moins 5 côtes séparées par 4 vallécules contenant des canaux sécréteurs courts (bandelettes) (Coste et Flahault, 1998 ; Dupont et Guignard, 2012).

c. Caractéristiques chimiques et pharmacologiques des Apiacées

La famille des Apiacées est connue pour la grande diversité en métabolites secondaires et notamment pour ceux de leurs coumarines et huiles essentielles ces dernières sont secrétées dans des canaux schizogènes dans tous les organes leur conférant des odeurs et saveurs caractéristiques. Ces propriétés organoleptiques font que de nombreuses espèces sont largement utilisées comme légumes ou condiments. Les huiles essentielles des Apiacées sont riches en dérivés phénylpropaniques tels que l'anéthole (*Pimpinella anisum*), l'apiole (*Apium petroselinum*) et la foeniculine (*Foeniculum vulgare*) et en terpènes comme le β -caryophyllène, le limonène ou la carvone (Bruneton, 2009). Quelques molécules ont été identifiées la première fois dans des huiles essentielles d'Apiacées, ainsi leur dénomination en était dépendante tel que le carvone qui a été isolé au début dans l'huile essentielle de *Carum carvi* (Nemeth, 2006).

L'étude des Apiacées est très intéressante pour les types de produits chimiques qu'elles contiennent, qui doivent certainement trouver leurs applications dans la médecine populaire ou dans la médecine moderne. Certaines espèces ont été utilisées comme toniques, diurétiques, stimulants cardiovasculaires, etc. (Heywood, 1971 ; Rodriguez *et al.*, 1976 et Evans *et al.*, 1980). D'autres pour ses propriétés antibactériennes, hépato-protectrices, vaso-relaxantes et anti-tumorales (Oroojalian *et al.*, 2010).

on a aussi déterminé des propriétés anti-oxydantes, anti tumorales et anti-inflammatoires manifestées par les métabolites secondaires appartenant au différents membres de cette

famille tel que les graines d'*Ammi visnaga* qui ont déjà été utilisées en Egypte ancienne pour leur action de stimulation de la pigmentation de la peau (Evans *et al.*, 1980 et Valente *et al.*, 2015).

I.1.1. *Ammiopsis aristidis* (Coss.) (Synonyme: *Daucus aristidis* Coss.)

Appelée localement «Noukhia» (Figure 2), est une plante annuelle à tiges dressées élevées, lisses. Feuilles glabres, pennatiséquées à segments capillaires. Bractées de l'involucre et de l'involucelle nombreuses divisées, ombelles grandes à très nombreux rayons, contractées à la fin. Fleurs blanches jaunissant en herbier, ombellules à fleurs rayonnantes. Fruits petits 2-2.5 mm, ovoïdes, grisâtres, finement tuberculés sur toute leur surface (Quezel et Santa, 1963).



Figure 2: Echantillon d'*Ammiopsis aristidis* (photo prise par Pr. Laouer H., 2015)

Systématique (Euro+med, 2013) :

Règne : Plantae

Division : Tracheophyta

Subdivision : Spermatophytina

Classe : Magnoliopsida

Superordre : Asteranae

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Ammiopsis*

Espèce : *Ammiopsis aristidis* Coss.

I.2. La famille des Asteracés

Le nom Asteraceae vient du mot grec *Aster* qui signifie étoile en relation avec la forme de la fleur (Crete, 1965). Aussi appelée Compositae, est la plus vaste famille de plantes à fleurs, Il s'agit d'une famille cosmopolite. Elle est principalement distribuée en région tempérée, subtropicale, ou tropicale, souvent en région montagneuse (Cronquist, 2001 et Singh, 2004).

a. Répartition

La famille Asteraceae est l'une des familles les plus distribuées dans le règne végétal. Elle comprend plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces (Gausсен *et al.*, 1982 et Guignard, 1994). Si on considère le nombre total estimé d'espèces végétales dans le monde, d'environ 298 000 espèces (Mora *et al.*, 2011), la famille des Asteraceae regrouperait donc à elle seule entre 8% à 10% des espèces. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (Quezel et Santa, 1963).

Cette vaste famille est économiquement importante, vu que plusieurs de ses plantes sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille et le tournesol, cultivé pour ses graines oléagineuses qui représente le meilleur exemple de l'importance économique de cette famille) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, les chrysanthèmes, les gerberas, les zinnias etc.) (Singh, 2004).

La position systématique de la famille selon la classification de Cronquist (1981) est la suivante:

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae Bercht. et J.Presl (1820)

b. Caractères généraux des Asteracées

C'est une des familles la plus importante des angiospermes. Ce sont essentiellement des plantes herbacées, avec souvent des racines charnues: rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes (**Crete, 1965**). Cette famille présente des caractères morphologiques divers : herbes annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpantes et quelques fois, plantes charnues (**Bonnier, 1934**). En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques: le capitule. C'est-à-dire les fleurs serrées les uns à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collecte est appelé un involucre. La partie libre des pétales est représentée par un tube appelé corolle (**Ozenda, 1991**). Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée *Pappus* qui favorise la dispersion des grains par le vent (**Spichiger, 2002**).

c. Caractéristiques chimiques et thérapeutiques des Asteracées

La famille des Asteraceae fournit des espèces très importantes d'un point de vue thérapeutique, ce qui n'est pas surprenant étant donné le nombre de genres qu'elle contient. De nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle et sont associées à un panel d'activités thérapeutiques aussi large que la diversité de cette famille. En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de certaines plantes de cette famille, tels que le Semen-contra (*Artemisia cina* Berge), l'Arnica (*Arnica montana* L.), la Chamomille (*matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antenaria dioca* gartn) possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires. En outre d'autres astéracées possèdent des propriétés antitumorale, cytotoxique, immunosuppressive, antioxydante, antiacétylcholinestérase, antimicrobienne, leishmanicide, trypanocide, antipaludique, hépato protective, cytotoxique, larvicide, antiulcéreuse, anti nociceptive, antitussive, expectorante, antidiabétique et hémolytique. Cette liste est loin d'être exhaustive

(Abad *et al.*, 2012; Arora *et al.*, 2013 ; Hussain *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013 et Wang *et al.*, 2014). L'effet thérapeutique de ces plantes médicinales a été corrélé à la présence de métabolites secondaires, les flavonoïdes, les coumarines, les polyphénols, les terpènes tels que les lactones sesquiterpéniques, caractéristiques de cette famille. L'un des cas les plus connus certainement est celui de l'artémisinine, lactone sesquiterpénique aux propriétés antipaludiques, isolée de *Artemisia annua*, longtemps utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour cet usage (Graziose *et al.*, 2010).

I.2.1. *Achillea santolinoides* Lag.

Appelée localement Orairyia et chaihata (Trabut, 1935), c'est une plante de 30-60 cm très rameuse portant de feuilles à segments trilobés (figure.3) et des pédoncules grêles, les capitules sont globuleux en corymbe composé et lâche. Les ligules sont jaunâtres, pâles et crénelées (Battandier et Trabut, 1902 ; Quezel et Santa, 1963).



Figure 3 : *Achillea santolinoides* (photo prise par Pr. Laouer H., 2015)

- **systematique**

Systematique (**Euro+med, 2013**)

Regne : Plantae

Division : Tracheophyta

Subdivision : Spermatophytina

Classe : Magnoliopsida

Superordre : Asteranae

Ordre : Asterales

Famille : Compositae Gieske

Genre : *Achillea*

Espece : *Achillea santolinoides* Lag.

Chapitre II

Etude des huiles essentielles

II.1. Définition

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ième} siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel (**Burt, 2004**).

Les huiles essentielles (HEs) sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes (**Belaiche, 1979 ; Valnet, 1984 ; Wichtel et Anthon, 1999**). La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme: «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (**Garnero, 1996**).

II.2. Répartition, localisation et fonction:

Les HEs n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent, en particulier Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées, etc. (**Bruneton, 1999; Benayad, 2008; Degryse et al., 2008**).

Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux: les fleurs [oranger, rose, lavande; le bouton floral (girofle)], les feuilles (eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin), les racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore), les fruits (anis, fenouil, badiane), le bois et les écorces (cannelle, santal, bois de rose.) et les graines (noix de muscade, coriandre) (**Bruneton, 1993; Anton et Lobstein, 2005**).

Les HEs sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables : poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou poches sécrétrices schizolyziques (Aurantiacées), des canaux sécréteurs (Conifères et Apiacées), poils sécréteurs (Lamiacées et Astéracées), et cellules sécrétrices isolées (Lauracées, Magnoliacées et Pipéracées) (**Belaiche, 1979; Paris et Hurabielle, 1981; Bruneton, 1999; Ghestem et al., 2001**).

Ghestem et al. (2001) indiquent, que la teneur des plantes en huiles essentielles est faible, souvent inférieure à 1%. Il existe, cependant, des exceptions telles que le clou de girofle qui renferme plus de 15%.

Beaucoup de plantes produisent les HEs en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (**Rai et al., 2003**). Elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme (**Amiot, 2005**) ou des sous produits de l'activité métabolique d'une plante (**Banthrope et al., 1992 in Amiot, 2005**). Cependant, plusieurs effets apparent utiles ont été décrits telles que la réduction de la compétition des autres espèces de plantes (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines ainsi que la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par gout et effets défavorables sur le système nerveux (**Porter, 2001; Guignard et al., 2004**). Certains auteurs pensent que les huiles essentielles pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs et favoriseraient ainsi la pollinisation (**Bruneton, 1999 ; Abou Zeid, 2000 ; Guignard, 2000**).

Belaiche (1979) signale que l'utilité des HEs pour les plantes désertiques est liée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes. Les vapeurs aromatiques permettent de saturer l'air autour de la plante empêchant, le jour, la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive.

Les essences pourraient constituer des supports à une communication et ce d'autant mieux que leur variété structurale autorise le transfert de messages biologiques sélectifs (**Bruneton, 1999**), tandis que **Guignard et al. (1985)** considèrent l'huile comme une source énergétique : «mis en réserve pendant le jour, ils seraient dégradés durant la nuit en acétyl CoA ».

II.3. Propriétés physiques des huiles essentielles

Les HEs sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse et al., 2008**). Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de saffran, de girofle et de cannelle. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (**Bruneton, 1999; Rhayour, 2002; Desmares et al., 2008**).

Elles sont totalement solubles dans les huiles grasses, particulièrement solubles dans les alcools et les solvants organiques, leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C et dépend de leurs poids moléculaires par exemple les points d'ébullition du caryophyllène, du géraniol, du citral et de l' α -pinène sont 260°, 230°, 228° et 156°C respectivement (**Abou Zeid, 2000**), mais d'après **Valnet (1984)**, ce point varie de 160°C à 240°C. Les huiles

essentielles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps, leurs odeurs se modifient, leurs points d'ébullition augmentent et leurs solubilités diminuent. Elles absorbent le chlore, le brome et l'iode en dégageant de la chaleur (**Duraffourd et al., 1990**).

II.4. Composition chimique

Comme toute substance, les HEs se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir. Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (Figure 4) (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) d'une part (**Bruneton, 1999; Seguin, 2001; Rhayour, 2002; Bowles, 2003; Chami, 2005; Clarke, 2008; Baser et Buchbauer, 2010**) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Figure 4) beaucoup moins fréquents d'autre part. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

II.4.a. Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) reconnue par Wallach dès 1887 in **Lamarti et al. (1994)**. Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en 1953 par Ruzicka in **Lamarti et al. (1994)**. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments: cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires. Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (**Lamarti et al., 1994**). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (**Bruneton, 1999**) (Figure 4) et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (**Pibiri, 2006**).

*-Les monoterpènes

Les monoterpènes contiennent plus de 900 composés connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurelles: les monoterpènes linéaires (acyclique): (myrcène, ocimènes), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) : (α - et γ -terpinène, *p*-cymène) et ceux avec deux cycles (bicycliques) : (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène (**Allen et al., 1977**). Selon **Bruneton (1999)**, la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions: alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols.

*Les sesquiterpènes

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (**Belaiche, 1979**).

Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β -artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, *cis*-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (**Bruneton, 1999; Laouer, 2004**).

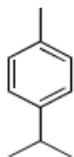
II.4.b. Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Les HEs renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (**Paris et Hurabielle, 1981**). **Bruneton (1999)** considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (Anis, Fenouil: anéthole, anisaldehyde, méthylchavicol=estragole. Persil : apiole) mais aussi de celles du Girofle (eugénol), de la Muscade (safrol, eugénol), de l'Estragon (eugénol), du Basilic (eugénol), de l'Acore (asarones) ou des Cannelles (cinnamaldéhyde eugénol safrol).

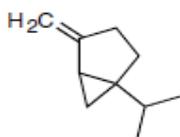
1. Terpenes

-Monoterpenes

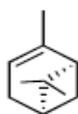
Carbure monocyclic
Cymene ("γ") or p.cymene



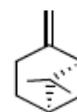
Sabinene



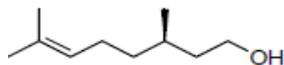
Carbure bicyclic
Alpha-pinene



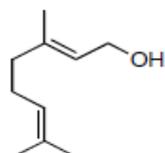
Betapinene



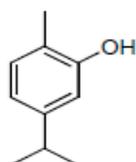
Alcohol acyclic
Citronellol



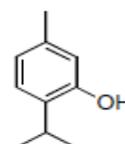
Geraniol



Phenol
Carvacrol

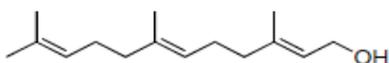


Thymol

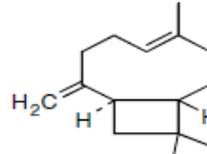


-Sesquiterpenes

Carbure
Farnesol

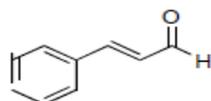


Alcohol
Caryophyllene

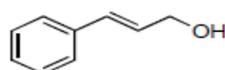


2. Aromatic compounds

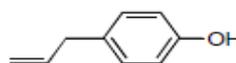
Aldehyde
Cinnamaldehyde



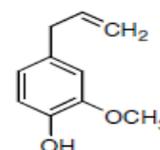
Alcohol
Cinnamyl alcohol



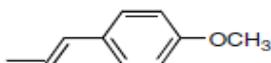
Phenol
Chavicol



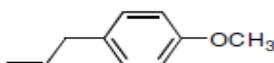
Phenol
Eugenol



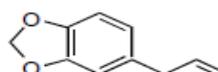
Methoxy derivative
Anethole



Methoxy derivative
Estragole

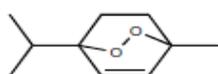


Methylene dioxy compound
Safrole



3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

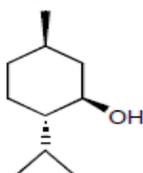


Figure 4: Structure chimique de quelques composés des HEs (Bakkali *et al.*, 2008).

II.5. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

Les HEs présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des HEs peuvent être très différentes (**Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Benini, 2007**).

Selon **Teuscher et al. (2005)**, La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement :

- Dans une même plante selon les organes (feuille, fleur, fruit, bois).
- Dans l'année selon la saison pour une même plante.
- Selon les conditions de culture pour une même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité du sol).
- Selon les races chimiques (ou chemotypes) pour une même espèce (l'exemple classique est le thym avec 7 races chimiques).

De même, **El Kalamouni (2010)** confirme que les étapes successives conduisant à l'isolement d'une essence et les diverses transformations susceptibles de l'accompagner se traduisent par la modification de la teneur en certains constituants ou par la formation de nouveaux composés, d'où une grande variabilité de sa composition. De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle. D'autres facteurs tels que les traitements survenus avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle.

II.6. Toxicité des huiles essentielles

Les HEs sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. En règle générale, les HEs ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible: la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL_{50}) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL_{50} comprise entre 1 et 2 g/kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg) (**Bruneton, 1999**).

II.7. Les procédés d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des HEs intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (**Garnero, 1991**). Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

II.7.a. La distillation

Bruneton (1999) signale que le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les HEs d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation.

Il existe deux méthodes de base de distillation pour l'obtention des HEs qui reposent sur le même principe: entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau. La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal (**Anes et al., 1968 in Benjilali, 2004**).

- **L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle (**AFNOR, 1992**). Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'huile essentielle sera alors séparée par différence de densité (Figure 5) (**Bruneton, 1993**). Les inconvénients de cette méthode sont: la calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle (**Abou Zeid, 2000**), la non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation (**Chalchat et al., 1997**).

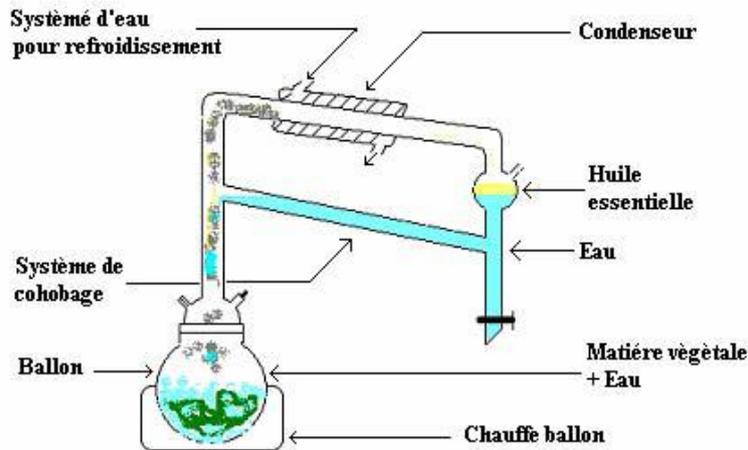


Figure 5: Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Hernandez Ochoa, 2005)

- **Entraînement à la vapeur d'eau**

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le principe de la distillation à la vapeur d'eau consiste à faire passer la vapeur d'eau à travers la plante à une température adéquate pour détruire les cellules végétales, libérer les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentín de refroidissement. Là, les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide formant un mélange «eau + huile essentielle». Recueillies dans un essencier, l'huile essentielle et l'eau florale se séparent par simple différence de densité. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Neffati, 2010).

- **Hydrodiffusion**

Distillation à la vapeur directe : c'est une variante de l'entraînement à la vapeur qui consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0.02-0.15 bar) à travers la masse végétale du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur, la composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie ; ce procédé est appelé distillation par hydrodiffusion (Anes *et al.*, 1968 in Benjilali, 2004; Bruneton, 1999).

II.7.b. L'extraction par les solvants volatils

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à «l'absolue» (Belaiche, 1979 ; Duraffourd *et al.*, 1990).

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement (Lagunez Rivera, 2006).

II-7-c- L'extraction par micro-ondes

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (Paré, 1997). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (France Ida, 1996). Ce procédé (Figure 6), très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (Bruneton, 1999).

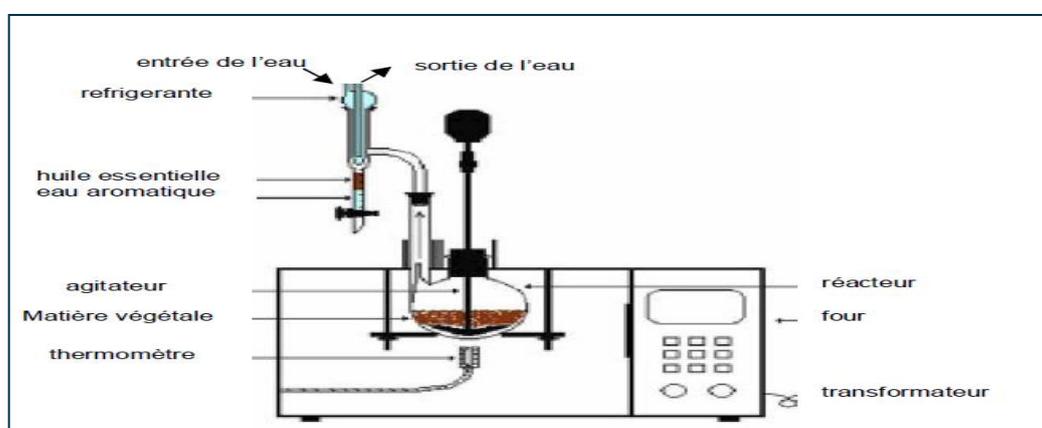


Figure 6: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction sous micro-ondes (Lagunez-Rivera, 2006)

II.7.d. Extraction par ultrasons

Les micro-cavitations, générées par ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines cellulosiques. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation, des constituants des HEs. L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction de molécules thermosensibles (**Lagunez-Rivera, 2006**).

II.7.e. L'extraction au CO₂ supercritique

Le terme supercritique signifie que le CO₂, sous pression et à une température de 31°C, se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux. Lorsqu'il est dans cet état, le CO₂ est capable de dissoudre de nombreux composés organiques et c'est cette même propriété dont les fabricants se servent pour extraire les HEs. La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO₂ supercritique (sous pression et réfrigéré). Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO₂ s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle (**Grosso et al., 2008 et Safaralie et al., 2008**). L'intérêt s'est porté tout particulièrement sur le dioxyde de carbone CO₂ car, celui-ci présente d'incontestables atouts: produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible et peu coûteux (**Bruneton, 1999 ; Wichtel et Anton, 1999**).

II.7.f. L'expression à froid

Cette technique est utilisée pour extraire les HEs des agrumes de la famille des Rutacées (citron, orange, mandarine, etc.). C'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement (abrasion, compression, incision, perforation, ...) les poches à essence (souvent au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation (**Chaintreau et al., 2003**).

II.7.g. L'extraction par enfleurage

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre

recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des HEs des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminées et remplacées par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (**Belaiche, 1979 ; France Ida, 1996**). Pour certaines plantes, on procède à une immersion des fleurs dans de la graisse chauffée, c'est ce que l'on appelle enfleurage à chaud ou «digestion» (**Bruneton, 1999**). Cette méthode appelée également macération à chaud par d'autres auteurs est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs arômes très rapidement après la cueillette, comme les violettes et certains lys (**France-Ida, 1996**). Cette technique laborieuse, qui demande une grande habileté, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite (**Abou Zeid, 1988**).

En conclusion, et selon **Collin (2000)**, il n'existe pas de procédé meilleur que d'autres. Chaque végétal, chaque partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commandent la technologie à employer. Bien entendu, les aspects de rentabilité économique sont tout aussi importants.

II.8. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles

L'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile (**France-Ida, 1998**).

- **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la méthode de référence dans l'analyse des HEs (**Lehotay et Hajslova, 2002**). Elle s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine...), on parle de chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption (**Audigie et al., 1995**).

- **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)**

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine, car les paramètres déduits de la rétention sélective des solutés au travers de la colonne sont souvent lourds à manier et, dans la plupart des cas, peu reliés aux édifices moléculaires organiques. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (**De Maack et Sablier, 1994**).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (**Desjobert *et al.*, 1997; Bruneton, 1999**).

- **La chromatographie liquide à haute performance**

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine. Les particules solides ont un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 5 µm. Le garnissage est tassé dans une colonne fermée. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (**Audigie *et al.*, 1995 in Bencheikh, 2005**). Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse (**Bruneton, 1999**).

- **La Résonance Magnétique Nucléaire RMN**

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par RMN est très efficace pour les molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé (**Platzer, 2002**).

II.9. Activités biologiques des huiles essentielles

Le rôle physiologique des HEs pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés connus et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes, antioxydantes antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, et antiparasitaires des HEs, plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (**Valnet, 2005**).

II.9.a. activité antimicrobienne

Les HEs sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (**Gachkar et al., 2007; Rasooli et al., 2008**). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (**May et al., 2000; Tohidpour et al., 2010**) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (**Fisher et Phillips, 2009**). Les HEs, isolées de deux espèces de thym de

Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* et *S. aureus* (Shin et Kim, 2005). Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003). A cause du mode d'action des HEs qui dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs : (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et de leurs effets synergiques (Zhiri, 2006). En particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (Cox et al., 2000; Carson et al., 2002).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les HEs peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides (Cox et al., 1991).

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les HEs ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (Lis-Balchin, 2002). Les HEs les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc. De même, Le carvacrol, le p-cymène et le -terpinène de l'huile essentielle d'*Origanum acutidens*, ont des effets fongicides contre *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Monilinia fructicola* et *Rhizoctonia solani* (Kordali et al., 2008). La croissance et la production de l'aflatoxine d'*A. flavus* est empêchée par des HEs d'origine végétales. L'huile de citronnelle est l'une des huiles les plus efficaces contre les champignons filamenteux. L'agent principal pathogène de l'homme *Candida albicans*, est inhibé par les terpènes (Raut et Karuppayil, 2014). Ces activités peuvent être dues à l'inhibition de l'ergostérol de la membrane et des voies de signalisation impliquées dans les levures. Par exemple, la perméabilité de la membrane et l'activité de la chaîne respiratoire dans les cellules de *C. albicans* sont empêchées en présence de l'huile essentielle du thé ce qui entraîne la mort cellulaire (Raut et Karuppayil, 2014).

II.9.b. Activité antioxydante

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats Ce sont des éléments protecteurs qui agissent

comme capteurs de radicaux libres. Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme (**Shahidi, 1997**), ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaire à des mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**), mais, ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (**Pourrut, 2008**), des acides nucléiques (**Favier, 2003**) en entraînant un stress oxydant qui contribue aux processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement de pathologies telles que l'alzheimer (**Butterfield et Lauderback, 2002**), l'artériosclérose et le cancer (**Gardner, 1997**). En raison des effets secondaires indésirables des antioxydants synthétiques tels que la toxicité et la cancérogénicité l'intérêt a considérablement augmenté pour trouver des antioxydants d'origine naturelle appropriés pour une utilisation dans les denrées alimentaires et/ou en médecine (**Bamoniri et al., 2010**). Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques (**Hussain et al., 2008, 2010**). L'huile essentielle de *Carum nigrum* (cumin noir) et son oléorésine étaient capables de piéger les radicaux libres DPPH avec un effet de 41-71% et 50-80%, respectivement. Ceci peut être comparé avec l'efficacité du BHT. Cependant, cette activité ne pouvait être observée qu'en utilisant une concentration élevée de l'huile essentielle et son oléorésine (**Baser et Buchbauer, 2010**). Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants (**Edris, 2007**). Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes (**Braga et al., 2006**). L'activité antioxydante des HEs est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéol, le géraniol/nérol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène et γ -terpinène (**Edris, 2007**).

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF ont montré que l'incorporation des HEs directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (**Caillet et Lacroix, 2007**).

II.9.c. Activité anticholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans l'étiologie des maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer (MA) (**Wang *et al.*, 2007**). Cette maladie est décrite par le médecin allemand Alois Alzheimer en 1906 (**Berchtold et Cotman, 1998**). Elle est caractérisée par un déséquilibre neurodégénératif et irréversible qui détruit progressivement les cellules nerveuses du cerveau. Elle se manifeste par différents troubles des fonctions intellectuelles (mémoire des faits récents, orientation dans le temps et dans l'espace, langages, utilisation des objets...), dont la progression conduit à une perte progressive d'anatomie (**Belisle *et al.*, 1999; Brice, 2004**). Elle se manifeste, entre autres, par la détérioration des cellules nerveuses libérant une substance appelée Acétylcholine (ACh), dont le rôle est de transmettre les messages entre les cellules du cerveau. Le déficit en Acétylcholine chez les malades est aggravé par l'action d'une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE), qui décompose rapidement l'Acétylcholine, l'acétylcholinestérase est une protéine exprimée dans le système nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs, si au sein du système circulatoire, son rôle physiologique reste encore à élucider, sa fonction principale, au sein du système nerveux, est parfaitement caractérisée. L'AChE est une protéine exprimée au sein des synapses dites cholinergiques, qui utilisent le neurotransmetteur ACh. De telles synapses sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires, ainsi que dans les zones du cortex en charge des fonctions cognitives (mémoire, orientation, jugement, etc.). L'AChE hydrolyse à ces divers loci le neurotransmetteur ACh, terminant ainsi la transmission de l'influx nerveux et restaurant, de fait, l'excitabilité de ces synapses (**Colletier, 2006**).

Il existe une autre protéine dans le système nerveux central semblable à l'AChE qui est la Butyrylcholinestérase (BChE) identifiée au départ dans le foie, le rôle biologique de la BChE n'est pas encore bien élucidé, mais il a été suggéré qu'elle protège l'AChE contre les inhibiteurs (**Chatonnet et Lockridge, 1989; Soreq et Zakut, 1990**). Cependant, cette approche fonctionnelle de la BChE change, la BChE peut moduler la transmission cholinergique dans le muscle lisse et remplace l'AChE dans la jonction neuromusculaire (**Norel *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2000**). L'ACh est hydrolysée, dans le tissu cérébral, par l'AChE, mais aussi par la BChE, quoique dans une proportion bien plus faible. Bien que l'AChE se retrouve à des concentrations beaucoup plus élevées que la BChE, chez l'individu sain ou malade de la maladie d'Alzheimer (**Mesulam *et al.*, 2002**). Ainsi, même si l'AChE reste l'enzyme principalement responsable de la terminaison des influx nerveux cholinergiques, on observera, au cours du développement de la MA, une implication de plus en plus significative de la BChE dans la co-régulation des niveaux d'ACh cérébraux. De ce fait, il a été proposé,

récemment, de traiter cette affection par des molécules inhibant à la fois l'AChE et la BChE (Ballard, 2002; Giacobini *et al.*, 2002; Greig *et al.*, 2002) la BChE pourrait, donc, avoir des fonctions dans le système nerveux normal et pourrait aussi participer aux processus pathologiques dans les maladies neurodégénératives. Mais les mécanismes par lesquels elle participe dans ces maladies doivent être confirmés. Actuellement, il n'existe aucun traitement guérissant la maladie d'Alzheimer, ni même permettant d'arrêter son évolution, Il existe cependant des traitements permettant d'atténuer les troubles cognitifs, sans empêcher la progression de la maladie. La plupart agissent sur l'activité cholinergique (Pepin et Delwaide, 1999), et spécialement les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) l'une des solutions pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'effet de l'enzyme d'acétylcholinestérase (Figure 7).

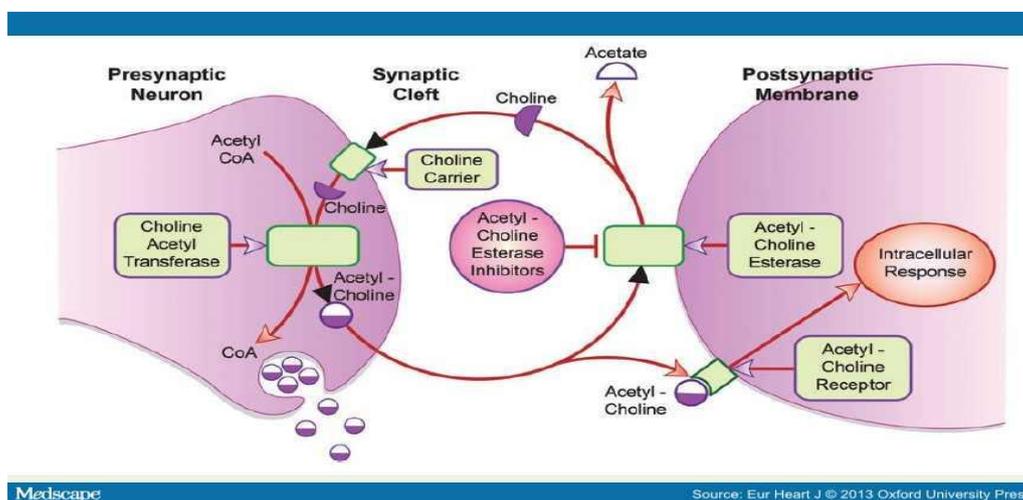


Figure 7 : Mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase

Ainsi, Le travail sur de nouveaux composés bioactifs à partir de plantes médicinales a mené à l'isolement et à l'élucidation de la structure d'un certain nombre de nouveaux pharmacophores excitants. *Galanthus nivalis* L. (*Amaryllidaceae*) a été employée traditionnellement en Bulgarie et en Turquie pour le traitement des désordres neurologiques. La galanthamine, un alcaloïde obtenu à partir de cette plante, est plus sélectif pour l'AChE que pour la BChE, et fournit une biodisponibilité orale complète. Il est autorisé en Europe pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, bien toléré et améliore de manière significative la fonction cognitive une fois administré à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lopez *et al.*, 2002). De nombreuses huiles essentielles et leurs constituants monoterpéniques ont été étudiés pour leurs effets sur l'AChE. Par exemple, les huiles essentielles de *Melissa*

officinalis L. et de *Rosmarinus officinalis* L. inhibent l'AChE érythrocytaire *in vitro* (**Howes et al., 2003 a, b**). Les monoterpènes inhibant l'AChE incluent le géraniol, le 3-carene, le α -caryophyllène et le limonène. Aussi **Aazza et al. (2011)** ont testé l'activité anticholinestérase de plusieurs huiles essentielles utilisées en alimentation et ils ont prouvé leur efficacité mais à des degrés différents.

II.9.d. Activité insecticide

Les denrées stockées peuvent être attaquées par les insectes, les champignons et les rongeurs. Les dégâts causés par les insectes sont les plus importants, ils peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et la quantité des produits stockés. D'après l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), les pertes dues aux insectes nuisibles correspondent à 35% de la production agricole mondiale (**Bounechada et Arab, 2011**). L'utilisation d'insecticides ou fumigènes de synthèse est l'une des méthodes de lutte efficace contre ces ravageurs (**Haubruge et al., 1988 ; Relinger et al., 1988**). Mais la présence dans les denrées de résidus et l'apparition de souches d'insectes résistants à ces insecticides deviennent de plus en plus préoccupants. Il importe donc de rechercher des méthodes alternatives de lutte et le règne végétal offre à cet effet beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler ou identifier des substances secondaires extraites de plantes qui ont une activité insecticide répulsive ou antiappétante vis-à-vis des insectes (**Lichtenstein, 1966**). De plus, des produits issus de plusieurs espèces florales ont des effets répulsifs, contre un certain nombre d'insectes Coléoptères qui attaquent les produits entreposés (**Hashem et al., 2012**). De même, les extraits de plantes sollicitent simultanément plusieurs mécanismes physiologiques (par opposition à des pesticides n'ayant qu'une seule cible moléculaire), ce qui peut retarder l'apparition de populations résistantes d'insectes. Ainsi, des populations du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulz.), traitées avec des extraits purifiés de neem ont développé 9 fois leur niveau initial de résistance en 40 générations, alors que des populations traitées avec des mélanges bruts n'avaient pas développé de résistance (**Feng et Isman, 1995**). Cependant, les mécanismes d'action des propriétés pesticides des HEs sont méconnus et relativement peu d'études ont été réalisées à ce sujet (**Isman, 2000**). On considère que ces mécanismes sont uniques et que les biopesticides à base d'huiles essentielles peuvent être des outils de choix dans les programmes de gestion de la résistance des ravageurs aux pesticides. Avec ces mécanismes d'action particuliers, ces biopesticides peuvent être utilisés seuls et à répétition sans potentiellement

inciter le développement de la résistance chez les ravageurs aux pesticides (**Chiasson et Beloin, 2007**).

II.9.e. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse pathophysiologique du tissu vivant à une blessure qui conduit à l'accumulation locale du fluide plasmatique et des cellules sanguines. Bien qu'il s'agisse d'un mécanisme de défense qui aide le corps à se protéger contre soi-même : infections, brûlures, produits chimiques toxiques, allergènes ou autres stimuli nocifs; Les événements complexes et les médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire peut induire, maintenir ou aggraver de nombreuses maladies (**Sosa et al., 2002**) chroniques telles que l'arthrite, l'arthrose, la maladie inflammatoire de l'intestin...etc.

Les médicaments actuellement utilisés sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens et les corticostéroïdes. Tous ces médicaments ont des effets toxiques potentiels tels que le saignement gastro-intestinal significativement associé à l'utilisation aiguë d'anti-inflammatoires non stéroïdiens comme la dose régulière d'aspirine, le diclofenac, le kétorolac, le naproxène ou le nimésulide (**Pilotto et al., 2003**).

Les plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter les cas d'inflammations semblent être une alternative fiable et logique à la recherche d'agents anti-inflammatoires sûr et efficace. Il est bien connu que la dénaturation des protéines tissulaires conduit à des maladies inflammatoires et des arthrites. Les produits naturels qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines seront donc utiles pour le développement de la thérapie anti-inflammatoire (**Alhakmani et al., 2010**).

Les HEs sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Maruyama et al., 2005**). Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (**Koh et al., 2002; Caldefie-Chézet et al., 2004; Caldefie-Chézet et al., 2006**) et de son composé principal, l' α -terpinéol (**Hart et al., 2000**). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple, l'huile essentielle de géranium (**Maruyama et al., 2005**) ainsi que le linalol et son acétate (**Peana et al., 2002**) ont montré une activité anti-inflammatoire sur des œdèmes de pattes de souris induit par le carraghénane. Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires (**Piochon, 2008**).

Chapitre III

Matériel et Méthodes

III.1. Matériel

Le nom scientifique qui a été retenu pour faire la discussion des résultats d'*Ammiopsis aristidis* est son synonyme : *Daucus aristidis*.

III.1.1. Matériel végétal

Les parties aériennes de *Daucus aristidis* (Syn : *Ammiopsis aristidis*) sont récoltées de Ghoufi (Batna) en mai 2014 et mai 2015 à une altitude de 708m et d'Oued el Arrar (Boussaâda, M'sila) en mai 2014 à une altitude de 854m pendant la période de floraison, cependant *Achillea santolinoides* est récoltée en mai 2015 à une altitude de 1140 m de Djelfa (Figure.8), le climat de ces trois regions est un climat de steppe où il y a peu de précipitation tout le long de l'année. Puis elles sont débarrassées des impuretés, ensuite séchées à l'ombre à une température ambiante. Enfin, elles sont coupées en parties très fines (2-5 mm).

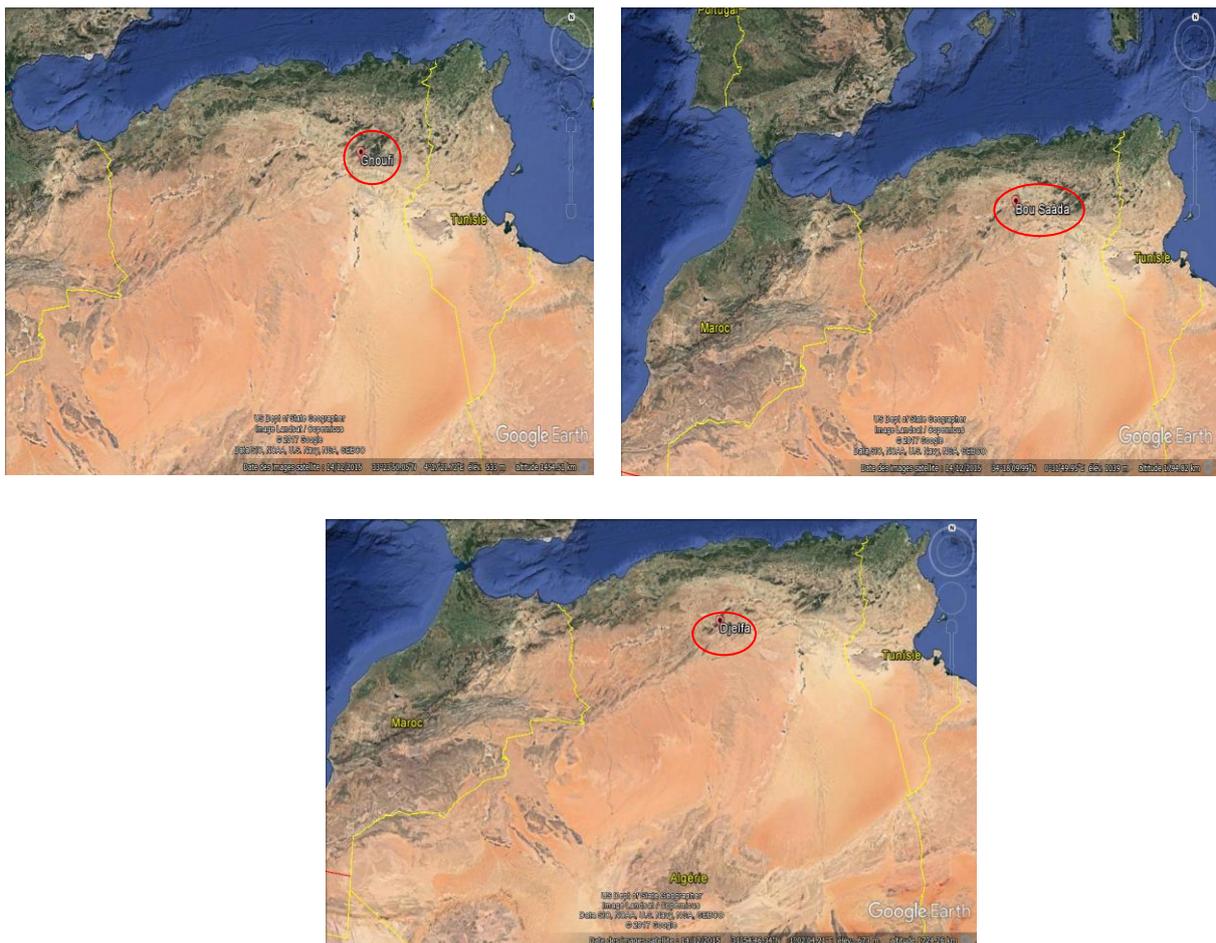


Figure 8 : Images satellites montrent les 3 localités des plantes recueillies (**google earth**)

III.1.2. Matériels des tests biologiques

III.1.2.a. Souches microbiennes

L'activité antimicrobienne des HEs de *Daucus aristidis* et d'*Achillea santolinoides* ont été évaluée sur plusieurs souches bactériennes qui appartiennent à l'American Type Culture Collection ATCC: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 10876, en ce qui concerne les champignons l'activité a été testé sur : *Aspegillus niger* 2CA936 et *Fusarium oxysporum* (isolé de graines de blé).

III.1.2.b. Les milieux de culture

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation du milieu de culture Mueller Hinton agar (MH) qui a pour provenance (Fluka) ainsi que le bouillon nutritif et la gélose nutritive qui proviennent de l'institut Pasteur d'Alger. Pour la culture des champignons, le milieu Sabouraud a été utilisé. La composition chimique de ces différents milieux de culture se trouve en annexe I.

III.1.2.c. Les antibiotiques

Le disque d'antibiotique utilisé comme témoin positif pour toutes les bactéries est la Gentamicine, ce dernier provient du fabricant Bio-Rad (France) avec 10µg de charge.

Quant aux champignons le disque d'antifongique utilisé est le Clotrimazole provenant du fabricant Bio-Rad (France) chargé de 50µg.

III.1.2.d. Les produits chimiques

Les produits chimiques et les solvants proviennent de Sigma-Aldrich et Fluka

III.2. Méthodes expérimentales

III.2.1. Extraction des huiles essentielles

Le matériel végétal est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger (Figure 9). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 100 g de masse végétale dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le

mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée et conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5°C). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.



Figure 9 : Appareil de distillation type Clevenger

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante sec à traiter (AFNOR, 1986). Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R = P_B / P_A \times 100$$

Ou R : rendement de l'huile essentielle en %

P_B : poids de l'huile en g

P_A : poids de la plante sec en g

III.2.2. Analyse des huiles essentielles

La séparation et l'identification des constituants des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) à colonne apolaire. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un gaz chromatographe Agilent (modèle 6890N) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un détecteur sélectif de masse Agilent 5975 GC-MSD systeme qui fonctionne en mode impact d'électron (EI) à 70 eV.

Le gaz chromatographe est équipé d'une colonne capillaire Innowax FSC (60 mètres de longueur par 0.25 mm de diamètre et d'une épaisseur de 0.25µm). Le gaz vecteur est l'hélium avec un flux de 0.8ml/min; la température du four est maintenue à 60 C° pendant 10min et programmée à 220C° à raison de 4C°/min pendant 10min puis maintenue fixé à 240C° à 1C°/min. La température de l'injecteur (mode split, ratio 40:1) est de 250C°. La température du détecteur à ionisation de flamme (FID) a été fixée à 300C.

Une auto-injection simultanée a été effectuée en duplicata dans la même colonne en appliquant les mêmes conditions opérationnelles. Les pourcentages des composés séparés ont été calculés à partir des chromatogrammes FID.

Les constituants des huiles essentielles sont identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétention (IR) à une série de n-alcanes et avec ceux des substances pures enregistrées dans la littérature ainsi qu'à partir des bases de données Wiley, Adams et MassFinder 3. La Bibliothèque Başer des constituants d'huiles essentielles a été aussi utilisée pour l'identification des composés.

III.2.3. Etude de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides* est réalisée par la technique du contact direct.

III.2.3.1. Technique par contact direct

La méthode de diffusion en milieu gélosé ainsi appelée permet de prévoir avec certitude l'efficacité *in vitro* de l'huile essentielle, il s'agit en fait d'une appréciation qualitative de l'activité. L'aspect quantitatif sera ensuite estimé par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

III.2.3.1.a. Méthode de diffusion

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme), mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par de l'huile essentielle (aromatogramme). Inspiré d'une vieille méthode de Shroeder et Messing datant de 1949, l'aromatogramme consiste à déposer des disques de papiers chromatographiques de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés à la surface de la gélose ensemencée après avoir été chargé de 10 µl d'huile essentielle diluée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 1/2, 1/5 et 1/10 (v/v). D'autres disques, chargés de 10 µl de DMSO sont utilisés comme témoins négatifs en plus du disque de l'antibiotique comme témoin positif. Les géloses sont préparées au préalable dans des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre, l'épaisseur de la gélose est de 4mm. L'ensemencement des milieux se fait par écouvillonnage selon les recommandations de l'OMS (**Rahal, 2005**). Afin de garantir des conditions expérimentales comparables, chaque trois dépôt d'huile essentielle de concentration similaire ont été placés dans la même boîte, le test est répété deux fois pour avoir des résultats fiables. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré (Figure 10).

En ce qui concerne les champignons, des suspensions de spores sont préparées à partir de cultures pures et jeunes, dans de l'eau physiologique stérile. Ces suspensions servent à ensemencer la gélose Sabouraud. L'incubation des champignons se fait à une température de 28°C pendant 7jours.

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (**Duraffourd et al., 1990**).

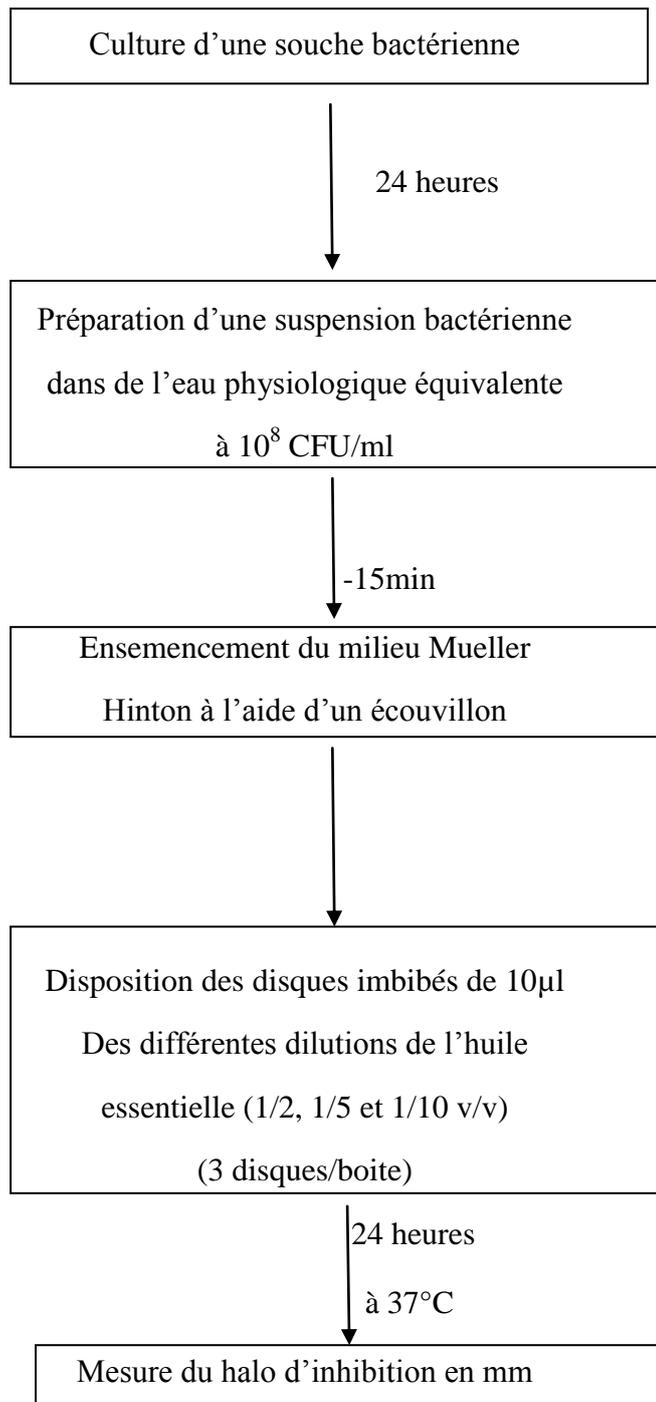


Figure 10 : Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne

III.2.3.1.b. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

*- **Technique de micro dilution en milieu liquide**

La technique utilisée est la méthode de **Bassole *et al.* (2003)**. Les huiles essentielles à tester sont dissoutes dans des micro-tubes stériles contenant du DMSO. Des séries de dilutions de $\frac{1}{2}$ sont faites dans des microplaques de 96 puits. 50 μ l de chaque dilution sont transférés dans les puits de la microplaque, qui contiennent chacun 150 μ l de bouillon nutritif (BN) inoculé avec 10^6 UFC/ml de cultures jeunes de bactéries.

La dernière ligne contenant seulement les dilutions en séries de l'échantillon sans micro-organismes est utilisée comme témoin négatif. De l'eau distillée stérile et du milieu ensemencé servent de témoin positif. Après 18 heures d'incubation à 37°C, la CMI de l'huile essentielle est déterminée à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne.

III.2.4. Test de l'activité antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides* deux tests ont été utilisés: le test de piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH (2,2- diphenyl -1- picrylhydrazyl) et le test de blanchiment du β -carotène.

III.2.4.1. Le test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH (2,2- diphenyl -1- picrylhydrazyl) est réduit en diphényle picryl hydrazine (Figure 11) par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (**Sanchez-Moreno, 2002**). L'intensité de la couleur est représentative de la capacité des composés de l'huile essentielle à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique. Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur le pouvoir anti radicalaire direct de notre huile essentielle.

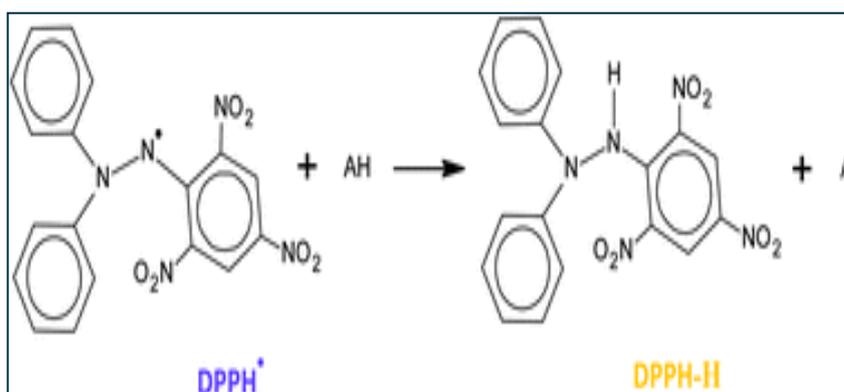


Figure 11 : Forme libre et réduite du DPPH (Pyrzyska et Pękal, 2013).

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger des huiles essentielles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides* contre le radical DPPH est celle de **Güllüce *et al.* (2010)**. 50 µl de l'huile essentielle (différentes dilutions) sont additionnées à 1250µl d'une solution de DPPH (0.004%) préparé dans le méthanol. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis maintenu à l'obscurité pendant 30min à une température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesuré à 517 nm contre un blanc. Le contrôle négatif est constitué du mélange méthanolique du DPPH.

Egalement, le même test a été réalisé mais cette fois ci avec un antioxydant de référence le BHT (hydroxytoluène butylé). Tous les tests sont réalisés en triplet.

Les mesures de l'absorbance du DPPH des différentes substances antioxydantes (HE et BHT) permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition PI en appliquant la formule suivante :

$$PI (\%) = (ABS_{control} - ABS_{test}) \times 100 / ABS_{control}.$$

Où : $ABS_{control}$: absorbance du radical seul (contrôle).

ABS_{test} : absorbance de l'échantillon

III.2.4.2. Le test de blanchiment du β -carotène/acide linoléique

L'activité antioxydante des huiles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides* est mesurée selon la méthode de **Tepe et al (2005)**. 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 de β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la décoloration du β -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

La méthode décrite par **Krishnaiah et al. (2010)** a été employée. Une émulsion β -carotène/acide linoléique préparée par solubilisation de 0.5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, a été additionnée de 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après évaporation complète du chloroforme au rotavapeur, 100 ml d'eau saturée en oxygène sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Quatre mille microlitres de ce mélange ont été transférés dans différents tubes à essai contenant différentes concentrations (350 μ l) de l'échantillon dans de l'éthanol. Dès que l'émulsion a été ajoutée à chaque tube, le temps zéro absorbance a été mesuré à 470 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. L'émulsion est incubée pendant 2 heures à 50°C. Deux tubes contrôles ont été aussi préparés avec la même procédure: l'un contenant un antioxydant de référence BHT (témoin positif) et l'autre sans antioxydant (témoin négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l d'éthanol. L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée en termes de blanchiment du β -carotène en utilisant la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_t - C_t)] / [(C_0 - C_t)] \times 100 \text{ (Bettaieb et al., 2011).}$$

Où:

A_t : l'absorbance de l'échantillon après incubation pendant 120 minutes.

C_t : l'absorbance du contrôle après incubation pendant 120 minutes

C_0 : l'absorbance du contrôle au temps zéro.

III.2.5. Activité anticholinestérase

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées en utilisant la méthode spectrophotométrique d'Ellman et ses collaborateurs. Cette dernière est basée sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE ; cette réaction produit alors de la thiocholine qui réagit à son tour, via ses groupements thiols -SH-, avec l'acide 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoïque] (DTNB) pour former un anion de couleur jaune dont l'intensité est fonction de l'activité de l'acétylcholinestérase (Ellman *et al.*, 1961) (Figure 12).

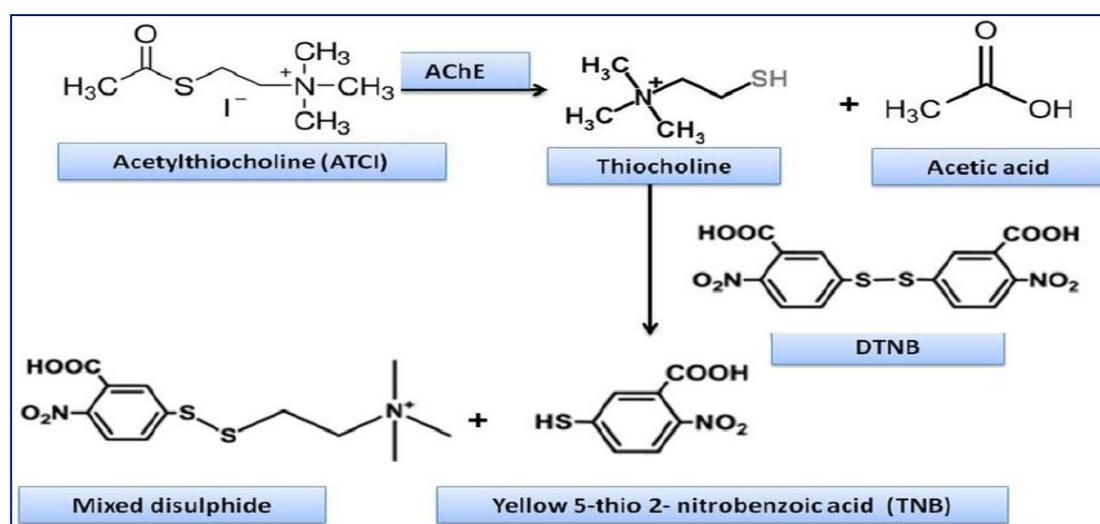


Figure 12 : Les mécanismes chimiques de la méthode d'Ellman (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014).

Dans ce procédé, 140 μL de tampon phosphate de sodium (pH 8.0), 20 μL de DTNB, 20 μL de l'huile à différentes concentration et 20 μL de la solution AChE / BChE ont été ajoutés par pipette automatique multicanaux dans une microplaque à 96 puits et incubé pendant 15 min à 25°C. La réaction a ensuite été initiée avec l'addition de 10 μL de chlorure d'iodure d'acétylthiocholine / butyrylthiocholine. L'hydrolyse du chlorure d'iodure d'acétylthiocholine / butyrylthiocholine a été surveillée par la formation de l'anion jaune 5-thio-2-nitrobenzoate résultant de la réaction du DTNB avec des thiocholines, catalysées par thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou de chlorure de butyrylthiocholine. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits à une longueur d'onde de 412 nm.

Le pourcentage d'inhibition des enzymes AChE ou BChE a été déterminé par comparaison de la réaction de l'échantillon comportant l'huile par rapport à l'échantillon à blanc (éthanol dans du tampon phosphate (pH = 8)) à l'aide de la formule suivante:

$$I (\%) = (E - S)/E \times 100$$

E : l'activité de l'enzyme sans huile

S : l'activité de l'enzyme en présence d'huile

Les expériences ont été réalisées en *triplicata*, en utilisant comme composé de référence la galantamine.

III.2.6. Activité insecticide

III.2.6.1. Matériel animal

Tribolium confusum (Duval) (tenebrionidae) (Figure 13) est un coléoptère d'origine Indo-Australienne (**Smith et Whitman, 1992**) et est trouvé dans des secteurs tempérés, mais survivra l'hiver dans les endroits protégés, particulièrement où il y a de la chaleur centrale (**Tripathi et al., 2001**).

Bien que ces petits coléoptères, mesurent environ 1/8 de pouce de long, les adultes ont une longue vie et peuvent vivre pendant plus de trois ans (**Walter, 1990**). Le *Tribolium* peut se reproduire tout au long de l'année dans des zones chaudes. Son cycle de vie prend de 40 à 90 jours, et l'adulte peut vivre pendant trois ans à une température situant entre 32°C et 35°C, son développement s'arrête au-dessous de 22°C. Cependant, il résiste aux basses hygrométries. Le *Tribolium confusum* (Duv.) a une longue association avec l'alimentation humaine stockée et a été trouvé en association avec un large éventail de produits de base dont les céréales, farine, pois, haricots, cacao, noix, fruits secs et épices, mais les produits de céréales moulues, comme la farine semble être leur aliment préféré (**Campbell et Runnion, 2003**).



Figure 13 : Un adulte de *Tribolium confusum* (Duval) (Baldwin et Fasulo, 2014)

III.2.6.1.a. Récolte et élevage de l'insecte

- **Récolte**

Les échantillons du son de maïs contaminés d'insectes ont été prélevés à partir de la COOPSEL (Coopérative agricole des services spécialisés en élevages) de Ras el ma (Sétif) durant la période de mai et juin 2015 puis l'insecte (*Tribolium confusum*) a été identifié par Pr. Bounechada (Professeur à l'université Ferhat Abbas, Sétif).

- **Elevage**

Les adultes de *Tribolium confusum* sont placés dans des bocaux en verre contenant 250g de son de maïs puis mis dans une étuve réglée à une température de 30°C et une humidité relative de 70 %.

III.2.6.2. Le test de toxicité par contact des huiles essentielles sur papier filtre

Quatre solutions de chacune des HEs (3, 6, 12, 25 $\mu\text{l/ml}$ d'acétone) ont été préparées en diluant des quantités connues d'huile dans l'acétone. Un millilitre de chaque solution a été répandu uniformément sur un disque de papier filtre de 9 cm de diamètre (63.58 cm^2 de surface) à l'aide d'une micropipette. Après évaporation complète du solvant de dilution, chaque disque traité (c'est-à-dire à 0.047, 0.094, 0.18, 0.39 $\mu\text{l/cm}^2$) ou témoin (solvant seul) a été minutieusement placé dans une boîte de Pétri de même dimension.

Trois répétitions ont été effectuées pour chaque huile essentielle. Un lot de 10 insectes adultes a été introduit dans chaque boîte de Pétri qui a été aussitôt fermée (Tapondjou *et al.*, 2003).

Le nombre d'insectes morts a été comptabilisé après 24 heures et le taux de mortalité dans les boîtes traitées a été calculé en utilisant la formule d'Abbott de correction par le résultat du témoin non traité :

$$M_c = (M_0 - M_t / 100 - M_t) \times 100$$

M_c : la mortalité corrigée

M_0 : la mortalité dans les boîtes traitées

M_t : la mortalité naturelle observée dans les boîtes témoins

Les valeurs de DL50 ont été calculées pour la toxicité des HEs sur papier filtre. Ainsi les pourcentages de mortalité ont été transformés en unités probits et les valeurs obtenues ont été corrélées avec le logarithme des doses afin d'obtenir la dose létale pour 50% de la population d'insectes pour chaque matériel végétal à tester (**Tapondjou *et al.*, 2003**). .

III.2.7. Activité anti-inflammatoire *in-vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été évaluée par la méthode de dénaturation des protéines. Le diclofenac sodique, un puissant anti-inflammatoire est utilisé comme référence. Le mélange réactionnel est constitué de 2ml des différentes dilutions des huiles de *Daucus* et d'*Achillea* ou du control (eau distillée) et 2.8 ml du tampon phosphate salin (PBS, pH 6.4) mélangé avec 0.2 ml d'albumine d'œuf (frais), ensuite le mélange est incubé à 37° C pendant 15 minutes. La dénaturation de l'albumine est induite en bain marie à 70°C pendant 5 min. après refroidissement, on mesure l'absorbance à 660 nm (**Chandra *et al.*, 2012**).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{control}} * 100 \text{ (Mizushima and Kobayashi, 1968).}$$

A_{control} : est l'absorbance du control

A_{test} : est l'absorbance du test.

III.2.8. Analyses statistiques

Toutes les valeurs ont été, en général, exprimées en moyenne \pm SD et les statistiques sont faites par Excel 2007.

Chapitre IV

Résultats et Discussion

IV.1. Extraction des huiles essentielles

La première quantification à faire est celle du rendement en huile essentielle obtenue par la technique d'hydrodistillation. Ce rendement est calculé à partir du poids de l'huile essentielle par rapport au poids sec de la masse végétale utilisée dans l'hydrodistillation, soit :

$$\text{Rdt} = \text{Mhe} / \text{Mvg} \times 100$$

Où : Rdt : rendement en HE (en%)

Mhe : masse de l'huile essentielle

Mvg : masse végétale sec

La figure 14 ci-dessous résume les rendements en huiles essentielles des différentes parties de *Daucus aristidis* (*Ammiopsis aristidis*).

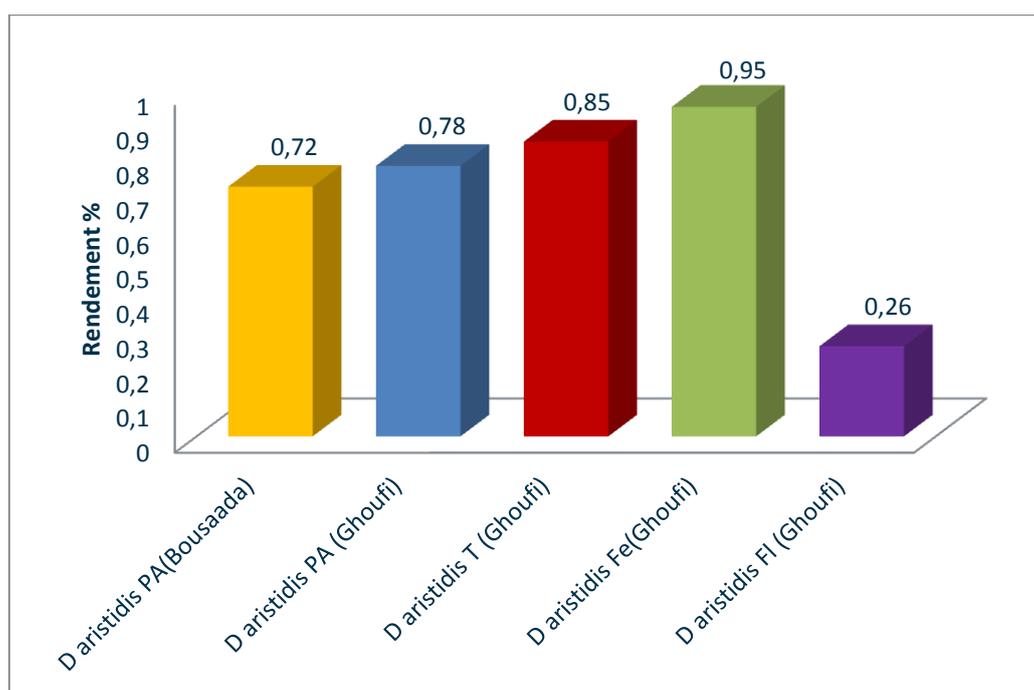


Figure 14: Rendement en huile essentielle des différentes parties de *D. aristidis* de Ghoufi et Bousaada

Comme aucun travail n'a été fait sur l'espèce *A. aristidis* (Coss.) ni sur le genre *Ammiopsis*. On a préféré utilisé son synonyme *D. aristidis* (Coss.) pour discuter les résultats.

Ces rendements peuvent être considérés comme faibles comparativement à celui obtenu à partir des fruits de *Daucus glaber* Forssk (**Mansour et al., 2004**) qui est de 4% (v/w) et de

celui obtenu par **Ksouri et al. (2015)** à partir des graines et des feuilles de *Daucus carota* ssp. *carota* qui est entre (3% et 2.1%) respectivement. De même, **Saad et al. (1995)** ont aussi trouvé un rendement de 2.63% à partir des fruits de *Daucus carota* ssp. *maximus*. Aussi, les huiles de *Daucus carota* subsp. *carota* et *Daucus carota* subsp. *gummifer* ont des rendements entre 1.52% et 1.64% respectivement (**Meliani et al., 2013**) proche de celui trouvé par **Acimovic et al. (2016)** qui est de 1.67% obtenue à partir de l'huile essentielle des graines de *Daucus carota* ssp. *carota*. D'autre part, des études menées par **Khalil et al. (2015)** sur l'huile des fruits de *Daucus carota* et par **Flamini et al. (2007)** sur l'huile des fruits de *Daucus Gingidium* ssp. *gingidium* ont trouvé des rendements proche des valeurs de rendement des huiles testées entre 1% et 1.21% respectivement. De même, l'huile des feuilles de *D. glaber* (**Mansour et al., 2004**) et l'huile des ombelles murs de *D. carota* subsp. *halophilus* (**Tavares et al., 2008**) ont des rendements entre 0.67% et 0.6% respectivement. Cependant, les valeurs des rendements de nos huiles testées sont supérieures à celui trouvé par **Flamini et al. (2007)** obtenue à partir des feuilles de *Daucus gingidium* L. subsp *gingidium* qui est de l'ordre de 0.04% et à ceux trouvés par **Zaibet et al. (2015)** à partir des huiles de *Daucus aureus* récoltée de différentes régions de l'Est algérien qui se situent entre 0.13% et 0.16%. Ces dernières valeurs sont proches de la valeur du rendement de l'huile des fleurs de *D. aristidis* testée puisque c'est le plus faible. Il est à signaler que l'ensemble de ces huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation dans un Clevenger.

Les rendements en huile essentielle des différentes parties d'*Achillea santolinoides* sont résumés dans la figure 15 :

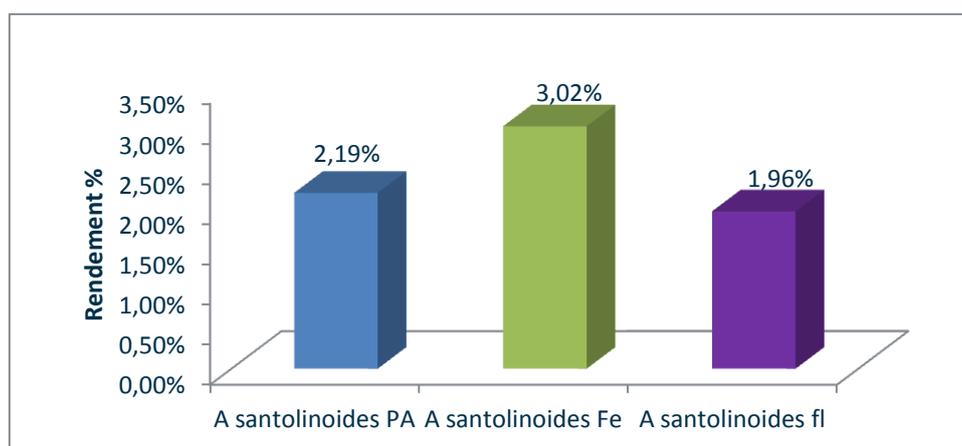


Figure 15 : Rendement en huile essentielle des différentes parties d'*A. santolinoides*

Les valeurs de rendement des huiles d'*A. santolinoides* sont supérieures à celle obtenue par **Sanz et al. (1985)** pour la partie aérienne de la même plante originaire de l'Espagne qui est de 0.17%. Elles sont aussi supérieures au rendement obtenu par **Fahed et al. (2016)** pour *A. santolinoides* subsp. *wilhelmsii* qui est de 0.58%. De même, les rendements en huile essentielle d'*A. millefolium* originaire d'Iran (**Yousefzadeh et Zeinivand, 2013**) et de l'Italie (**Falconieri et al., 2011**) ont été évalué à 0.56% - 0.9% respectivement. D'autre part, l'étude de **Farhang Sardrodi et al. (2017)** sur *A. aucheri* a donné une valeur de 0.95% qui est proche de celle trouvé par **Bozin et al. (2008)** qui est de 0.98% obtenue à partir de l'huile d'*A. pannonica*.

Ces différences sont dues à plusieurs facteurs : l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques (la température et l'humidité), l'espèce végétal elle-même, l'organe végétal, le stade de la croissance, la période de cueillette, la conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction (**Granger et al., 1973; Rosua et Granados, 1987; Fournier et al., 1989; Haeckel et Omar, 1993; khajeh et al., 2005; Viljoen et al., 2006; Sefidkon et al., 2007**).

La lumière stimule aussi la production des huiles essentielles. Des études sur *Mentha piperita* L. ont montré que l'obscurité a diminué le rendement en huiles volatiles de 1.43 % à 1.09 %. De même, le pourcentage du menthol dans l'huile essentielle est diminué de 61.8 % à 57.5 %. L'irrigation a un effet positif sur la croissance végétative. Il est démontré que l'insuffisance ou l'excès d'eau a un effet négatif sur le rendement en huiles essentielles. Le pourcentage de l'huile volatile est passé de 1.4 % (pendant la période des jours longs) à 0.7 % (pendant la période des jours courts) (**El-Zakhem, 2003**).

La teneur en huiles essentielles dépend aussi du moment de la récolte. Les sommités fleuries et les feuilles doivent être récoltées avant la floraison, car selon **Salle et Pelletier (1991)**, après la floraison, 70% des huiles essentielles s'évaporent dans l'air. Par contre, la plante entière est généralement récoltée pendant la floraison (**Flück, 1942**).

IV.2. Analyse chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles des différentes parties de *D. aristidis* de Ghoufi et la partie aérienne de *D. aristidis* de Boussaâda analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) nous a permis d'isoler et d'identifier 61 et 32 composés, respectivement (Tableau 2 et 3) (les figures 19-20-21-22-23). Les constituants sont caractérisés par une importante fraction hydrocarbonée [97.1% et 95.7%], respectivement,

représentées principalement par des monoterpènes hydrocarbonés (95.8% et 94.3%), les sesquiterpènes représentent (2.1% et 2.2%) seulement des huiles essentielles, tandis que les tiges, les feuilles et les fleurs de *D. aristidis* de Ghoufi sont caractérisés par une importante fraction oxygénée (36.6% - 24% - 24.5%), respectivement (Figure 16).

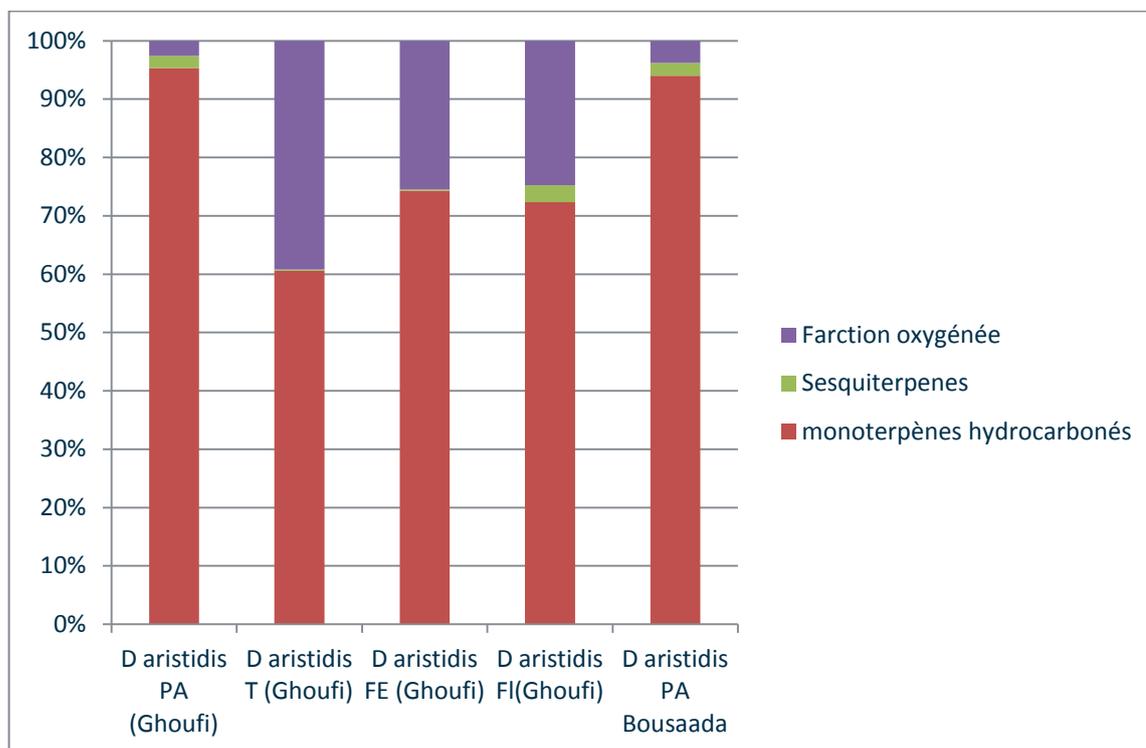


Figure 16 : Pourcentage des différentes classes chimiques des huiles de *D. aristidis*

Les principaux constituants de la partie aérienne, des tiges, des feuilles et des fleurs des huiles de *D. aristidis* de Ghoufi ont été établis comme α -pinène (74,1% - 43,5% - 53,5% - 55,5%) et β -pinène (11,9% - 7,5% - 7,8% - 8,1%), en plus, les huiles des tiges et des feuilles ont un autre composant majeur qui est le trans-verbenol (10,6% - 6,5%), respectivement. Alors que l' α -pinène (49%), le β -pinène (19,2%), le limonène (7,5%), le myrcène (6,7%) et le sabinène (4,3%) étaient les principaux constituants de l'huile de *D. aristidis* de Bousaâda (figure 17 et 18).

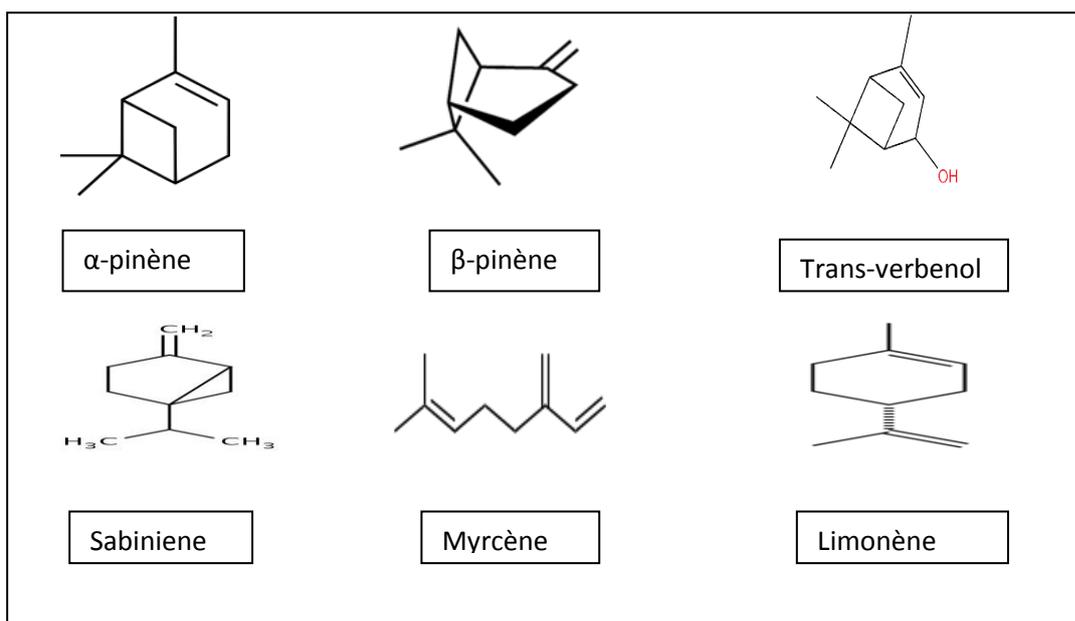


Figure 17 : Structure des composants majoritaires des huiles de *D. aristidis*

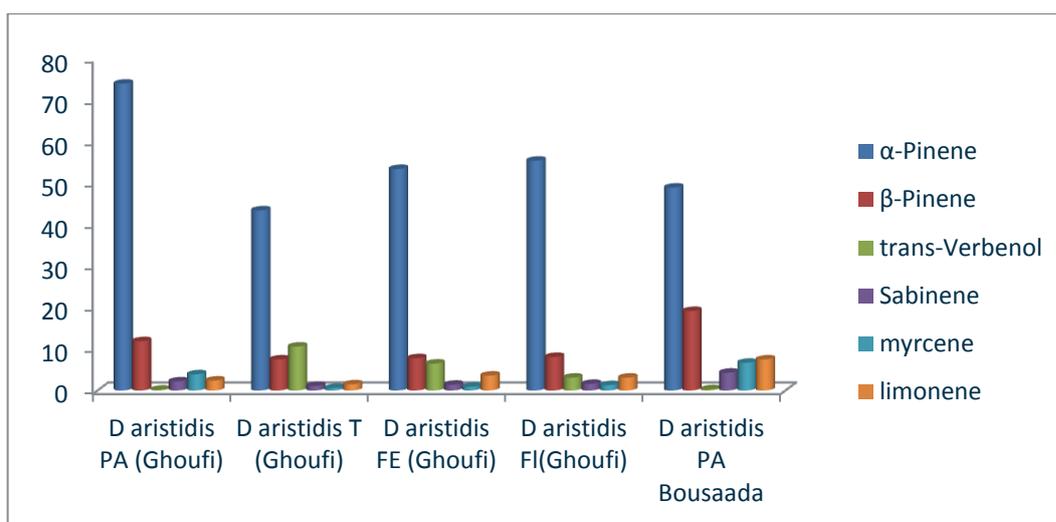


Figure 18 : Pourcentage des composants majoritaires dans les huiles de *D. aristidis*

Tableau 2 : Composition chimique des huiles des différentes parties d'*D. aristidis* de Ghoufi.

composés	IR	Ghoufi (%)	T	F	FI
α-Pinene	1032	74.1	43.5	53.5	55.5
α-Thujene	1035	-	0.1	0.1	0.1
Camphene	1076	0.5	0.5	0.5	0.5
Hexanal	1093	-	0.2	-	-
β-Pinene	1118	11.9	7.5	7.8	8.1

Sabinene	1132	2.2	1.1	1.4	1.6
Thuja-2,4(10)-diene	1135	0.1	0.9	1.3	0.6
δ -3-Carene	1159	tr ^e	-	-	-
Myrcene	1174	3.9	0.6	0.9	1.3
α -Terpinene	1188	0.1	-	-	-
Limonene	1203	2.4	1.5	3.6	3.1
β -Phellandrene	1218	0.3	-	0.2	0.2
(Z)- β -Ocimene	1246	tr	-	-	-
γ -Terpinene	1255	0.2	0.1	0.1	0.2
(E)- β -Ocimene	1266	tr	-	-	-
<i>p</i> -Cymene	1280	0.1	0.6	0.6	0.4
Terpinolene	1290	0.1	0.1	-	-
Perillene	1429	-	0.1	0.1	-
γ -Campholene aldehyde	1439	-	0.2	0.2	Tr
<i>p</i> -Cymenene	1452	-	0.3	0.2	-
α -Copaene	1497	0.1	-	-	-
α -Campholene aldehyde	1499	0.1	2.3	1.4	1.0
Linalool	1553	0.1	0.3	0.2	0.5
Pinocarvone	1586	tr	1.5	1.0	0.8
Bornyl acetate	1591	0.1	0.2	0.1	0.2
Terpinen-4-ol	1611	0.4	0.5	0.5	Tr
β -Caryophyllene	1612	0.4	0.2	0.2	0.6
β -Cedrene	1613	-	-	-	0.4
Thuj-3-en-10-al	1642	0.1	-	-	-
Myrtenal	1648	-	2.9	1.8	1.0
<i>cis</i> -Verbenol	1663	0.1	2.5	1.4	0.6
<i>trans</i> -Pinocarveol	1670	0.1	4.4	2.6	1.1
α -Humulene	1687	0.1	-	-	0.4
<i>trans</i>-Verbenol	1683	0.2	10.6	6.5	3.1
α -Terpineol	1706	0.2	0.5	0.3	0.3
Verbenone	1725	-	3.1	2.6	0.8
Germacrene D	1726	0.4	-	-	-
β -Bisabolene	1741	-	-	-	1.3
Carvone	1751	-	0.3	0.3	0.3
Bicyclogermacrene	1755	0.1	-	-	-
δ -Cadinene	1773	0.1	-	-	-
(E)- α -Bisabolene	1784	0.1	-	-	0.2
Myrtenol	1804	0.2	2.2	1.2	0.6
<i>trans</i> -Carveol	1845	0.1	1.2	0.9	0.5
Germacrene-B	1854	tr	-	-	-
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1864	tr	1.1	0.9	0.2
<i>p</i> -Cymen-9-ol	1912	-	0.2	0.2	-
Isocaryophyllene oxide	2001	-	-	-	0.2
Caryophyllene oxide	2008	0.1	0.7	0.7	3.0
Carotol	2045	0.1	0.1	-	0.5
Humulene epoxide-II	2071	-	0.2	0.2	1.2
Humulene epoxide-III	2081	-	-	-	0.2

Cedrol	2143	0.1	-	-	3.7
Spathulenol	2144	-	0.4	0.3	-
τ -Cadinol	2187	0.1	0.2	-	0.2
<i>epi</i> - α -Bisabolol	2256	0.1	0.2	0.2	0.5
β -Eudesmol	2257	0.1	0.3	0.2	0.3
Alismol	2264	0.1	-	-	-
Guaia-6,10(14)-dien-4 β -ol	2269	-	0.2	0.2	0.9
Juniper camphor	2320	0.1	-	-	2.0
β -Asarone	2361	tr	-	-	0.8
<i>Fraction hydrocarbonée</i>		97.1%	57%	70.4%	74.5%
<i>Monoterpènes hydrocarbonés</i>		95.8%	56.5%	70%	71.6%
<i>Sesquiterpènes</i>		2.1%	0.2%	0.2%	2.9%
<i>Fraction oxygénée</i>		2.6%	36.6%	24%	24.5%
Total		99.7	93.6	94.4	99.0

Tr :trace IR :indice de rétention T :tiges F :feuilles Fl : fleurs

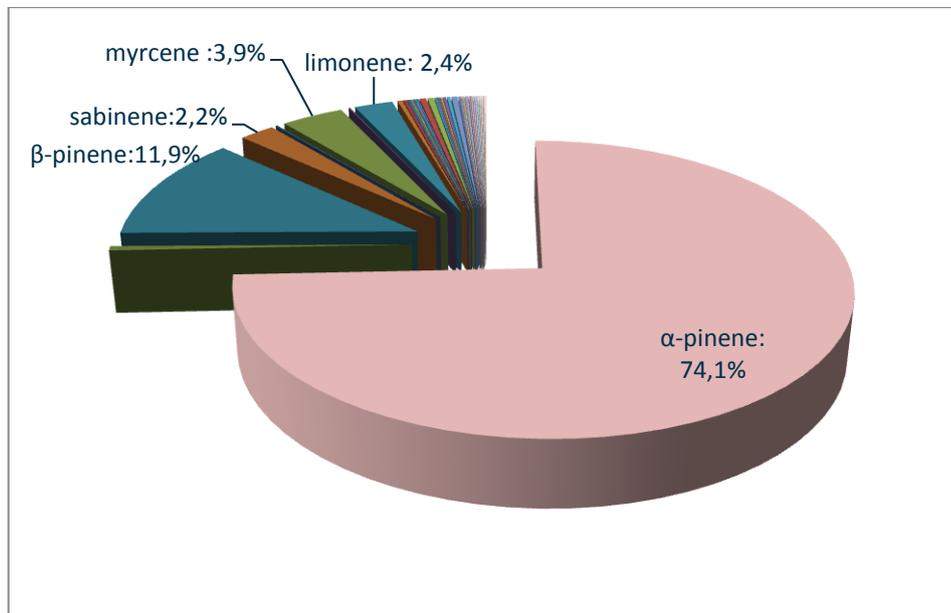


Figure 19 : Pourcentage des différents composants de l'huile de la partie aérienne de *D. aristidis* de Ghoufi.

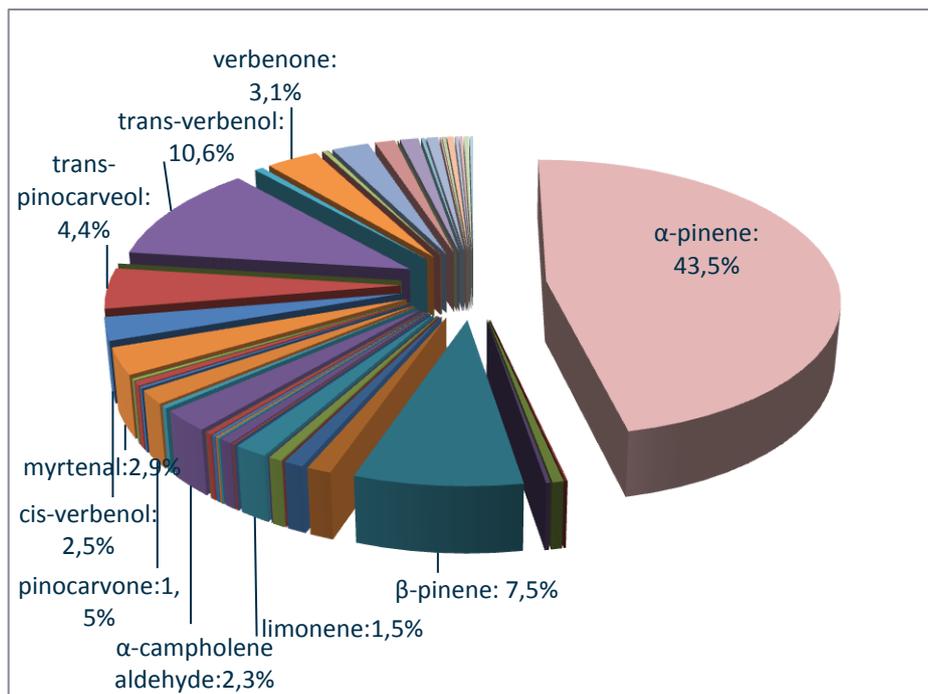


Figure 20 : Pourcentage des différents composants de l'huile des tiges de *D. aristidis* de Ghoufi.

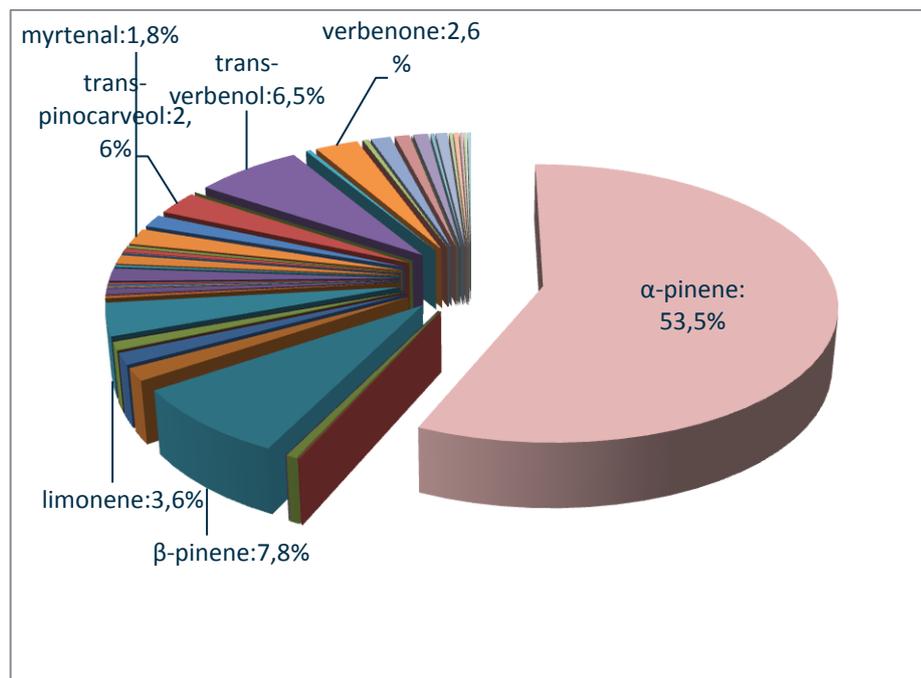


Figure 21 : Pourcentage des différents composants de l'huile des feuilles de *D. aristidis* de Ghoufi.

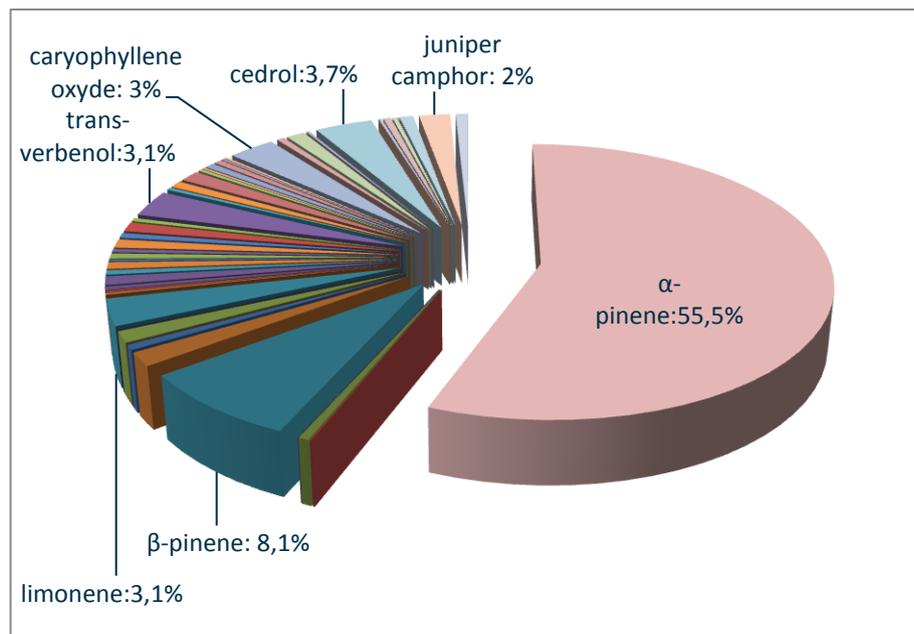


Figure 22: Pourcentage des différents composants de l'huile des fleurs de *D. aristidis* de Ghoufi.

Tableau 3 : Composition chimique de l'huile de la partie aérienne de *D. aristidis* de Boussaâda.

Composés	IR	Bousaada (%)
α-Pinene	1032	49.0
α -Thujene	1035	0.4
Camphene	1076	1.8
β-Pinene	1118	19.2
Sabinene	1132	4.3
Thuja-2,4(10)-diene	1135	0.1
δ -3-Carene	1159	0.2
Myrcene	1174	6.7
α -Terpinene	1188	0.1
Limonene	1203	7.5
β -Phellandrene	1218	3.3
(Z)- β -Ocimene	1246	0.3
γ -Terpinene	1255	0.4
(E)- β -Ocimene	1266	0.2
<i>p</i> -Cymene	1280	0.7
Terpinolene	1290	0.2
α -Campholene aldehyde	1499	0.1
Linalool	1553	0.3
Bornyl acetate	1591	0.4
Terpinen-4-ol	1611	0.9
β -Caryophyllene	1612	0.6

Thuj-3-en10-al	1642	0.2
<i>trans</i> -Pinocarveol	1670	0.2
α -Humulene	1687	0.1
<i>trans</i> -Verbenol	1683	0.3
α -Terpineol	1706	0.3
Germacrene D	1726	0.6
Bicyclogermacrene	1755	0.1
Myrtenol	1804	0.2
Caryophyllene oxide	2008	0.2
Spathulenol	2144	0.2
<i>epi</i> - α -Bisabolol	2256	0.4
fraction hydrocarbonée		95.7%
Monoterpènes hydrocarbonés		94.3%
Sesquiterpènes		2.2%
Farfction oxygénée		3.8%
Total		99.5

IR :indice de retention

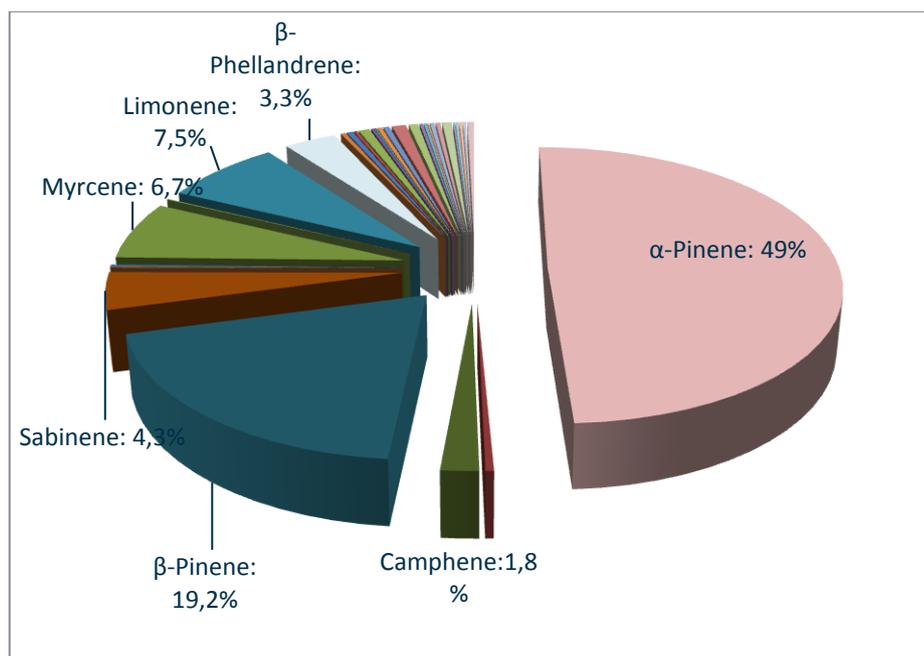


Figure 23 : Pourcentage des différents composants de l'huile de la partie aérienne de *D. aristidis* de Bousaàda.

L'analyse chimique des huiles essentielles de *D. aristidis* de Ghoufi et de Boussaâda montre que l' α -pinène est le constituant principal de la plupart des huiles essentielles des espèces du même genre. En effet, l'analyse chimique de l'huile essentielle de *Daucus carota ssp carota* de la Pologne a montré que la majeure proportion de cette huile est représentée par

l' α -pinène avec un pourcentage de 41% (**Staniszewska et Kula., 2001**). De même les constituants majoritaires de l'huile des fleurs de *Daucus carota ssp. carota* du Maroc sont : l' α -pinène (22.25%), le β -asarone (15.13%), le sabinène (12.46%) et l' α -himachalène (10.14%) (**Elhourri et al., 2014**), ce dernier composant est totalement absent dans les deux huiles de *D. aristidis* tandis que le β -asarone a été trouvée dans les fleurs de l'huile *D. aristidis* de Ghoufi (0,8%). En outre, l'huile essentielle de la partie aérienne de *Daucus reboudii* originaire d'El-kala (Algérie) contient de l' α -pinène (39,7%) suivi du sabinène (21,2%) en tant que constituants majoritaires (**Djarri et al., 2006**). Néanmoins, l'étude de **Smaili et al. (2011)** sur l'huile essentielle des feuilles et des fruits de *D. sahariensis* a révélé la présence d'une quantité significative de myristicine (34,3% et 43,9%, respectivement) celui-ci est totalement absent dans l'huile de *D. aristidis*. L' α -pinène est aussi présent dans l'huile de *Daucus sahariensis* mais avec des quantités moindres (5.4%-13.1%). De même, l'étude comparative des huiles essentielles de *Daucus guttatus ssp zahariadii* et *Daucus carota* sauvage du Balkan réalisée par **Radilovic et al. (2011)** a montré que l'huile de *Daucus guttatus ssp zahariadii* possède comme constituants majoritaires : l'apiole (43.3%), et le β -bisabolène (34.2%) (Ce dernier composant était présent dans les huiles des fleurs de *D. aristidis* de Ghoufi avec une petite quantité de 1,3%) et l' α -pinène en quantité minoritaire (0.3%) cependant l'huile des parties aériennes de *Daucus carota* sauvage contient 29.3% de l' α -pinène qui est son composant majeur, d'autre part, dans cette même étude ; l'analyse chimique de l'huile essentielle des graines de *Daucus carota* sauvage a prouvée la présence d'un constituant principal l'acétate de géranyl (53.2%) qui est totalement absent dans l'huile testée et d'un constituant mineur l' α -pinène 3.3%. Selon **Meliani et al. (2013)**, les huiles de la partie aérienne de *Daucus carota* susp. *carota* et de *Daucus carota* susp. *gummifer* de l'Algérie sont aussi caractérisées par la présence de l' α -pinène (26%-34.1%), le sabinène (1.5%-14%), le limonène (0.5%-13%) et le β -pinène (0.6%-11.2%) ce dernier composant, le β - pinène, est l'un des composants majoritaires de l'huile de *D. aristidis* qui est aussi présent dans la plupart des huiles du genre *Daucus* mais avec des proportions variables. **Maxia et al. (2009)** signalent que l'huile essentielle des fleurs et des ombelles avec graines de *D. carota* subsp. *carota* du Portugal présentent : l'acétate de geranyl (5.2%-65%) et l' α -pinène (3.5%-37.9%) comme composants majoritaires et le β - pinène (3.5%-2.3%) comme constituant minoritaire. De même, l'huile de la partie aérienne de *Daucus muricatus* contient 18.9% du sabinène, 16.7% de l' α -pinène et 14.2% du limonène qui sont ses constituants majoritaires et une quantité minoritaire de 2.5% du β - pinène (**Bendiabdellah et al., 2012**). En outre, l'analyse de l'huile essentielle des graines de *D. carota ssp. carota* a démontré la présence du sabinene (40.9%),

de l' α -pinène (30.1%), du β -bisabolène (6.2%), du β - pinène (5.7%) et du trans-caryophyllène (5.3%) comme composants majeurs (**Acimovic et al., 2016**) Ce dernier constituant est totalement absent dans les huiles testées. Selon **Ksouri et al. (2015)**, l'huile des feuilles de *Daucus carota ssp. carota* contient les constituants majoritaires suivants : l' α -pinène (27.44%), le sabinène (25.34%) et le germacrène D (16.33%) qui est présent dans l'huile de la partie aérienne de *D. aristidis* de Ghoufi et celle de Boussaâda en petite quantité (0.4% et 0.6%), respectivement.

Il est à signaler que les proportions de l' α -pinène et du β -pinène trouvées dans l'huile de *D. aristidis* de Ghoufi et Bousaâda sont les plus élevées en comparaison avec les valeurs trouvées dans les huiles du genre *Daucus* reporté dans la littérature.

S'agissant du trans-verbenol qui est parmi les composants majoritaires des tiges et des feuilles de *D. aristidis* (10.6% et 6.5%), il n'existe qu'en faible quantité dans l'huile des graines de *Daucus carota ssp carota* de l'Algérie (0.12%) (**Ksouri et al., 2015**) et dans l'huile des graines de *Daucus carota* originaire de la Turquie (0.08%) (**Ozcan et Chalchat, 2007**). De même, les huiles de *Daucus aureus* de Constantine et d'Oum Elbouaghi (Algérie) ne contiennent que (0.2% et 0.8%) du trans-verbenol, respectivement (**Zaibet, 2016**).

Outre les constituants majoritaires l' α -pinène et le β -pinène présents dans l'huile de *D. aristidis* originaire de Ghoufi et de Bousaâda cette dernière huile possède aussi d'autres constituants majoritaires qui sont le limonène (7.5%), le myrcène (6.7%) et le sabinène (4.3%). **Verma et al. (2014)** ont constaté la présence de ses composants majeurs dans l'huile essentielle de *Daucus carota* subsp *sativus*: le limonène (4.4%-12.7%), le sabinène (0.2%-5.3%), le myrcène (6.4%-14.1%), l' α -pinène (21.2%-41.2%) et le carotol (10.2%-58.5%). cependant, le carotol n'était présent qu'en petite quantité (0,1%, 0,5% et 0,1%) dans les fleurs, les feuilles et les parties aériennes des huiles de *D. aristidis* de Ghoufi mais totalement absent dans l'huile de Bousaâda. De même, le carotol et le sabinène sont les constituants majeurs de l'huile des fruits de *Daucus carota* originaire du nord de la Serbie avec des proportions de 20.3% et 18.7%, respectivement (**Glisic et al., 2007**). Aussi, l'étude de l'huile essentielle des fruits de *Daucus carota ssp. major* a prouvée la présence de l'acétate de geranyl (34.2%), l' α -pinène (12.9%), le geraniol (6.9%), le myrcène (4.7%), l'épi α bisabolol (4.5%), le sabinène (3.3%) et le limonène (3%) (**Flamini et al., 2014**). Ce même auteur a réalisé une étude sur l'effet des différents stades végétatifs sur la composition chimique de l'huile de *Daucus sahariensis* est a constaté que cette huile est constituée du myristicine (29.8%-51.7%),

myrcene (6.7%-31.1%), α -pinène (11.6%-14.8%) et limonène (5.3%-11.5%) (Flamini *et al.*, 2013).

Nous avons étudié pour la première fois les huiles des différentes parties d'*Achillea santolinoides*. 32 constituants (Tableau 4) ont été identifiés par GC/SM représentant (95%-95.6%) des huiles caractérisées principalement par une importante fraction oxygénée (86.2%-87%) (Figure 24) dont les constituants majoritaires sont: le camphre (60.8%-62%) et le 1-8 cinéole (14.1%-15.7%).

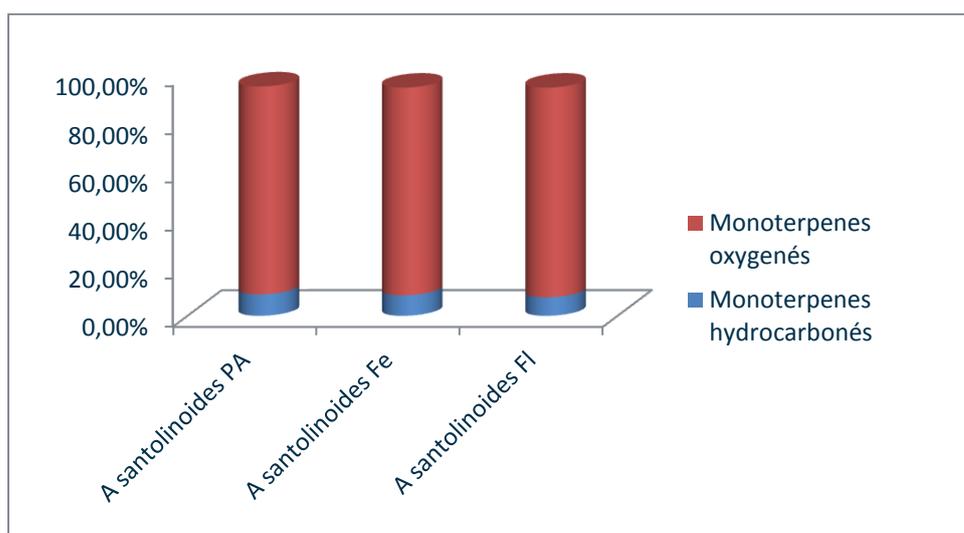


Figure 24 : Pourcentage des différentes classes chimiques des huiles d'*A. santolinoides*

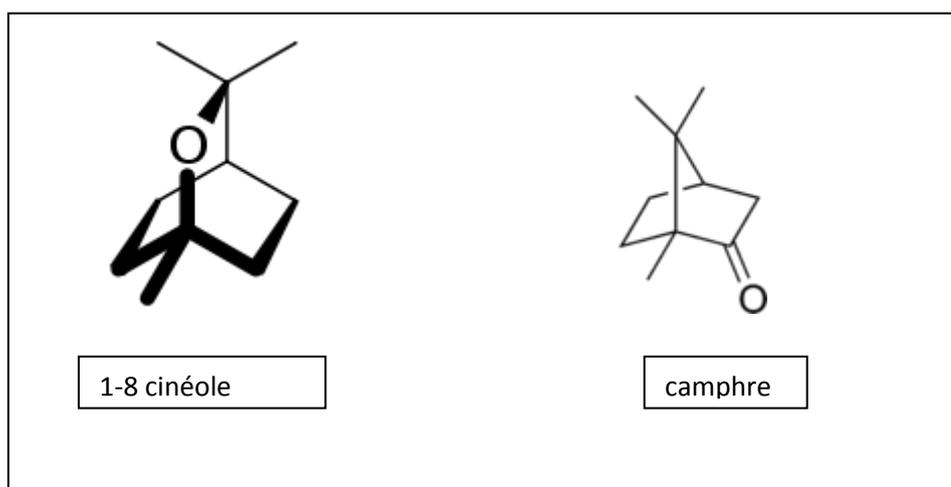


Figure 25 : Structure des composants majoritaires des huiles d'*A. santolinoides*

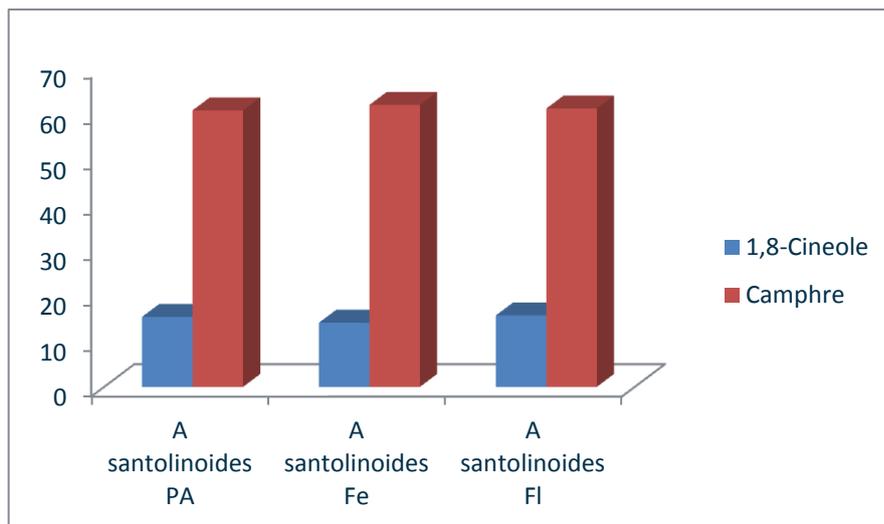


Figure 26 : Pourcentage des composants majoritaires dans les huiles d'*A. santolinoides*

Tableau 4 : Composition chimique des huiles des différentes parties d'*A. santolinoides*.

Composés	IR	P.A (%)	Fe (%)	FI (%)
Tricyclene	1014	0.2	0.2	0.2
α -Pinene	1032	2.1	1.8	1.5
α -Thujene	1035	0.1	0.1	tr
Camphene	1076	3.0	2.9	2.6
β -Pinene	1118	1.0	1.0	0.9
Sabinene	1132	0.7	0.7	0.6
α -Terpinene	1188	0.2	0.2	0.2
Dehydro-1,8-cineole	1195	0.2	0.2	0.1
2-Methylbutyl isobutyrate	1203	0.1	tr	0.1
Limonene	1203	0.4	0.3	0.3
1,8-Cineole	1213	15.4	14.1	15.7
γ -Terpinene	1255	0.4	0.5	0.5
<i>p</i> -Cymene	1280	0.8	0.7	0.8
Terpinolene	1290	tr	0.1	0.1
2-Methylbutyl isovalerate	1299	tr	0.1	0.1
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1474	0.2	0.2	0.2
α -Campholene aldehyde	1499	0.1	tr	0.1
Camphre	1532	60.8	62.0	61.2
Benzaldehyde	1541	0.3	0.2	0.3
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1556	0.2	0.2	0.2
<i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol	1571	0.2	0.2	0.2
Pinocarvone	1586	0.7	0.7	0.9
Bornyl acetate	1591	1.0	1.0	0.8
Terpinen-4-ol	1611	3.1	3.0	3.3
<i>trans</i> -Pinocarveol	1670	0.6	0.6	0.7
δ -Terpineol	1682	0.4	0.3	0.3
α -Terpineol	1706	1.4	1.5	1.3

Borneol	1719	0.6	0.7	0.5
α -Campholene alcohol	1793	1.1	1.2	1.0
Myrtenol	1804	0.3	0.3	0.3
<i>trans</i> -Carveol	1845	-	-	0.1
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1864	-	-	0.1
<i>Mono hydro</i>		8.9%	8.5%	7.7%
<i>Mon oxy</i>		86.3%	86.2%	87%
Total		95.6	95.0	95.2

IR : indice de rétention tr :trace P.A :partie aérienne Fe : feuilles Fl :fleurs

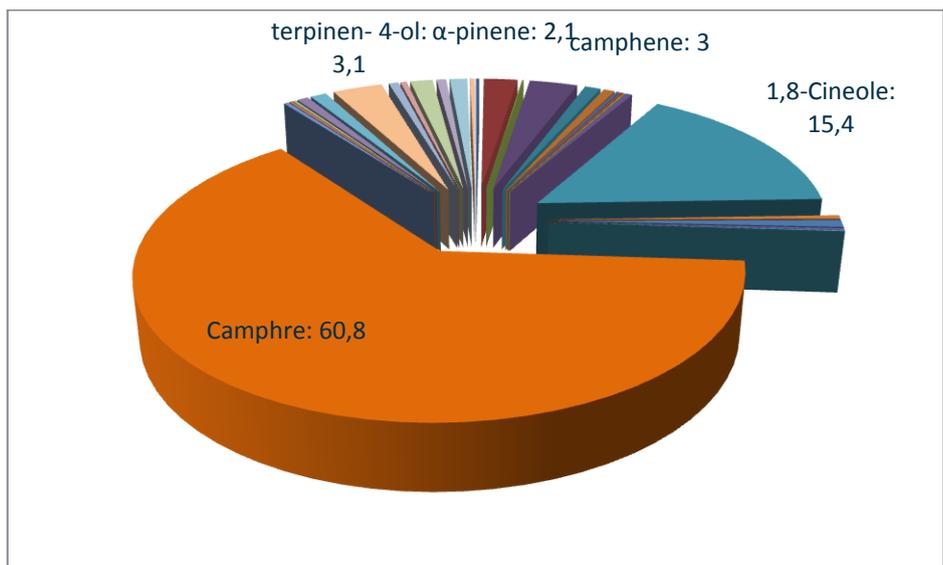


Figure 27 : Pourcentage des différents composants de l'huile de la partie aérienne d'*A. santolinoides*.

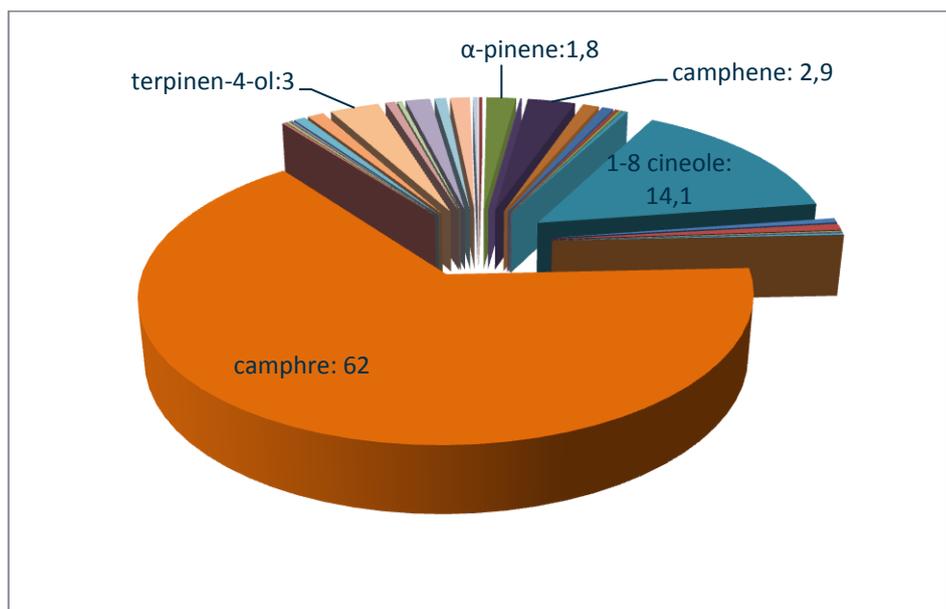


Figure 28 : Pourcentage des différents composants de l'huile des feuilles d'*A. santolinoides*.

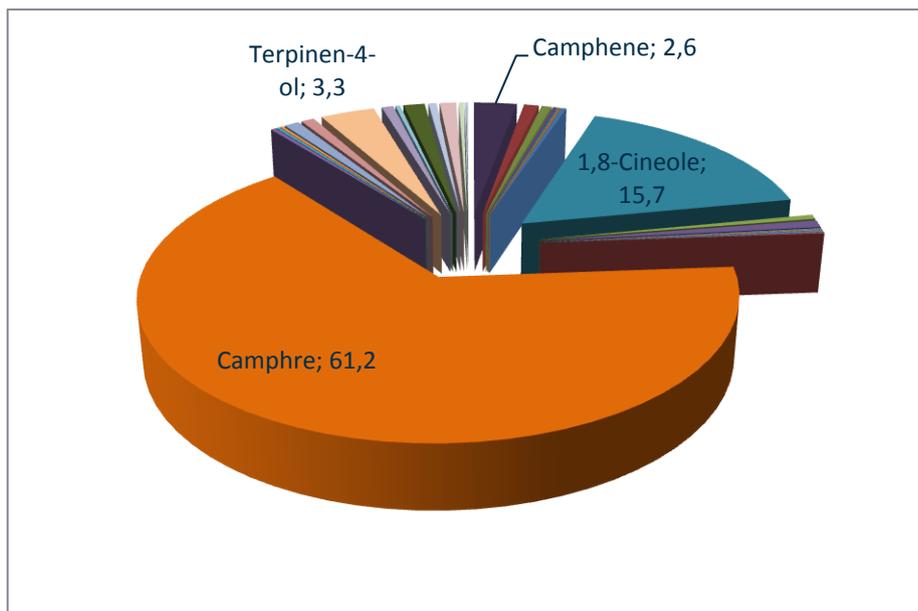


Figure 29 : Pourcentage des différents composants de l'huile des fleurs d'*A. santolinoides*.

L'analyse chimique des huiles essentielles des différentes parties d'*A. santolinoides* a révélée la présence du camphre (60.8% - 62%) et du 1-8 cinéole (eucalyptol) (14.1% - 15.7%) comme composants majoritaires. Effectivement, Le camphre constitue 90% de l'huile essentielle de la même espèce originaire de l'Espagne mais le 1-8 cinéole constitue moins de 3% seulement (Sanz *et al.*, 1985). Selon l'étude de Mohammadhosseini *et al.* (2017), les constituants les plus abondants dans la plupart des espèces endémiques du genre *Achillea* sont le camphre et le 1-8 cinéole. Ces résultats ont été confirmé par l'étude de Hüsniü et Baser (2016) sur 19 espèces du genre *Achillea* de la Turquie qui a montré la présence du camphre et du 1-8 cinéole comme constituants majeurs. Ces derniers ont été aussi trouvé dans les huiles de 11 espèces d'*Achillea* originaire de la Turquie (Turkmenoglu *et al.*, 2015). Cependant, les valeurs de ces deux composants obtenues par plusieurs auteurs sont différentes d'une espèce à une autre du même genre variant de (5.65%-13.18%) pour le camphre qui est très faible par rapport aux valeurs trouvées dans notre étude (60.8%-62%), et de (4.98% -40.40%) pour le 1-8 cinéole (Chatzopoulou *et al.*, 1992; Bozin *et al.*, 2008; Trendafilova *et al.*, 2010; Dastjerdi et Mazoji, 2015 et Farhang Sardrodi *et al.*, 2017). D'autre part, l'analyse chimique de l'huile essentielle d'*Achillea fragrantissima* et des différentes parties d'*Achillea santolina* a révélé la présence de 1-8 cinéole comme constituant mineur a un pourcentage de (1.84%) et (3%-0.69%), respectivement, ainsi que la présence du camphre avec une faible quantité (3.03%-3.76%) dans les huiles d'*A. santolina* seulement (El-Shazly *et al.*, 2004). En

fait, le camphre est aussi complètement absent dans l'huile d'*Achillea millefolium* de l'Inde en présence du 1-8 cinéole comme constituant majoritaire (Nadim *et al.*, 2011), aussi, l'huile de cette même espèce d'Iran ne contient pas le camphre alors que le 1-8 cinéole est présent en tant que composant majeur (Yousefzadeh et Zeinivand, 2013). En revanche, l'huile des différentes parties d'*Achillea wilhelmsii* contient entre (27.99%-34.49%) du camphre cependant le 1-8 cinéole se trouve en faible quantité (1.69%-3.32%) (Shahraki et Ravendeh, 2012).

La composition des HEs sont sujettes à plusieurs facteurs de variabilité, facteurs externes et internes à la plante. Pour une espèce donnée la proportion des différents constituants d'une HE peut varier suivant les conditions de stockage, la température, l'humidité relative et la durée totale de l'insolation (Bruneton, 1999). Les stress biotiques et abiotiques exercent une influence considérable sur la production de plusieurs métabolites secondaires des plantes (Jaleel *et al.*, 2008).

IV.3. Activité antimicrobienne

**D. aristidis*

a. Méthode de diffusion sur gélose

L'activité antimicrobienne des HEs des différentes parties de *D. aristidis* de Ghoufi évaluée par la méthode de diffusion, a permis de révéler une activité limitée sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec des diamètres d'inhibition entre (9.5 et 11.5 mm) de même pour leur activité vis-à-vis la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 mais avec des diamètres moindre entre (8.5 et 10mm). Toutefois *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Bacillus cereus* ATCC 10876 se sont montrées résistantes à l'encontre de toutes les dilutions testées. Ces huiles ont présenté une activité nulle sur les champignons testés (*Aspergillus niger* 2CA936 et *Fusarium oxysporum*) et avec les différentes dilutions. Les diamètres des halos d'inhibition sont faibles par rapport à ceux enregistrés avec les antibiotiques : la Gentamicine et l'Itraconazole (Tableau 6), et montrent que le pouvoir antimicrobien est inversement proportionnel à la dilution, c'est-à-dire l'effet diminue avec l'augmentation de la dilution de l'huile essentielle.

La sensibilité des micro-organismes testés à l'encontre de *D. aristidis* est représentée dans le tableau 5 et la figure 30

Tableau 5 : La sensibilité des micro-organismes à l'encontre de *D. aristidis*

plantes Microorganismes	Diamètre d'inhibition en mm											
	<i>D.aristidis</i> PA (Ghoufi)			<i>D.aristidis</i> T (Ghoufi)			<i>D.aristidis</i> Fe (Ghoufi)			<i>D.aristidis</i> Fl (Ghoufi)		
	dilutions											
	1/10	1/5	1/2	1/10	1/5	1/2	1/10	1/5	1/2	1/10	1/5	1/2
<i>E.coli</i> ATCC 25922	7±0.6	9±0.6	10±0.3	6±0	7.5±0.3	8.5±0.3	7±0	8±0.3	9.5±0.3	6.5±0	7±0.3	8.5±0.4
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	6.0±0.5	8±0.3	9.5±0.5	9±0.8	10±0.3	10.5±0.6	9.5±0.3	10±0.5	11.5±0.6	8.0±0.8	8.5±0.2	9±0.6
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
<i>B.cereus</i> ATCC 10876	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
<i>A.niger</i> 2CA936	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
<i>F.oxysporum</i>	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0

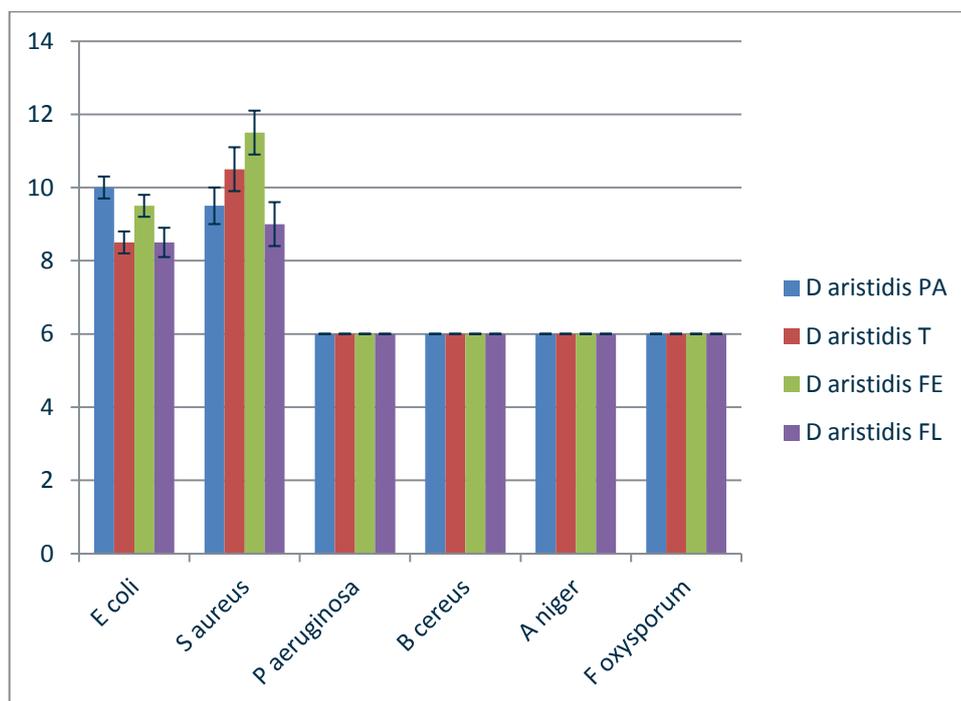


Figure 30: La sensibilité des micro-organismes à l'encontre de *D. aristidis* à la dilution 1/2.

Tableau 6 : Activité antibactérienne des antibiotiques standards exprimée par le diamètre d'inhibition en millimètre

microorganismes	Gentamicine (10µg)	Clotrimazole (50µg)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	24	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	24	-
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	18	-
<i>A. niger</i> 2CA936	-	15
<i>F. oxysporum</i>	-	22

D'après la bibliographie disponible, il n'existe pas de travaux déjà réalisés sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *D. aristidis*. Pour cela, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour les autres espèces de *Daucus* et d'autres espèces.

Selon **Duraffourd et al., (1990)**, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm le germe est très sensible. En se référant à ces données, la sensibilité de *S. aureus* vis-à-vis les huiles de *D. aristidis* est limitée avec des diamètres entre 9.5-11.5 mm à la dilution 1/2. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par **Meliani et al. (2013)** en utilisant les huiles de la partie aérienne et de la racine de *D. aureus*. De même, **Bendiabdellah (2014)** a trouvé les mêmes résultats en testant l'effet antibactérien des huiles de *D. crinitus*, *D. muricatus* et *D. carota* ssp. *hispanicus*. L'huile de *D. gracillis* a aussi donnée un résultat proche de 13mm (**Elkolli, 2016**). Cependant, Les huiles de *D. aureus* originaire de (Constantine, Oum Elbouaghi et Sétif) testées par **Zaibet (2016)** vis-à-vis *S. aureus* ont donné des diamètres d'inhibition plus grands allant de 8 jusqu'à 26 mm. Selon **Laouer et al. (2008)**, l'huile d'*Ammoides atlantica* est très active avec un diamètre de 40mm. Cette efficacité est aussi révélée par l'essence des parties aériennes d'*Ammi visnaga* à la concentration de 128mg/ml (**Khalfallah et al., 2011**). En utilisant cette même concentration, l'huile d'*Athamanta sicula* s'est montrée active avec un diamètre de 18mm (**Labed et al., 2012**). En effet, **Youcefzadi et al. (2011)** ont rapporté la capacité inhibitrice de l'huile des fruits de

Dorema ammoniacum. Toutefois, **Askari et al. (2010)**, ont signalé la résistance de *S. aureus* vis-à-vis de l'huile de *Pimpinella barbata*.

D'autre part, *E. coli* semble être moins sensible aux huiles de *D. aristidis* avec des diamètres de (8-10 mm). Des diamètres proches ont été trouvés par **Bendiabdellah (2014)** en étudiant les huiles de *D. crinitus* et *D. muricatus*. De même, **Zaibet (2016)** a obtenu des valeurs entre 10 et 13mm avec l'huile de *D. aureus* d'Oum Elbouaghui et Sétif. Aussi l'huile de *D. crinitus* a donné un diamètre de 13.5 mm à l'encontre de la souche *E. coli* (**Elkolly, 2016**). Cependant, cette bactérie s'est montrée résistante vis-à-vis l'huile des racines et de la partie aérienne de *D. aureus* (**Meliani et al., 2013**). De même, **Askari et al. (2010)** ont signalé que l'huile de *Pimpinella barbata* est inactive à l'encontre d'*E. coli*.

L'activité biologique des HEs a une relation avec les groupes fonctionnels des composants, leurs proportions et l'interaction entre eux (**Dorman et Deans, 2000; Marino et al., 2001; Delaquis et al., 2002**). En effet, l'activité de l'huile essentielle de *D. aristidis* pourrait être attribuée à la présence de l' α -pinène comme composant majoritaire connu par son activité antimicrobienne significative.

Selon **Bourkhiss et al. (2007)**, l'effet inhibiteur de l'huile de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc est dû à la présence de l' α -pinène (23,54 %). En effet, une étude réalisée par **Angioni et al. (2003)** sur les HEs des feuilles de *Juniperus oxycedrus* a montré qu'elle présente une bonne activité inhibitrice de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*. Cette huile essentielle est caractérisée par l'abondance de l' α -pinène (environ 86 %).

De même, au cours de leurs travaux sur l'huile essentielle de *Croton stellulifer*, **Martin et al. (2000)** ont rapporté que l'activité observée contre les bactéries et les champignons étudiés est attribuée particulièrement à la présence de l' α -pinène parmi les composés majoritaires de cette essence. L'étude réalisée par **Aligianis et al. (2001)** sur l'huile essentielle de *Sideritis sipylea* (contenant comme constituant principal l' α -pinène 35,20 %) a montré qu'elle possède une grande activité contre les microorganismes testés.

Sieniawska et al. (2014) ont également attribué l'activité antimicrobienne de l'huile de *Mutellina purpurea* vis-à-vis *Staphylococcus epidermis* à la présence de l' α -pinène. De même, les résultats de **Dai et al. (2013)** ont prouvé le grand pouvoir antimicrobien de l' α -pinène testé seul et comme constituant majoritaire de l'huile de *Wedelia prostrata* à l'encontre des microorganismes testés. Selon **Taran et al. (2010)**, l'huile des parties aériennes de *Ferulago angulata* subsp. *carduchorum* est plus active que l'huile des graines à cause de la présence de la plus grande quantité des pinènes dans l'huile des parties aériennes.

Cependant, **Amarti et al. (2010)** attribuent la faible activité de l'huile de *Thymus algeriensis* à la présence de l' α -pinène (20,5%), du β -pinène (8,02 %) et du limonène (4,85%). l' α -pinène s'est montré également inactive vis-à-vis *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* testées par **Angioni et al. (2003)**.

Toutefois, **Rivas da Silva et al. (2012)** ont étudié l'activité antimicrobienne des énantiomères de l' α -pinène et le β -pinène sur des souches bactériennes et fongiques, les résultats obtenus prouvent que les énantiomères positifs présentaient une bonne activité contre les champignons et les bactéries testées avec des CMI allant de 117 à 4150 $\mu\text{g/ml}$. Cependant, aucune activité antimicrobienne n'a été détectée avec les énantiomères négatifs jusqu'à 20 mg/ml .

D'autre part, la littérature indique que l'activité antibactérienne de l'HE peut être attribuée aux composés terpéniques qui semblent avoir une activité antibactérienne forte à modérée contre les bactéries Gram positives et contre les champignons pathogènes, mais en général, une activité plus faible a été observée contre les bactéries Gram négatifs (**Hada et al., 2003; Tepe et al., 2004**).

Il est également probable que cette activité n'est pas due à l'action des composants majoritaires seuls mais aussi à l'effet synergique ou antagoniste des composants majeurs et mineurs qui doivent être pris en considération dans l'inhibition des microorganismes (**Dorman et Dean, 2000; Marino et al., 2001; Delaquis et al., 2002; Burt, 2004; Deba et al., 2008**).

Cependant, *B. cereus* s'est révélé résistant aux huiles de *D. aristidis* cette résistance est aussi confirmé par l'étude de **Bendiabdellah (2014)** sur l'huile de *D. carota ssp hispanicus* et *D. crinitus*. De même, **Fekih et al. (2014)** ont également montré l'inactivité de l'huile de *pinus halepensis* vis-à-vis cette souche. Toutefois, les huiles de *D. gracilis* et *carum montanum* se sont montrés actifs sur cette bactérie (**Elkolli, 2016**). Cette dernière s'est également révélée sensible aux huiles de la partie aérienne et de la racine de *D. aureus* (**Meliani, 2014**).

Autre fait, l'absence d'activité antimicrobienne pourrait s'expliquer par la résistance développée par un nombre important de souches et qui réagissent différemment aux divers types d'huiles essentielles. Parmi les souches étudiées, *P. aeruginosa* qui s'est montrée résistante. En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En

présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *P. aeruginosa* deviennent actives (Mann *et al.*, 2000). Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles (Benmeddour, 2016; El Kolli, 2016 ; Zaibet, 2016).

L'activité antifongique des huiles essentielles de *D. aristidis* évaluée par la méthode de diffusion montre la résistance des champignons testés. De même, Bouchekrit *et al.*, (2016) ont confirmé la résistance d'*Aspergillus niger* à l'encontre de l'huile d' *Elaeoselinum asclepium*. Youcefzadi *et al.* (2011) ont également prouvé la résistance d'*A. niger* vis-à-vis l'huile des fruits de *Dorema ammoniacum*. Aussi selon El Kolli *et al.* (2016), l'huile de *D. gracilis* est inactive contre *A. niger*. L'étude de Boussaada *et al.*, (2008) a également confirmé la résistance de *F. oxysporum* à l'encontre de l'huile de *Rhaponticum acaule*. Cependant, l'huile d'*Eucalyptus camaldulensis* est très active vis-à-vis *Fusarium oxysporum* (Gakuubi *et al.*, 2017) contrairement à l'huile testée de *D. aristidis* qui est inactive.

L'inactivité des souches microbiennes testées peut être du, d'une part, à l'effet antagoniste de quelques composés présents dans les huiles essentielles (Calo *et al.*, 2015) qui peuvent influencer l'activité biologique de quelques substances actives. De l'autre part à la faible concentration de l'huile essentielle utilisée (Boussaada *et al.*, 2008).

Enfin, il est à noter que le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité antimicrobienne des HEs car les différents constituants ne diffusent pas tous de la même manière dans le milieu gélosé (Hulin *et al.*, 1998).

b. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'activité antibactérienne des HEs des différentes parties de *D. aristidis* a été confirmée par le dosage de bouillon de micro dilution. La valeur de CMI la plus faible est obtenue à partir de l'huile des feuilles de *D. aristidis* (4.64 mg/ml) contre *S. aureus* (Tableau 7). Ce résultat concorde avec le diamètre d'inhibition obtenu pour cette espèce dans la méthode de diffusion. Cette huile a également montré un effet antibactérien contre *E. coli* avec une CMI de 5.90 mg/ml (Figure 31). Il convient de noter que la concentration la plus élevée testée (70 mg/ml) n'a eu aucun effet sur la croissance de *P. aeruginosa*, *A. niger* et *F. oxysporum*.

Tableau 7 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *D. aristidis* par la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

microorganismes	CMI (mg/ml)			
	<i>D. aristidis</i> PA	<i>D. aristidis</i> T	<i>D. aristidis</i> Fe	<i>D. aristidis</i> Fl
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12.72	11.66	5.90	7.72
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	14	6.56	4.64	6.07
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>70	>52.5	>32.5	>42.5
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	>70	>52.5	>32.5	>42.5
<i>A. niger</i> 2CA936	>70	>52.5	>32.5	>42.5
<i>F. oxysporum</i>	>70	>52.5	>32.5	>42.5

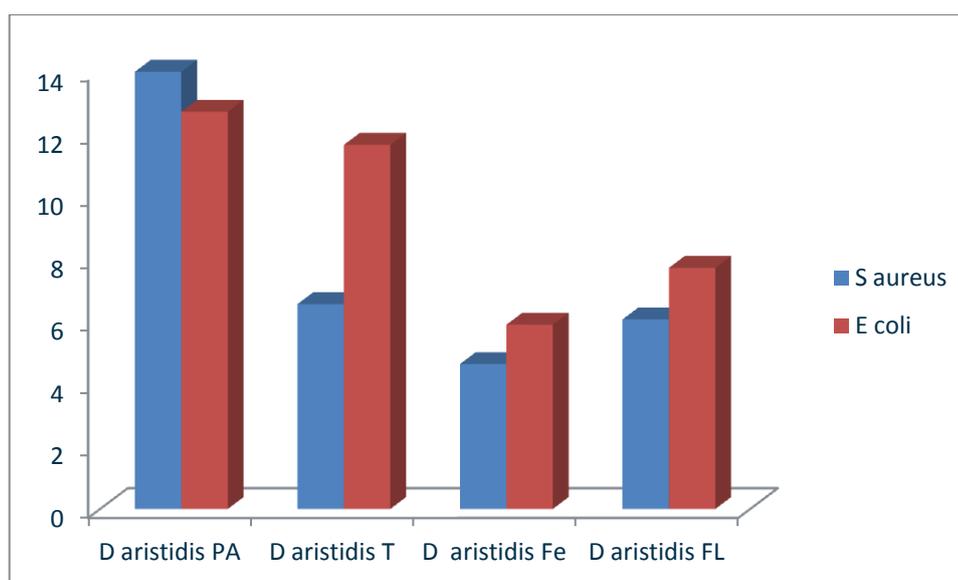


Figure 31 : CMI des huiles de *D. aristidis* vis-à-vis *S. aureus* et *E. coli*

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis des huiles testées, nous constatons que l'efficacité de ces huiles diffère d'une bactérie à une autre. *P. aeruginosa* est la plus résistante, cependant, *S. aureus* est la plus sensible aux huiles testées. Ces résultats sont en accord avec la littérature selon lesquelles les bactéries à Gram+ montrent la plus grande sensibilité par rapport aux bactéries à Gram – (Russel, 1999; Burt, 2004; De Souza *et al.*, 2005; Holley et Patel, 2005; Bakkali *et al.*, 2008). Le mode d'action principal des HES

consiste en la lyse de la paroi bactérienne du fait de leurs propriétés lipophiles (Figure 31). Chez les bactéries à Gram -, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes (Nikaido, 2003) alors que les bactéries à Gram+ sont moins protégées parce que la paroi est formée d'une couche de peptidoglycane seulement qui n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50 KD. Les antibiotiques sont, également, plus actifs sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram - (Hogan et Kolter, 2003 ; Perry *et al.*, 2004).

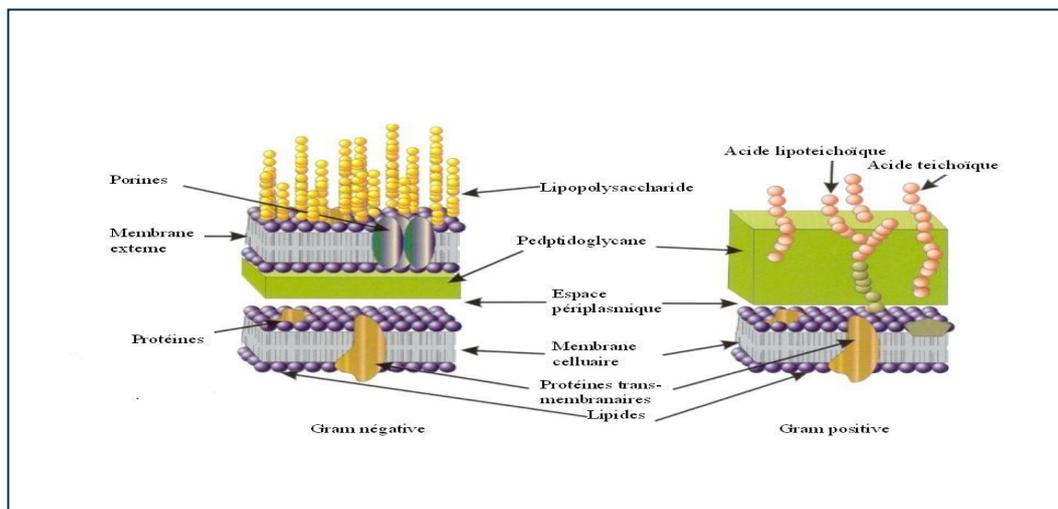


Figure 32 : Structure de la paroi bactérienne (Maier, 2000)

Hajji *et al.* (2010) ont montré que la présence de monoterpènes oxygénés, des hydrocarbures monoterpéniques et des aldéhydes dans les HEs ont la capacité d'inhiber le processus de la respiration et la circulation des ions et par conséquent la destruction de la cellule bactérienne. De ce fait l'activité antibactérienne des huiles des différentes parties de *D. aristidis* peut être due à la quantité élevée des monoterpènes tels que l' α -pinène qui est entre 43,5% et 74,1% ainsi qu'à l'effet d'interaction entre les différents constituants de l'huile. Il est aussi connu que les souches bactériennes n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y a une reprise de la croissance bactérienne (Zaibet, 2016). Belaiche (1979) rapporte également qu'un germe dont le pouvoir pathogène est élevé, offre des résistances quasi constantes. Plus le germe est virulent, plus ses chances de résistances aux essences sont grandes.

****Achillea santolinoides***

a-méthode de diffusion sur gélose

L'activité antimicrobienne des HEs des différentes parties d'*A. santolinoides* évaluées par la méthode de diffusion sur gélose (Tableau 8 et Figure 33) a permis de révéler une activité limitée sur la croissance de *S. aureus*, *E. coli* et *B. cereus* avec des diamètres d'inhibition entre (11.5 et 12mm), (8-10.5mm) et (8-9mm), respectivement à la dilution 1/2. Alors que leurs activité vis-à-vis *P. aeruginosa*, *A. niger* et *F. oxysporum* a été nulle à l'encontre de toute les dilutions testées.

Tableau 8 : Diamètres d'inhibition des huiles d'*A. santolinoides* à l'encontre des microorganismes testés

plantes microorganismes	Diametre d'inhibition en mm								
	<i>A.santolinoides</i> PA			<i>A.santolinoides</i> Fe			<i>A. santolinoides</i> Fl		
	dilutions								
	1/10	1/5	1/2	1/10	1/5	1/2	1/10	1/5	1/2
<i>E.coli</i> ATCC 25922	6±0.5	7±0.28	8±0.28	9±0.28	10±0.28	10.5±0.57	9±0.5	9.5±0.28	10±0.57
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	10±0.76	11±0.57	12±0.57	9.5±0.28	10±0.28	11.5±0.76	10±0.28	11±0.57	12±0.28
<i>P,aeruginosa</i> ATCC 27853	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
<i>B,cereus</i> ATCC 10876	6±0.57	7±0.57	8±0.76	7±0.62	7.5±0.47	8±0.62	7±0.47	8±0.62	9±0.47
<i>A,niger</i> 2CA936	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0
<i>F,oxysporum</i>	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0	6±0.0

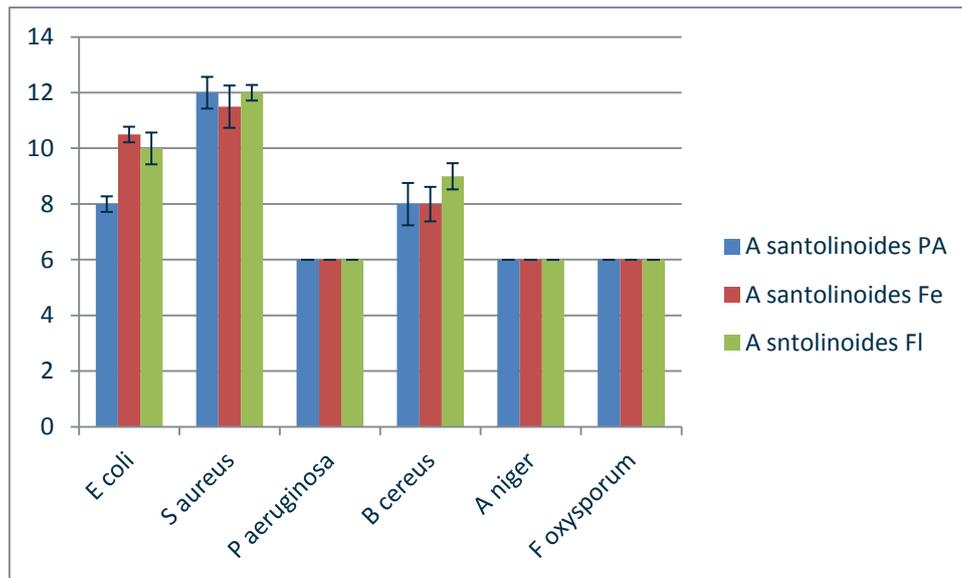


Figure 33: La sensibilité des micro-organismes à l'encontre d'*A. santolinoides* à la dilution 1/2.

Cette étude, selon la bibliographie, est la première réalisée sur les huiles des différentes parties d'*A. santolinoides*.

S. aureus semble être la plus sensible aux huiles d'*A. santolinoides* avec des diamètres entre (11.5mm et 12mm). Une valeur proche de 12.8mm a été trouvée par **El-Kalamouni et al. (2017)** en étudiant l'huile d'*Achillea millefolium* originaire de la France. De même, **Mneimne et al. (2016)** ont trouvé un diamètre de 11.8 mm pour l'huile d'*Achillea kotschy* subsp *kotschy*. Une valeur similaire a été obtenue par **Stojanovic et al., (2005)** pour l'huile d'*Achillea holosericea* à l'encontre de *S. aureus*. Cependant cette même équipe a trouvé un diamètre plus faible de 9.2 mm pour l'huile d'*Achillea clavennae*. D'autres auteurs ont également trouvé des diamètres faibles (**Candan et al., 2003; Bekhechi et al., 2011; Issabeagloo et al, 2012**). Toutefois, l'huile d'*Achillea millefolium* d'Iran s'est avérée très active vis-à-vis *S. aureus* (31.4mm) en utilisant la méthode de puits (**Mazandarani et al., 2013**).

Les huiles d'*A. santolinoides* sont moins actives à l'encontre d'*E. coli* avec des diamètres entre 8-10.5mm. Une activité similaire est obtenue en évaluant l'huile d'*A. holosericea* (10.3mm) (**Stojanovic et al., 2005**). Cependant d'autres auteurs ont signalé la résistance de cette souche vis-à-vis plusieurs espèces d'*Achillea* (**Candan et al.,2003; Mneimne et al., 2016 ; El-Kalamouni et al., 2017**). Toutefois, l'huile d'*Achillea odorata* (**Bekhechi et al., 2011**), l'huile d'*Achillea millefolium* (**Mazandarani et al., 2013**), l'huile d'*Achillea*

clavennae (Stojanovic *et al.*, 2005) et les huiles d'*Achillea collina* et d' *Achillea pannonica* (Bozin *et al.*, 2008) se sont avérées sensibles avec des valeurs variant entre (12mm – 17mm).

B. cereus a été la moins sensible aux huiles d'*A. santolinoides* (entre 8mm -9mm) mais plus sensible a l'huile d'*Achillea millefolium* d'Iran selon (Mazandarani *et al.*, 2013). De même, El-kalamouni *et al.* (2017) ont confirmé cette bioactivité avec l'huile d'*Achillea millefolium* de la France.

Les huiles d'*A. santolinoides* possèdent une quantité élevée des monoterpènes oxygénés (86.2% - 87%) ce qui peut expliquer leurs activités antimicrobiennes. Cette activité peut être attribuée en particulier aux composants majoritaires de l'huile d'*A. santolinoides* : le camphre (60.8% - 62%) et le 1-8 cinéole (14.1% - 15.7%) qui se sont révélés avoir une activité antimicrobienne prononcée (Mneimne *et al.*, 2016). Cependant, l'activité biocide des composés purs de 1-8 cinéole, *p*-cymène et du camphre a été signalée comme nettement plus faible que l'huile essentielle complet d'*Achillea biebersteinii* suggérant que les composés mineurs peuvent probablement être les principes actifs responsables de certaines bioactivités (Tabanca *et al.*, 2001 in Mneimne *et al.*, 2016) Il est également possible que des composés mineurs agissent ensemble en synergie pour contribuer à la bioactivité de la totalité des huiles essentielles (Lahlou, 2004). Néanmoins, l'antagonisme entre les constituants ne doit pas être exclu lors de l'évaluation des bioactivités des huiles (Nemeth et Bernath, 2008). En effet, Bozin *et al.* (2008) ont rapporté que la présence du Chamazulene dans l'huile de *Millefolii herba* augmente son activité antimicrobienne. Ce composant est totalement absent dans les huiles testées.

Concernant *Pseudomonas aeruginosa*, cette bactérie est connue pour sa résistance à la plupart d'agent antimicrobien. En réalité, ce comportement n'est pas étonnant parce que *P. aeruginosa* a une capacité de former un biofilm (une organisation complexe composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se retrouvent en conditions physiologiques spécifiques a leur situation) (Abi-Ayad *et al.*, 2011).

b- Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Comme le montre le tableau 9, les résultats les plus prometteurs étaient obtenus à partir de l'huile de la partie aérienne d'*A. santolinoides* qui avait la valeur de la CMI la plus faible (3.12 mg/ml) contre *S. aureus* cette valeur concorde avec le diamètre d'inhibition qui était le plus élevée dans la méthode de diffusion et montre encore une fois la sensibilité de *S. aureus*

à l'huile d'*A. santolinoides*. Cette huile a également montré un effet antimicrobien contre *E. coli* et *B. cereus* avec une CMI (4.46 mg/ml et 5.20 mg/ml), respectivement (Figure 34). Il convient de noter que la concentration la plus élevée testée (32.5 mg/ml) n'a eu aucun effet sur la croissance de *P. aeruginosa*, *A. niger* et *F. oxysporum*.

Tableau 9 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*A. santolinoides* par la méthode de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

microorganismes	CMI (mg/ml)		
	<i>A.santolinoides</i> PA	<i>A.santolinoides</i> Fe	<i>A.santolinoides</i> Fl
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5.55	4.64	4.46
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3.12	4.33	3.90
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>25	>32.5	>31.25
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	5.55	5.41	5.20
<i>A.niger</i> 2CA936	>25	>32.5	>31.25
<i>F. oxysporum</i>	>25	>32.5	>31.25

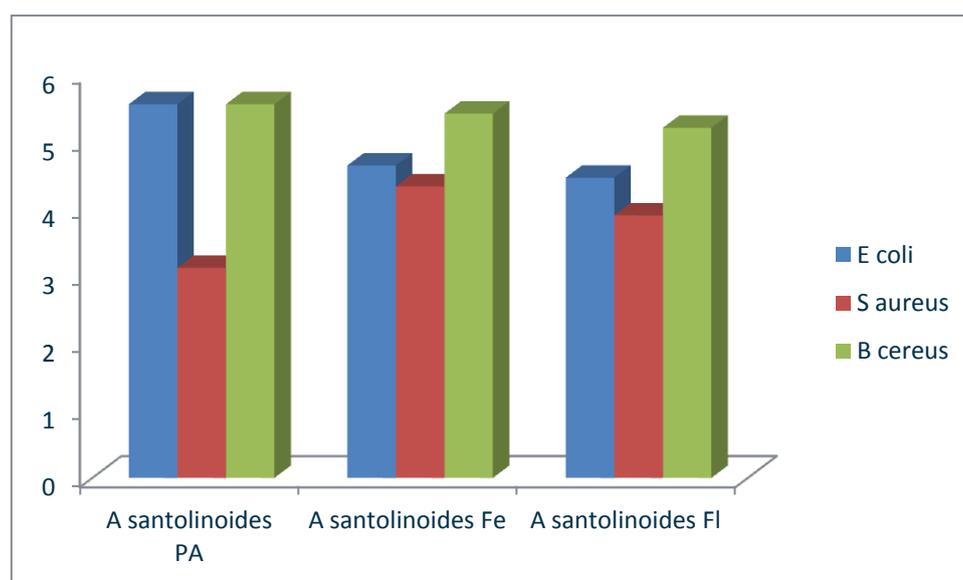


Figure 34 : CMI des huiles d'*A. santolinoides* vis-à-vis *E. coli*, *S. aureus* et *B. cereus*

L'activité antimicrobienne des HEs a été signalée comme étant liée spécifiquement à la présence de composés antimicrobiens. Récemment, des tentatives ont été faites pour identifier les composés responsables d'une telle bioactivité. Les molécules oxygénées qui entrent dans la composition des huiles essentielles sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées qui sont par contre connues pour leurs faibles pouvoirs antimicrobiens (**Kalemba et kunicka, 2003**).

Les composés des HEs à activité antimicrobienne agissent par plusieurs mécanismes. Leur premier site d'action sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique. Les composés phénoliques sont reconnus toxiques et auraient pour cible les enveloppes des microorganismes telles que la membrane plasmique et la paroi (**Weber et al., 1996**). Certains agents antimicrobiens détruisent la membrane plasmique de manière irréversible conduisant ainsi à la mort cellulaire par un processus lytique (**Denyer et Hugo, 1991 ; Hamouda et Baker, 2000; Song et Kim, 2003; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006**). D'autres agents ne lysent pas les cellules bactériennes mais compromettent l'intégrité structurale de la membrane plasmique en induisant une perte du matériel cytoplasmique (**Carson et al., 2002 ; Reichling et al., 2002**).

IV.4. Activité antioxydante :

Le pouvoir anti oxydant des huiles essentielles a été évalué par deux méthodes différentes : le test du DPPH et le test de blanchiment du β -carotène/acide linoléique.

IV.4.1. Le Test du DPPH

Les pourcentages d'inhibition des différentes huiles essentielles sont présentés dans le tableau 10 et les résultats de l'activité antioxydante des HEs de *D. arididis* et *A. santolinoides* sont présentés avec la molécule de référence (le BHT) par les figures 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 et 44.

Tableau 10: Les pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides*.

Echantillons	Pourcentage d'inhibition (I%)
<i>D. aristidis</i> partie aérienne	23.97±1.58
<i>D. aristidis</i> tiges	44.01±2.19
<i>D. aristidis</i> feuilles	65.95±1.50
<i>D. aristidis</i> fleurs	75.75±1.40
<i>A. santolinoides</i> partie aérienne	34.19±2.79
<i>A. santolinoides</i> feuilles	27.37±1.44
<i>A. santolinoides</i> fleurs	25.98±1.17
BHT	92.76±2.14

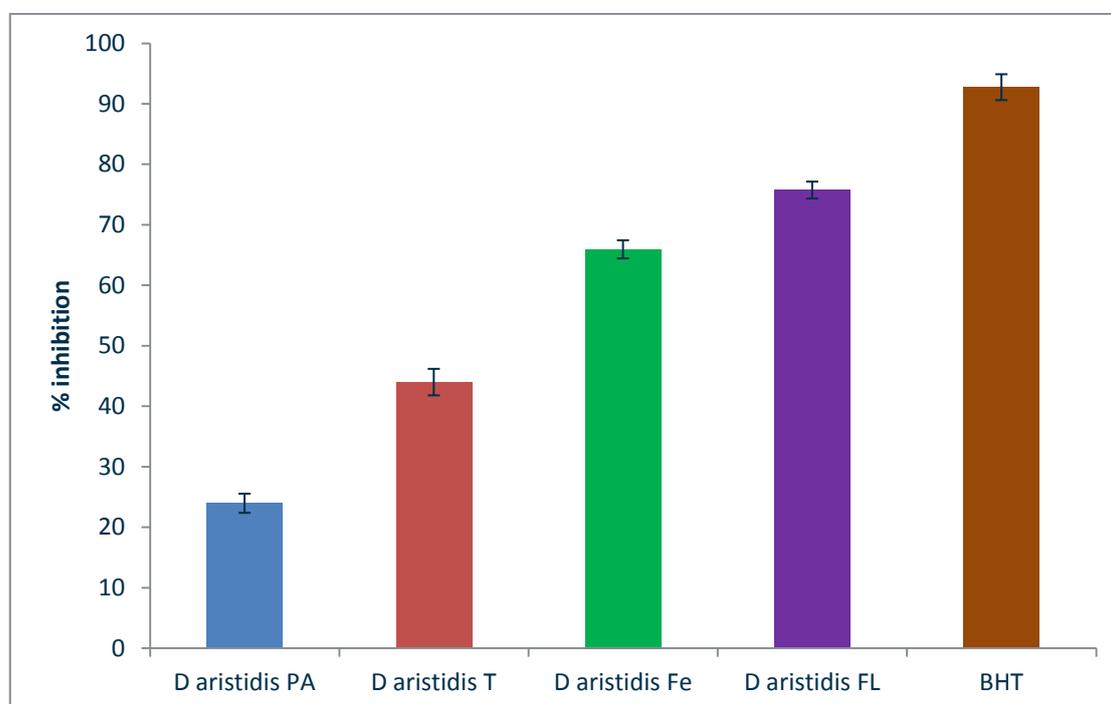


Figure 35 : Les pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles de *D. aristidis*

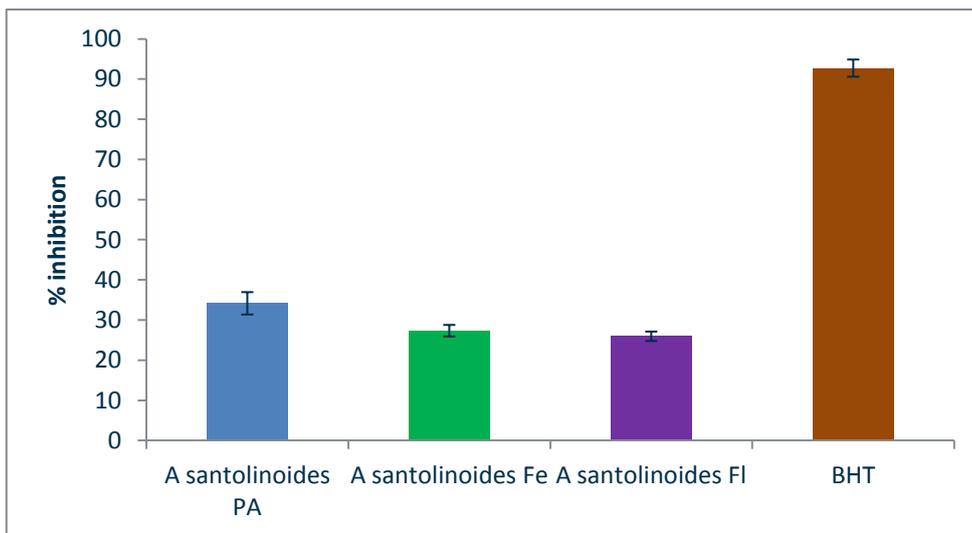


Figure 36 : Les pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles d'*A. santolinoides*

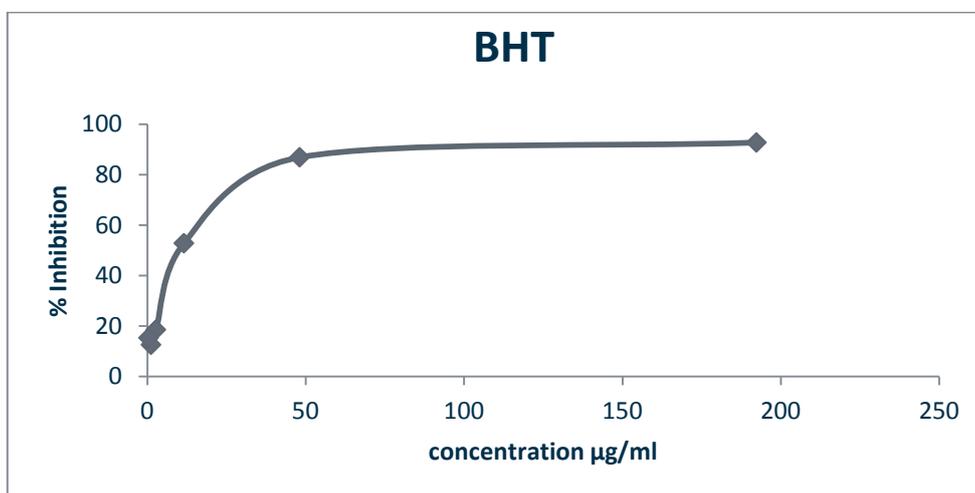


Figure 37 : Courbe de l'activité antioxydante du BHT (référence)

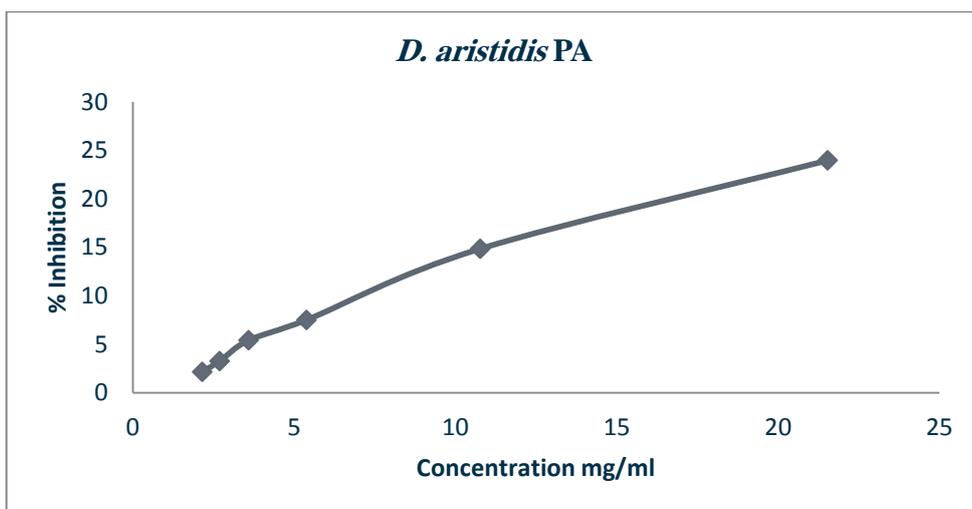


Figure 38 : Courbe de l'activité antioxydante de la partie aérienne de *D. aristidis*

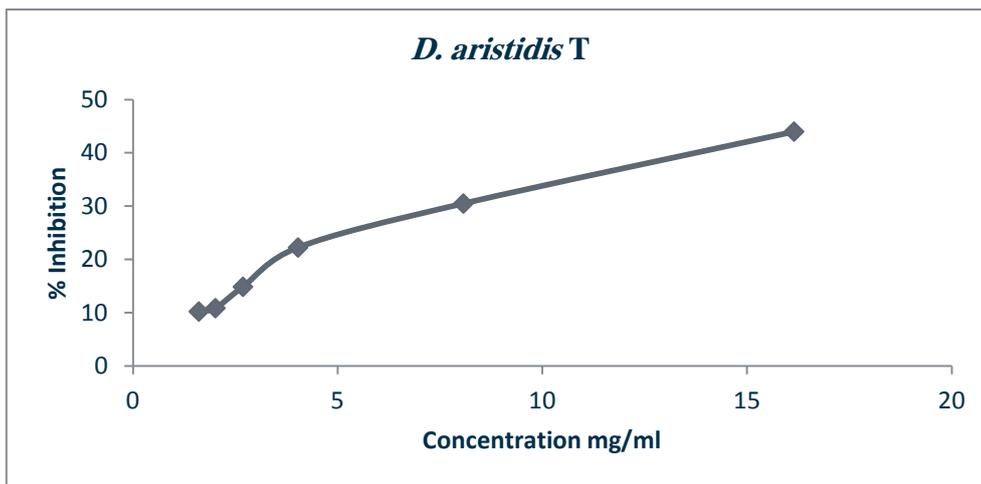


Figure 39 : Courbe de l'activité antioxydante des tiges de *D. aristidis*

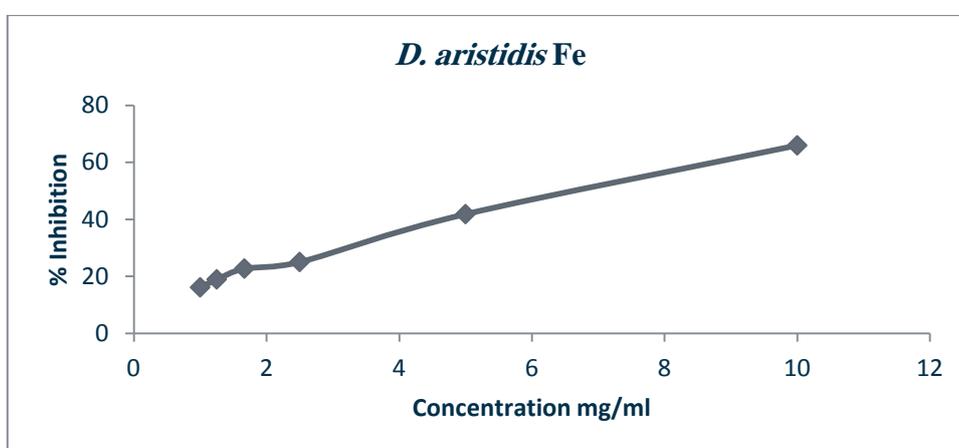


Figure 40 : Courbe de l'activité antioxydante des feuilles de *D. aristidis*

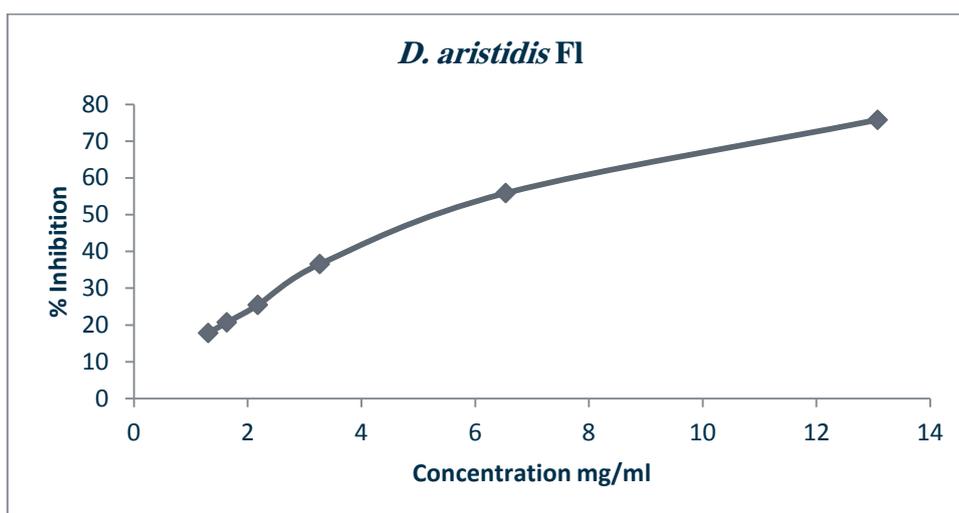


Figure 41 : Courbe de l'activité antioxydante des fleurs de *D. aristidis*

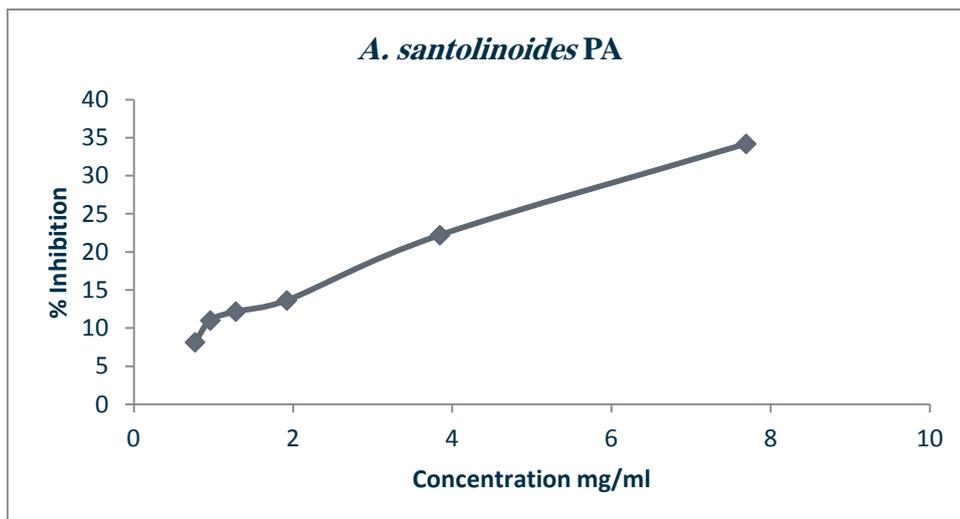


Figure 42 : Courbe de l'activité antioxydante de la partie aérienne d'*A. santolinoides*

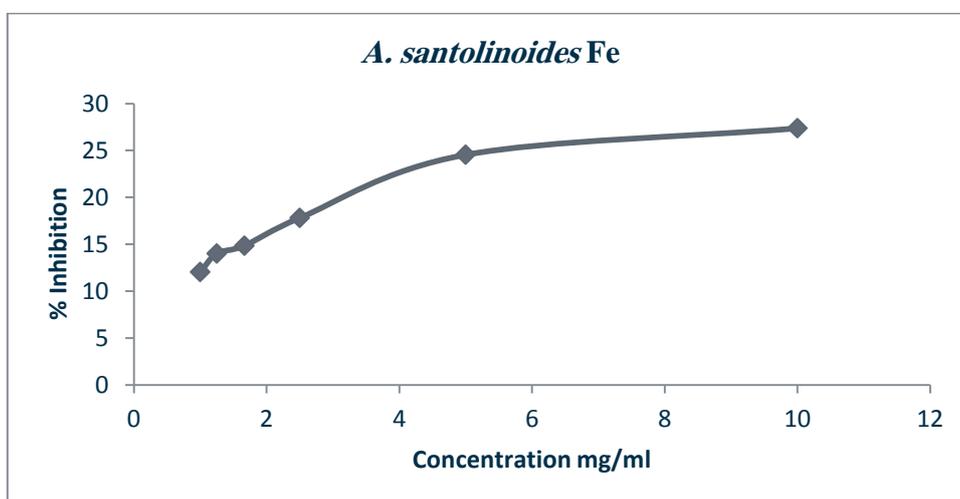


Figure 43 : courbe de l'activité antioxydante des feuilles d'*A. santolinoides*

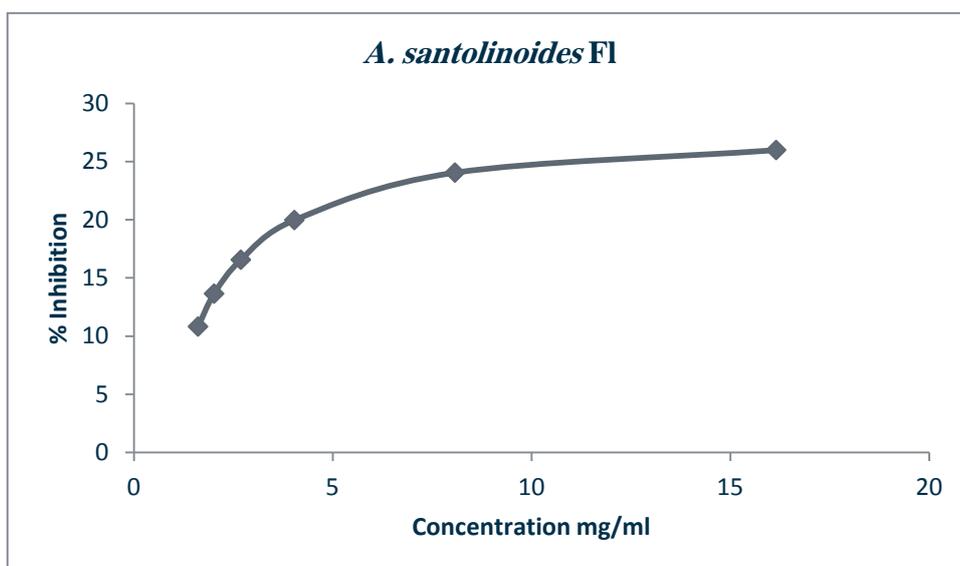


Figure 44 : Courbe de l'activité antioxydante des fleurs d'*A. santolinoides*

L'effet antioxydant des HEs est dose-dépendant, l'augmentation de la concentration des huiles de *Daucus* et d'*Achillea* a fait augmenter le pourcentage d'inhibition.

L'huile des fleurs de *D. aristidis* présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé ($75.75 \pm 1.40\%$) suivi de l'huile des feuilles de la même plante ($65.95 \pm 1.50\%$) mais ces valeurs restent comme même plus faible que le BHT ($92.76 \pm 2.14\%$). Cependant les huiles de la partie aérienne et de la tige de *D. aristidis* ainsi que les huiles des différentes parties d'*A. santolinoides* (partie aérienne, feuilles et fleurs) ont présenté les plus faibles pourcentages d'inhibition.

De Martinoa et al. (2009) ont étudié l'activité antioxydante de plusieurs plantes de la famille des Apiacées et ont trouvé que des plantes tel que *Pimpinella anisum* possède une activité antioxydante faible (le pourcentage d'inhibition = 19%) d'autres moyenne tel que *Foeniculum vulgare* (32.3%) et *carum carvi* (54%), cela peut être dû au constituant majeur de l'huile essentielle. De même, de nombreuses études ont montré que les activités biologiques des huiles essentielles des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique (**Zaibet, 2016**). Aussi, un certain nombre d'études sur les activités antioxydantes des HEs de diverses plantes aromatiques ont indiqué que l'huile essentielle d'Origan, riche en thymol et en carvacrol a un effet antioxydant considérable sur le procédé de l'oxydation (**Kulisic et al., 2004**).

Des études antérieures ont également révélé que l'activité antioxydante des HEs peut être attribuée aux activités synergiques des composés insaturés multiformes tels que le limonène et l' α -pinène (**Wang et al., 2008 ; Zhu et al., 2013**). Ce dernier, est le composant majoritaire des huiles de *Daucus* et représente entre (55.5% et 53.5%) ce qui peut expliquer l'activité antiradicalaire des huiles des fleurs et des feuilles de *D. aristidis*. toutefois, la faible activité antioxydante est attribuée aux monoterpènes hydrocarbonés qui sont incapable de donner l'atome d'hydrogène au radical DPPH et faiblement soluble dans le milieu réactionnel qui utilise le méthanol ou l'éthanol comme solvant (**Andrade et al., 2013**). Il semble alors que la faible activité antioxydante des huiles de la partie aérienne et de la tige de *D. aristidis* est liée aux monoterpènes hydrocarbonés qui constituent 95.8% et 56.5% respectivement. D'autre part, la majeure partie des huiles des différentes parties d'*A. santolinoides* est composée de

monoterpènes oxygénés (entre 86.2% et 87%) ce qui peut être la cause de leur faible activité antioxydante d'après ce qui a été rapporté par **(Ruberto et Bratta, 2000)**.

Selon **Odak et al. (2015)**, la faible activité antioxydante de l'huile de lavande est due à l'1,8-cinéole, au camphre et à l' α -pinène représentant plus de 75% du contenu total. **Dawidowicz et Olszowy (2014)** ont aussi montré que le camphre, l'un des principaux composants de l'huile essentielle de sauge (*Salvia hispanica*) à une capacité antioxydante inférieure à celle de l'huile essentielle. D'autre part, **Zengin et Baysal (2014)** ont testé le 1,8-cinéole et ont montré une activité antioxydante faible en utilisant un dosage de FRAP et presque aucune inhibition du radical DPPH. Donc la faible activité antioxydante des huiles de la partie aérienne, des feuilles et des fleurs d'*A. santolinoides* pourrait être attribué à leurs teneurs élevées en : camphre, 1-8 cinéole et α -pinène qui constituent (78.3% - 77.9% -78.4%), respectivement du contenu total des huiles.

IV.4.2. Le test du blanchiment du β -carotène/acide linoléique

L'activité inhibitrice de la peroxydation des lipides par les HEs a été évaluée par l'essai du blanchiment du β -carotène qui est fondé sur la perte de la couleur orange du β -carotène due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation d'acide linoléique dans une émulsion. La présence de différents antioxydants peut gêner l'ampleur du blanchiment du β -carotène en neutralisant le radical libre du linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système **(Ghedadba et al., 2014)**.

Les résultats de l'activité antioxydante des différentes parties des huiles de *D. aristidis* et *A. santolinoides* (Tableau 11 et Figures 45 et 46) montrent que ces huiles possèdent un faible potentiel antioxydant d'où le pourcentage d'inhibition du β -carotène était entre $24.74 \pm 1.55\%$ et $38.87 \pm 2.55\%$ seulement contrairement au pourcentage d'inhibition du BHT qui allait jusqu'à $94.34 \pm 2.4\%$.

Tableau 11 : Pourcentages d'inhibition du β -carotène par les huiles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides*

Echantillons	Pourcentage d'inhibition %
<i>D. aristidis</i> (partie aérienne)	34.09 ± 2.14
<i>D. aristidis</i> tiges	24.74 ± 1.55
<i>D. aristidis</i> feuilles	27.44 ± 1.38

<i>D. aristidis</i> fleurs	38.87±2.55
<i>A.santolinoides</i> (partie aerienne)	28.79±1.50
<i>A.santolinoides</i> feuilles	30.14±2.31
<i>A. santolinoides</i> fleurs	36.17±2.79
BHT	94.35±2.4

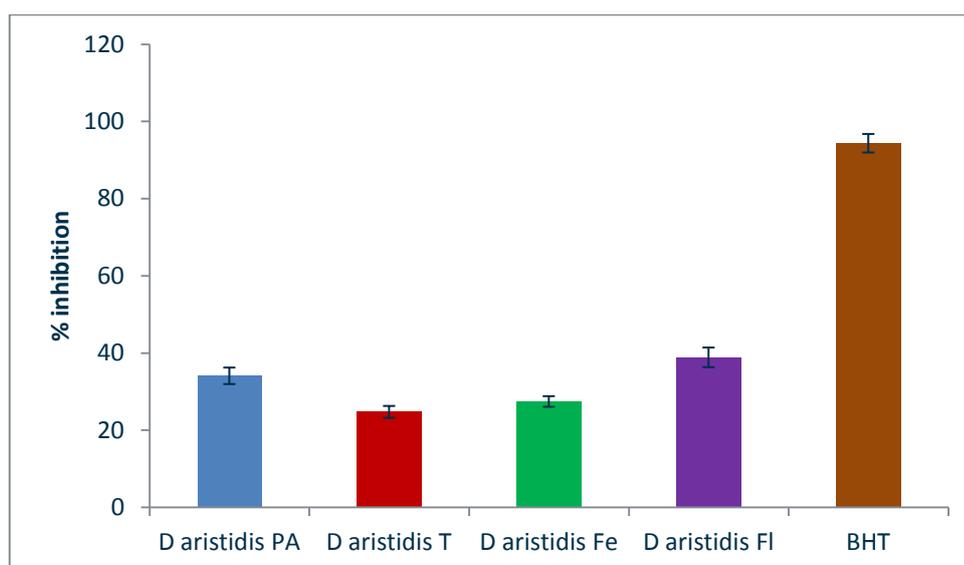


Figure 45 : Les pourcentages d'inhibition du β -carotène par les huiles de *D. aristidis*

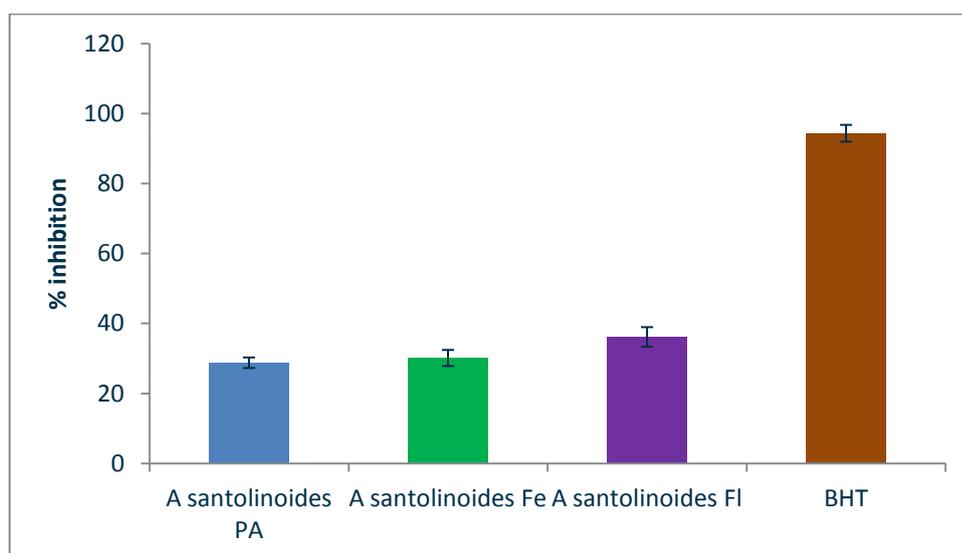


Figure 46 : Les pourcentages d'inhibition du β -carotène par les huiles d'*A. santolinoides*

En général, Il est très difficile d'attribuer l'effet antioxydant des huiles essentielles à un ou à quelques constituants majoritaires parce qu'une huile essentielle contient toujours un mélange de différents composés chimiques. En plus des composants majeurs, les molécules mineures peuvent contribuer à l'activité de l'huile essentielle (**Okoh et al., 2011**). Par conséquent, l'activité antioxydante de nos huiles peut être due à l'activité synergique ou antagoniste des composants majeurs et mineurs de ces huiles.

De même, **Kadri et al. (2011)**, ont rapporté que la faible activité antioxydante des huiles essentielles est attribuée à la présence de 1-8 cinéole, α -pinène et β -pinène qui sont parmi les constituants majeurs de nos huiles. Ainsi qu'à l'absence des composés phénoliques (**Elzaawely et al., 2007 ; Amiri et al., 2010**).

IV.5. Activité anticholinestérase

Les HEs ont été testées pour leurs activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et du butyrylcholinestérase (BChE) *in vitro* par la méthode d'Ellman à une concentration de 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Les huiles essentielles semblent avoir un effet inhibiteur modéré contre les deux enzymes par rapport à celui de la galanthamine (composé de référence) (Tableau 12 et Figure 47). L'huile de *D. aristidis* de la région de Boussaàda a montré une activité modérée contre AChE et BChE (61.75% et 56.79%, respectivement), tandis que les huiles de la partie aérienne, des tiges, des feuilles et des fleurs de *D. aristidis* de Ghoufi ont montré une activité faible à modérée contre AChE et BChE.

Tableau 12 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et de la BChE par les huiles de *D.aristidis* de la région de Ghoufi et de Bousaàda.

plantes	Inhibition de L'Acétylcholinestérase 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Inhibition de la Butyrylcholinestérase 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
<i>D. aritidis</i> Partie aérienne (Ghoufi)	51.00 \pm 0.58	41.46 \pm 2.33
<i>D. aristidis</i> tiges (Ghoufi)	34.69 \pm 1.51	22.32 \pm 0.89
<i>D. aristidis</i> feuilles (Ghoufi)	13.44 \pm 1.46	23.70 \pm 0.95
<i>D. aristidis</i> fleurs (Ghoufi)	33.07 \pm 3.64	30 \pm 2.82

<i>D. aristidis</i> (Boussaàda)	61.75±5.08	56.79±2.95
Gаланthamine (ref)-100 µg/ml	94.48±3.81	92.25±0.86

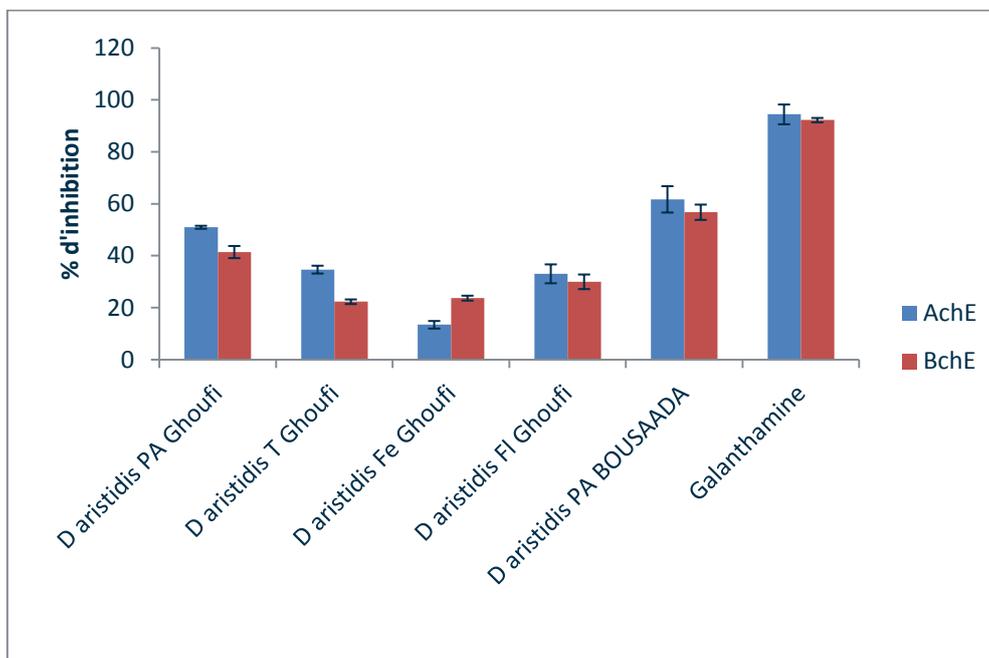


Figure 47 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et la BChE par les huiles essentielles de *D. aristidis* de la région de Ghoufi et de Bousaàda.

L'activité inhibitrice modérée de l'AChE des HES de *D. aristidis* pourrait être due à l'activité de ses composants individuels, l' α -pinène et le β -pinène. Selon **Perry et al. (2000)**, l'étude de l'inhibition *in vitro* de l'AChE des érythrocytes humains par l'huile essentielle de *Salvia lavandulaefolia* et ses principaux monoterpènes a montré que l' α -pinène, le 1-8 cinéole et le camphre sont les inhibiteurs réversibles compétitifs de l'AChE. En outre, l'activité anti-AChE de l'huile des fleurs d'*Artemisia annua* a été principalement attribuée à l' α -pinène, au β -pinène, au limonène, au 1-8 cinéole, au camphre, au borneol, à l' α -terpinéol, à l' α -caryophyllène et à l' α -oxyde de caryophyllène (**Yu et al., 2011**). Dans une autre étude, **Miyazawa et Yamafuji (2005)** ont montré que l' α -pinène et le 3-carène sont des inhibiteurs puissants de l'AChE. De même, **Kim et al. (2013)** ont décrit que l' α -pinène avait l'activité d'inhibition de l'AChE la plus forte suivie par le β -pinène et le limonène sur les adultes du

charançon de riz *Sitophilus oryzae*. De même, **Politeo et al. (2011)** ont constaté une activité inhibitrice de l'AChE relativement élevée de l'huile essentielle de *Pinus nigra* subsp. *dalmatica* qui pourrait s'expliquer par l'activité inhibitrice marquée de ses composants principaux, l' α et le β -pinène. D'autre part, **Orhan et al. (2008)** ont suggéré que l'activité inhibitrice des extraits des plantes ou des huiles essentielles ne doit pas nécessairement être attribuée à un seul composé mais peut aussi dépendre de plusieurs composés qui agissent de manière synergique, ou des composés qui se régulent les uns les autres parce que les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composants qui montrent des activités généralement plus élevées que leurs composants isolés; leurs activités finales peuvent être dues aux effets combinés de plusieurs composants mineurs.

L'activité anticholinestérase des huiles essentielles des différentes parties d'*A. santolinoides* vis-à-vis les deux enzymes est faible par rapport à celle de la galanthamine (Tableau 13 et Figure 48). L'huile des fleurs d'*A. santolinoides* n'a révélée aucune activité contre l'AChE à la concentration 100 $\mu\text{g/ml}$ et un pourcentage d'inhibition très faible de 6.12% contre la BChE. Les huiles de la partie aérienne et des feuilles d'*A. santolinoides* ont également donnée des valeurs très faibles vis-à-vis les deux enzymes entre (3.05% et 12.17%, respectivement).

Tableau 13 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et de la BChE par les huiles d'*A. santolinoides*

plantes	Inhibition de l'Acétylcholinestérase 100 $\mu\text{g/ml}$	Inhibition de la butyrylcholinestérase 100/ml
<i>A.santolinoides</i> partie aérienne	12.17 \pm 3.00	9.11 \pm 1.63
<i>A.santolinoides</i> feuilles	3.05 \pm 0.36	10.81 \pm 2.49
<i>A.santolinoides</i> fleurs	-	6.12 \pm 1.19
Galanthamine (ref)-100 $\mu\text{g/ml}$	94.48 \pm 3.81	92.25 \pm 0.86

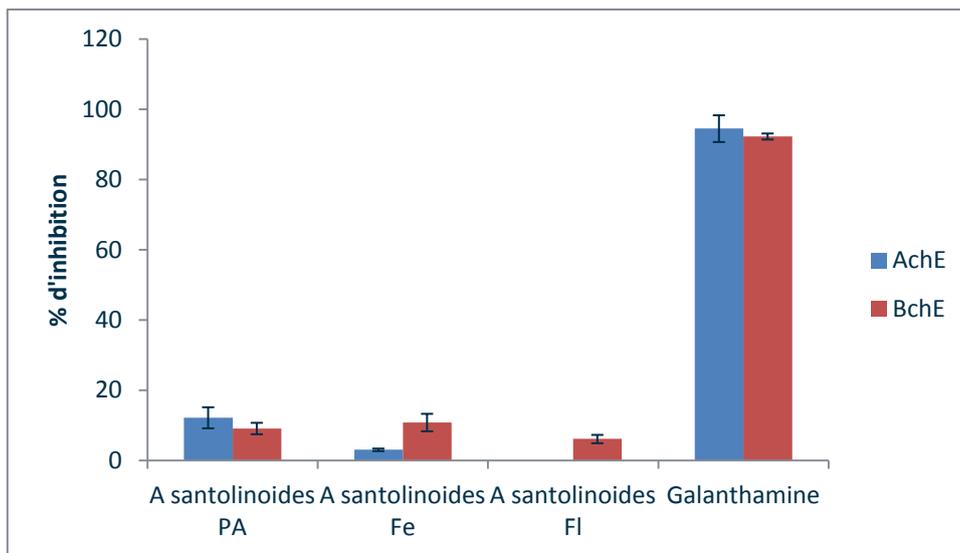


Figure 48 : Les pourcentages d'inhibition de l'AChE et de la BChE par les huiles d'*A. santolinoides*

La faible activité anticholinestérase des huiles d'*A. santolinoides* peut être due à leurs compositions chimiques. Selon **Kunduhoglu et al. (2011)**, l'interaction synergique et antagoniste entre les composants majeurs et mineurs des huiles essentielles peut affecter l'activité anticholinestérase. En outre, les études sur la relation structure – activité des monoterpènes ont montré d'une part, que la présence des fonctions oxygénées dans les monoterpènes bicycliques diminue l'activité inhibitrice de l'AChE (**Aazza et al., 2011**), et d'autre part, la présence de ces fonctions oxygénées dans les sesquiterpènes augmente cette activité inhibitrice (**Miyazawa et al., 2001**). Les huiles d'*Achillea* testées ne contiennent pas de sesquiterpènes en plus de leurs richesses en monoterpènes oxygénés (86.2%-87%) ce qui semble être la cause de leurs faibles effets inhibiteurs. Il a été également rapporté que la combinaison entre le camphre et le 1-8 cinéole provoque un antagonisme et peut engendrer une faible activité anticholinestérase (**Savelev et al., 2003**), ces derniers, sont les composants majeurs des huiles d'*Achillea* ce qui peut expliquer cette faible activité.

VI.6. Activité insecticide

Les résultats du test de toxicité des huiles essentielles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides* par contact vis-à-vis de *Tribolium confusum* sur papier filtre montrent que le pourcentage de mortalité croît avec la dose pour les deux huiles testées (Tableau 14 et Figure 49). L'huile essentielle d'*A. santolinoides* est la plus active dans la mesure où la dose de 0,39 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ a occasionné une mortalité de 86.95% d'insectes au bout de 24 heures d'exposition, alors que

celle de *D. aristidis* n'a provoqué que 76.92% % de mortalité au bout du même temps et la plus faible DL50 est celle de l'huile d'*A. santolinoides* 0.10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ contre 0.13 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ pour l'huile de *D. aristidis*.

Tableau 14 : Les pourcentages de mortalité de *Tribolium confusum* par les huiles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides*.

Doses ($\mu\text{l}/\text{cm}^2$)	% mortalité <i>D. aristidis</i>	% mortalité <i>A.santolinoides</i>
0.047	16.72	30.10
0.094	46.82	50.16
0.18	66.88	70.23
0.39	76.92	86.95

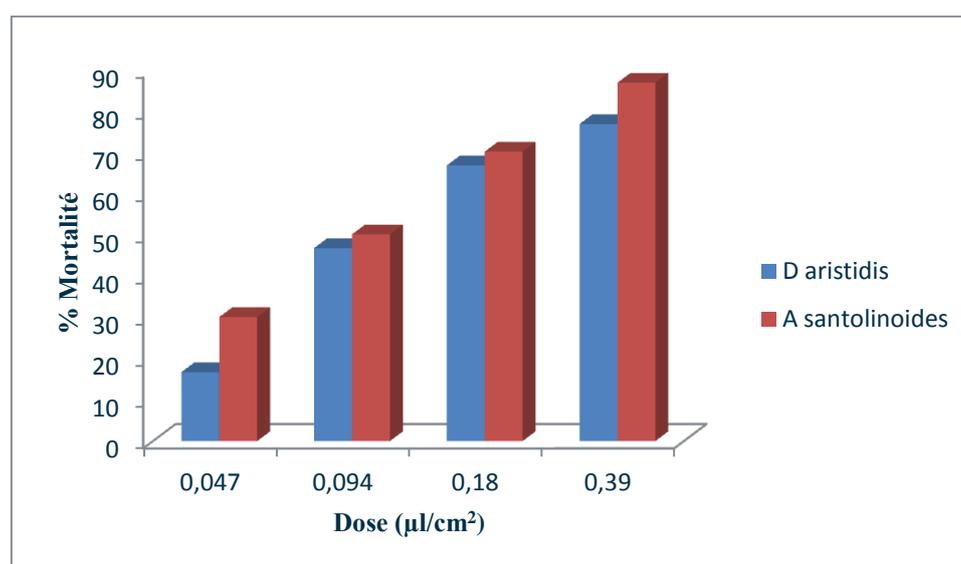


Figure 49 : Les pourcentages de mortalité de *Tribolium confusum* par les huiles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides*.

Dans cette étude, les huiles essentielles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides* se sont révélées toxiques à l'égard de l'insecte *Tribolium confusum*. Ces effets pourraient dépendre de leurs compositions chimiques et du niveau de sensibilité des insectes. En effet, l'huile essentielle de la partie aérienne de *D. aristidis*, contient essentiellement des monoterpènes hydrocarbonés (95.8%) tel que l' α -pinène (74.1%) dont les propriétés insecticides ont déjà été démontrées vis-à-vis *Tribolium confusum* (Ojimelukwe et Alder, 1999). Cependant, l'huile de la partie aérienne d'*A. santolinoides* est constituée principalement de monoterpènes

oxygénés (86.3%) où le camphre représente (60.8%) et le 1-8 cinéole (15.4%) dont leurs propriétés insecticides ont également déjà été démontrées vis-à-vis de *Tribolium confusum* (Obeng-Ofori, 1997 ; Tapondjou *et al.*, 2005). Selon Lee *et al.* (2003), les monoterpènes peuvent pénétrer rapidement dans l'insecte et interférer avec ses fonctions physiologiques. De même, il a été rapporté que cette action rapide des huiles essentielles contre les insectes est due à leurs action neurotoxique (Coats *et al.*, 1991; Abdelgaleil *et al.*, 2009) par inhibition de l'AChE, l'octopamine ou le cytochrome P450 des mono-oxygénases (El-Idrissi *et al.*, 2014). Cependant, il serait difficile de penser que l'activité insecticide de ces huiles se limite uniquement à certains de ses constituants majoritaires; elle pourrait aussi être due à certains constituants minoritaires ou à un effet synergique de plusieurs constituants.

IV.7. Activité anti-inflammatoire

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par application d'un stress externe: comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou une chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes de l'inflammation (Leelaprakash et Mohan Dass, 2010; Bouzid et Zerroug, 2016).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique par les huiles de *Daucus* et d'*Achillea* est comparé à celui du Diclofénac de sodium (référence) (Tableau 15 et Figures 50,51). Les résultats ont montré que ces huiles essentielles possèdent un faible effet inhibiteur en comparaison avec le Diclofénac qui a donné un pourcentage d'inhibition de 91.48%.

Tableau 15 : Les pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique des huiles de *D. aristidis* et d'*A. santolinoides*.

plantes	% Inhibition de la dénaturation protéique
<i>D. aristidis</i> partie aérienne (PA)	31,23±2.58
<i>D. aristidis</i> tiges (T)	32,69±3.04
<i>D. aristidis</i> feuilles (Fe)	26,92±2.14

<i>D. aristidis</i> fleurs (Fl)	39±3.78
<i>A. santolinoides</i> partie aérienne (PA)	22.23±1.96
<i>A. santolinoides</i> feuilles (Fe)	26.85±2.16
<i>A. santolinoides</i> fleurs (Fl)	37.07±3.20
Diclofenac de sodium (référence)	91,48±2.62

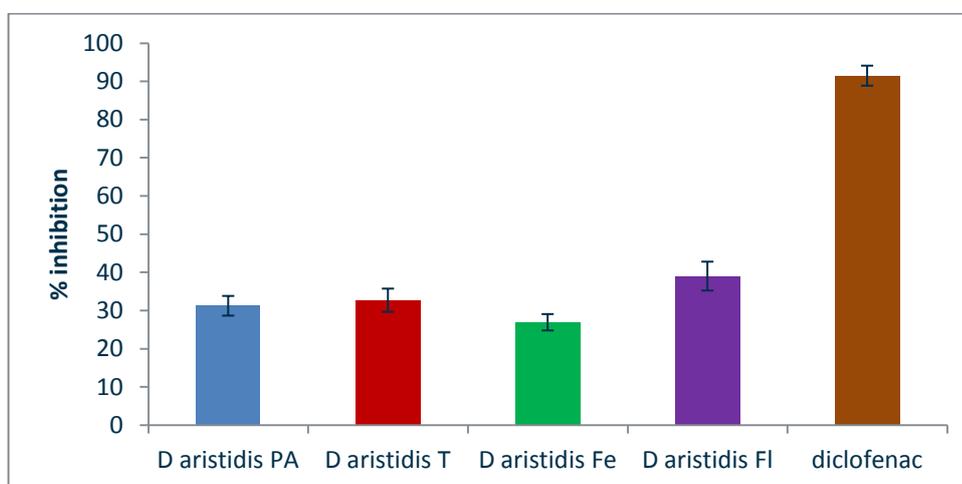


Figure 50 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique par les huiles de *D. aristidis*

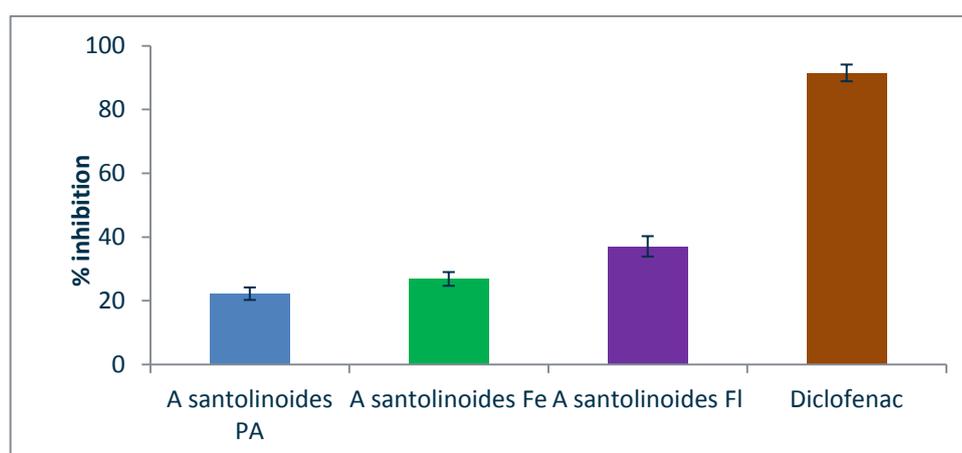


Figure 51 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique des huiles d'*A. santolinoides*

La faible activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être due à leurs compositions chimiques et à l'effet synergique plutôt qu'à l'effet d'un seul constituant. Selon **Bouzid et Zerroug (2016)**, l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don peut être attribuée à sa teneur en polyphénols tels que le thymol, l'eugénol et le 3-isoprpylphenol, ces constituants sont totalement absents dans la composition de nos huiles. De même, **Ndoye Foe et al. (2016)** ont rapporté que le pouvoir inhibiteur des huiles de *Drypetes gossweileri*, *Pentadiplandra brazzeana*, *Allium cepa* et *Allium sativum* est dû à leurs richesses en composés organosulfurés qui ne se présentent pas dans les huiles de *Daucus* et *Achillea* étudiées. Cependant, **Vinodhini et al. (2017)** ont attribué l'activité inhibitrice de la dénaturation de protéines de l'huile de *Citrus sinensis* à sa teneur en terpenoïdes.

CONCLUSION

Conclusion

Cette étude se voulait une contribution à la connaissance phytochimique et à évaluer les potentialités bioactives des huiles essentielles de deux plantes l'une appartenant à la famille des Apiacées (*Ammiopsis aristidis* syn. *Daucus aristidis*) et l'autre appartenant à la famille des Asteracées (*Achillea santolinoides*).

Pour évaluer ces activités on a d'abord commencé par l'analyse chimique des huiles essentielles par GC/MS. Ces analyses ont montré que les principaux constituants de la partie aérienne, des tiges, des feuilles et des fleurs des huiles d' *A. aristidis* de Ghoufi ont été établis comme α -pinène (74,1% - 43,5% - 53,5% - 55,5%) et β -pinène (11,9% - 7,5% 7,8% -8,1%), en plus, les huiles des tiges et des feuilles ont un autre composant majeur qui est le trans-verbenol (10,6% -6,5%) respectivement. Alors que l' α -pinène (49%), le β -pinène (19,2%), le limonène (7,5%), le myrcène (6,7%) et le sabinène (4,3%) étaient les principaux constituants de l'huile d'*A. aristidis* de Boussaada. Les huiles des différentes parties d'*A. santolinoides* sont caractérisés par la présence du camphre (60.8%-62%) et du 1-8 Cinéole (14.1%-15.7%).

En comparant les résultats de l'analyse chimique des deux huiles essentielles avec les résultats obtenus de plusieurs espèces appartenant aux genres étudiés, on a constaté beaucoup de ressemblances et quelques différences qui peuvent être attribuées aussi bien aux facteurs extrinsèques qu'aux facteurs intrinsèques.

En matière d'activité antimicrobienne, les huiles d'*A. aristidis* et d'*A. santolinoides* ont une activité limitée vis-à-vis *S. aureus*, *E. coli* et *B. cereus*. Cependant, elles se sont montrées résistantes à l'encontre de *P. aeruginosa*, *A. niger* et *F. oxysporum*. Ceci est dû à la nature de la composition chimique des huiles. L'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles a été confirmée aussi par la méthode de microdilution. Les résultats les plus prometteurs obtenus est ceux de l'huile des feuilles d'*A. aristidis* et de la partie aérienne d'*A. santolinoides* avec des valeurs CMI de 4.64 mg/ml et de 3.12 mg/ml contre *S. aureus* respectivement.

L'activité antioxydante des huiles d'*A. aristidis* et d'*A. santolinoides* ont été étudiées par le test du radical libre DPPH. L'huile des fleurs d'*A. aristidis* présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé (75.75 \pm 1.40%) suivi de l'huile des feuilles de la même plante (65.95 \pm 1.50%) mais ces valeurs restent comme même plus faible que le BHT (92.76 \pm 2.14%). Cependant les huiles de la partie aérienne et de la tige d'*A. aristidis* ainsi que les huiles des différentes parties d'*A. santolinoides* ont présenté les plus faibles pourcentages d'inhibition.

Les résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*A. aristidis* et d'*A. santolinoides* obtenus par le test du blanchiment du β -carotène montrent que ces huiles possèdent un faible potentiel antioxydant d'où le pourcentage d'inhibition était entre $24.74 \pm 1.55\%$ et $38.87 \pm 2.55\%$ seulement contrairement au pourcentage d'inhibition du BHT qui allait jusqu'à $94.35 \pm 2.4\%$.

En plus de l'effet antimicrobien et l'effet antioxydant, Les huiles essentielles d'*A. aristidis* et d'*A. santolinoides* ont été également testées pour leurs activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et du butyrylcholinestérase (BChE) *in vitro*. L'huile essentielle d'*A. aristidis* de la région de Boussaàda a montré une activité modérée contre AChE et BChE (61.75% et 56.79% , respectivement), tandis que les différentes parties d'*A. aristidis* de Ghoufi ont montré une activité faible à modérée contre AChE et BChE. De même, on a trouvé que l'activité anticholinestérase des huiles des différentes parties d'*A. santolinoides* vis-à-vis les deux enzymes est faible par rapport a celle de la galanthamine.

Les résultats du test de toxicité des huiles essentielles d'*A. aristidis* et d'*A. santolinoides* par contact sur papier filtre contre l'insecte *Tribolium confusum* montrent que l'huile essentielle d'*A. santolinoides* est la plus active avec une mortalité de 86.95% d'insectes au bout de 24 heures d'exposition, alors que celle d'*A. aristidis* n'a provoqué que 76.92% de mortalité au bout du même temps. De même, la plus faible DL50 est celle de l'huile d'*A. santolinoides* $0.10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ contre $0.13 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ pour l'huile d'*A. aristidis*.

Nous avons également estimé le pouvoir d'inhibition de la dénaturation protéique lié au processus de l'inflammation. Les pourcentages d'inhibitions obtenus par les huiles d'*Ammiopsis* et d'*Achillea* sont faibles en comparaison avec le Diclofénac qui a donné un pourcentage d'inhibition de 91.48% .

En conclusion, on peut dire que les huiles essentielles d'*A. aristidis* et d'*A. santolinoides* sont douées d'activités biologiques importantes à des taux similaires. Ces résultats peuvent être approfondis ultérieurement par le fractionnement de ces huiles pour connaître les molécules responsables de ces activités. L'évaluation de leurs cytotoxicité sur des modèles animales ainsi que l'exploitation de ces huiles dans l'industrie agro-alimentaire en substituant les additifs chimiques de conservation par ces additifs naturels. Enfin, l'utilisation de ces huiles comme matière de base pour la formulation de bio-insecticides utilisables dans la

protection des denrées stockées. En plus de l'étude d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés : antivirale, anti-lithiasique et autres.

Références Bibliographiques

References Bibliographiques

- Aazza S., Lyoussi B. and Miguel M. G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*. 16: 7672-7690.
- Abad M.J., Del Olmo L.M.B., Ticona L.A. and Benito P.B. (2012). The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive sesquiterpene sactones. *Studies in natural products chemistry*. (37): 43-65.
- Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A. and Rebiahi S.A. (2011). Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *Journal of Natural Products Plant Resources*. 1(1):33–36.
- Aćimović M., Stanković J., Cvetković M., Ignjatov M. and Nikolić L. (2016). Chemical characterization of essential oil from seeds of wild and cultivated carrots from Serbia *Botanica Serbica*. 40 (1): 55-60.
- AFNOR (1986). Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- AFNOR (1992). Recueil des normes françaises, Huiles essentielles, Paris.
- Alhakmani F., Kumar S. and Khan S.A. (2013). Estimation of total phenolic content, *in-vitro* antioxidant and anti-inflammatory of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(8): 623–627.
- Aliigiannis N., Kalpoutzakis E., Chinou I.B, Mitakou S., Gikas E. and Tsarbopoulos A. (2001). Composition and antimicrobial activity of essential oils of five taxa of Sderitis from Greece. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 49:811-815.
- Ali-Shtayeh M.S., Majed Jamous R., Abu Zaitoun S.Y. and Basem Qasem I. (2014). *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease *Functional Foods in Health and Disease*. 4(9):381-400.
- Allen K. G., Banthorpe D. V. and Charlwood B. V. (1977). Metabolic pools associated with monoterpane biosynthesis in higher plants. *Phytochemistry*. 16, 79-83.
- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M. and Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc, *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*. 14(1) : 141-148.
- Amiot J. (2005). *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse-doctorat-Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. France.
- Amiri H. (2010). Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanolic Extract of *Teucrium orientale* (L.) subsp. *taylori* (Boiss.) Rech. f. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 9(4): 417–423.
- Andrade M. A., Cardoso M.D.G., Andrade J., Silva L.F., Teixeira M.L., Resende J.M.V., Figueiredo A.C.D.S. and Gonçalves Barroso J. (2013). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. *Antioxidants*. 2, 384-397.
- Angioni A., Barra A., Russo M.T., Coroneo V., Dessiä S. And Cabras P. (2003). Chemical

- Composition of the Essential Oils of *Juniperus* from Ripe and Unripe Berries and Leaves and Their Antimicrobial Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.51, 3073-3078.
- Anton R. et Lobstein A. (2005). *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed. *Tec. & Doc.*, Paris, 522p
- Arora D., Rani A. and Sharma A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula* ». *Pharmacognosy Reviews* 7 (14):179.
- Askari F., Sefidkon F. and Teimouri M., (2010). Essential Oil Composition of the Different Parts of *Pimpinella barbata* (DC.) Boiss. in Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 22:605-608.
- Audigie C.L., Dupon G. and Zonsgain F. (1995). *Principes des méthodes d'analyse biochimique*. T1, 2^{ème} ED. Doin, Paris. 44.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Baldwin R. and Fasulo T.R. (2014). Confused Flour Beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) and Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures>.
- Ballard C.G. (2002). Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *European neurology*. 47, 64-70.
- Bamoniri, A., Abdolrasoul H. Ebrahimabadi, Mazoochi A., Behpour M., Kashi J.F. and Batooli H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia traigioides* Boiss. from Iran. *Food Chemistry*. 122. 553-558.
- Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *comments on toxicology*. 9 : 5-21.
- Baser K.H.C. and Buchbauer G. (2010). *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.
- Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R., Ouattara C., Costa-de-Oliveira S. and Martinez-de-Oliveira J. C. A. T., Kabore Z. I., and Traore S. A. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multi-flora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*. 62:209-212.
- Battandier J.A. and Trabut L.C. (1902). *Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie*. Alger: Vve Giralt, 152p.
- Bekhechi C., Bekkara F.A., Casanova J. and Tomi F. (2011). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea odorata* L. subsp. *pectinata* (Lamk) var. *microphylla* (Willd.) Willk. from Northwestern Algeria *Journal of Essential Oil Research*. 23:42-46.
- Belaiche P. (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- Belisle C., Rivard B. et coll. (1999). *La démence de type Alzheimer et les autres atteintes cognitives*. Ed formed.
- Benamar H. (2008). *Screening de plantes pour leur activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et analyse phytochimique*. Mémoire de magistère. Faculté de science. Université d'Oran Es-Senia.

- Benayad N., (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Rapport d'étude. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.
- Benayad N., (2013). Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Thèse de doctorat. Faculté des sciences, Université Mohammed V. AGDAL. Rabat Maroc.
- Bencheikh H. (2005). Contribution à l'étude de la composition, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Foeniculum vulgare*. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Bendiabdellah A. (2014). Etude chimique et biologique des extraits de trois *Daucus* (*D. crinitus*, *D. muricatus* et *D. carota* ssp *hispanicus*) de la région de Tlemcen. Thèse de Doctorat en Science. Département de Chimie, Faculté des Sciences, UAB de Tlemcen.
- Bendiabdellah A., Dib M.A., Djabou N., Allali H., Tabti B., Costa J. and Muselli A. (2012). Biological activities and volatile constituents of *Daucus muricatus* L. from Algeria. Chemistry Central Journal 6: 48-58.
- Benini C. (2007). Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux, 109p.
- Benjilali B. (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- Benmeddour T. (2016). Etude de l'activité biologique de quelques espèces végétales dans la région des Aurès et au nord du Sahara algérien. Thèse de doctorat en science. Département de biologie et écologie végétale, faculté des sciences de la nature et de la vie, UFA de Sétif.
- Berchtold N. C. and Cotman C. W. (1998). Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. Neurobiology of Aging. 19, 173-189.
- Bettaieb R. I., Bourgou S., Ben Slimen Debez I., Jabri Karoui I., Hamrouni Sellami I., Msaada K., Limam F. and Marzouk B. (2011). Effects of extraction solvents and provenances on phenolic contents and antioxidant activities of Cumin (*Cuminumcyminum* L.) seeds, Food Bioprocess Techno. 1007
- Bonnier G. (1934). Flore complète de France, Suisse et Belgique. édition 10, P 118.
- Bouhekrit M., Laouer H., Hajji M., Nasri M., Haroutounian S.A., Akkal S. (2016). Essential oils from *Elaeoselinum asclepium*: Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 6(10):851-857
- Bounechada M. and Arab R. (2011). Effet insecticide des plantes *Melia azedarach* L. et *Peganum harmala* L. sur *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera:Tenebrionidae). Agronomie numéro 1: 1-6.
- Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine et Chaouch A. (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. Afrique Science. 03(2): 232 – 242

- Bousaada O., Ammar S., Saidana D., Chriaa J., Chraif I., Daami M., Helal A.N. and Mighri Z. (2008). *Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of Rhaponticum acaule DC grow in wild in Tunisia*, Microbiology Research. 163(1): 87-95.
- Bouزيد Dj. and Zerroug M.M. (2016). Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil. Der Pharmacia Lettre. 8 (4):41-44.
- Bowles E.J. (2003). The chemistry of aromatherapeutic oils. 3rd Ed. Allen & Unwin, Australia. 257p.
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I. and Couladis M. (2008). Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl *s.l.* and *A. pannonica* Scheele Essential oils. Molecules. 13 : 2058-2068.
- Braga P.C., Dal Sasso M., Culici M., Gasastri L., Marceca M.X., Guffanti E.E. (2006). Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. Pharmacology 76, 61-68.
- Brice A. (2004). La maladie d'Alzheimer, Encyclopedie Orphanet.
- Bruneton J., (1993). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc.* Lavoisier, 2ème édition, Paris. 915p.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- Bruneton J. (2009). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, 4ème édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.
- Butterfield D. and Lauderback C. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide associated free radical oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 32, 1050-1060.
- Caillet S. and Lacroix M., 2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). 1-8.
- Caldefie-Chézet F., Guerry M., Chalchat J.C., Fusillier C., Vasson M.P., Guillot J. (2004). Antiinflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. Free Radical Research. 38: 805-811.
- Caldefie-Chézet F., Fusillier C., Jarde T., Laroye H., Damez M., Vasson M.P. (2006). Potential anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. Phytotherapy Research 20: 364-370.
- Calo J. R., Crandall P. G., O'Bryan C. A. and Ricke S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. Food Control. 54: 111–119.
- Campbell J. F. and Runnion C. (2003). Patch exploitation by female red flour beetles, *Tribolium castaneum*. Journal of Insect Science 3: 1-8.
- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A. and Akpulat H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology. 87: 215-220.

- Carson C.F., Mee B.J. and Riley T.V. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1914-1920
- Chaintreau A., Joulain D., Marin C., Schmidt C.O. and Vey M. (2003). GC-MS, Quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reaction. *Journal of Agriculture Food Chemistry* (51): 398-403.
- Chalchat J.K., Carry L.P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of Essential. Oil Research*. 9: 67-75.
- Chami F. (2005). Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p
- Chandra S., Chatterjee P., Dey P. and Bhattacharya S. (2012). Evaluation of anti inflammatory effect of ashwagandha: a preliminary study in vitro. *Pharmacognosie Journal*. 4: 47-9.
- Chatonnet A. and Lockridge O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemistry Journal*. 260: 625-634.
- Chatzopoulou P., Katsiotis S.T. and Baerheim-Svendsen A. (1992). An ascaridole containing essential *Achillea millefolium* L. complex growing wild in northern Greece. *Journal of Essential Oil Research*. 4: 457-459.
- Chiasson H. and Beloin N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre » *Bulletin de la Société d'entomologie du Québec Antennae*. (14) : 1
- Clarke S. (2008). *Chemistry of essential oil*. 1st edition Elsevier. British, 302p.
- Colletier J.P., (2006). Etude des relations structure–dynamique–fonction au sein de l'acétylcholinestérase. Thèse Doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble I.
- Collin G. (2000). Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*. 13:4-5.
- Coste H. and Flahault C.H. (1998). Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes, Librairie scientifique et technique, Paris, Tome II.
- Cox S.D., Gustafson J.F., Warmington J.R. and Wyllie S.G. (1991). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Melaleuca alternifolia* essential oils. *Journal of Applied Microbiology* .88, 170-175.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. and Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.
- Cragg G. M., Newman D. J. and Snader K. M., (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural products*. 60 (1): 52-60.
- Crete P. (1965) : Précis de botanique. Masson, Paris, édition 2, P 429
- Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants, Columbia

University press, New York.

- Cronquist A. (2001). Vascular Flora of the Southeastern United States: *Asteraceae*. UNC Press Books.
- Dai J., Zhu L., Yang L. and Qiu J. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia Prostrata*. *Excli Journal*. 12:479-490.
- Dastjerdi L.S. and Mazoji A. (2015). Comparative chemical composition of the essential oils of Iranian *Achillea oxyodonta* from different ecological regions. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(5):106-109.
- Dawidowicz A. L., Olszowy M. (2014). Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural Product Research*. 28(22): 1952-1963.
- De Maack F. et Sablier M. (1994). Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Dossier: P2614. vol papier n°: TA3. Bases documentaires, Techniques d'analyse.
- De Martino L., De Feoa V., Fratiannib F., Nazzaro F. (2009). Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. *Natural Products Communication*. 4: 1741-1750.
- De Souza E.L., Stamford T.L.M., Lima E.O., Trajano V.N. and Filho J.M.B. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices : an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(4): 559-566.
- Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. and Tawata S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* L. var. *Radiata*. *Food Control*. 19: 346-352.
- Degryse A.C., Delpla I. et Voinier M.A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. and Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74:101-109.
- Denyer S.P. and Hugo W.B. (1991). Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In *Mechanisms of action of chemical biocides*, S.A.B. Technical Series 27 ed. Denyer, S.P. and Hugo, W.B. pp. 171–187. Oxford: Blackwell Scientific Publications
- Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. and Bernardini A. F. (1997). Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis*, 25 (6): 13-16.
- Desmares C., Laurent A. et Delerme C. (2008). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. *AFSSAPS*. Anatole, France, 18p.
- Djarri L., Medjroubi K., Akkal S., Elomri A., Seguin E. and Verité P. (2006) . Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss. *Flavour and Fragrance Journal*. 21, 647-649.
- Dorman H.J.D. and Deans H.J.D. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of

- plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (2) 308–316.
- Dupont F. et Guignard J. L. (2012). *Botanique, les familles de plantes*, Elsevier Masson. A. S, Paris.
- Duraffourd C., D’Hervicourt L. and Lapraz J. C. (1990). *Cahiers de phytothérapie clinique*. 1. Examens de laboratoires galénique. *Eléments thérapeutiques synergiques*. 2^{ème} éd. Masson, Paris.
- Edris A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research* 21, 308-323.
- El idrissi M., Elhourri M., Amechrouq A. and Boughdad A. (2014). Étude de l’activité insecticide de l’huile essentielle de *Dysphania ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) sur *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) *Journal of materials and environmental science*. 5 (4): 989-994.
- El Zakhem M. (2003). Effets antifongiques des huiles essentielles extraites de l’*Origanum syriacum* L. et de *Salvia libanotica* Boiss et Gaill contre les *Candida: albicans, holmii, et famata*. Mémoire de Diplôme d’Études Approfondies (DEA) en Agroalimentaire et Assurance-Qualité. Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG).
- Elhourri M., Amechrouq A., El idrissi M., Boughdad A. (2014). Etude de la composition chimique et de l’activité insecticide des huiles essentielles de *Dysphania ambrosioides* (L.) (Chenopodiaceae) et de *Daucus carota* (L.) ssp. *carota* (Apiaceae) sur *Bruchus lentis* (Coleoptra: Chrysomelidae), *ScienceLib Editions Mersenne*, 6, N° 140118
- El-Kalamouni C. (2010). *Caractérisations chimiques et biologiques d’extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées*. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, France.
- El-Kalamouni C., Venskutonis P., Zebib B., Merah O., Raynaud C., Talou T. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Achillea millefolium* L. Grown in France. *Medicines*, 4 (2), 9 p.
- El-Kolli M. (2016). *Composition chimique et activités biologiques des huiles essentielles de deux apiacées *Carum montanum* Benth. et Hook. et *Daucus gracilis* Stem.*. These de doctorat en science. Département de Microbiologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, UFA de Sétif.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. and Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemistry. Pharmacology*. 7: 88–95.
- El-Shazly A.M., Hafez S.S. and Wink M. (2004). Comparative study of the essential oils and extracts of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. and *Achillea santolina* L. (Asteraceae) from Egypt. *Pharmazie* 59:226-230.
- Elzaawely A. A., Xuan T.D., Koyama H. and Tawata S. (2007). Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chemistry*. 104:1648–1653.
- ESO (2000). *The Complete Database of Essential Oils*, Boelens Aroma Chemical Information Service, The Netherlands.
- Euro+med. 2013. Euro+Med PlantBase. The information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Published on the internet <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>.

- Evans F.J. and Schmidt R.J. (1980). Plants and plant products that induce contact dermatitis, *Plantas medicinales*, (38): 289-316.
- Fahed L., El Beyrouthy M., Ouaini N., Eparvier V. and Stien D. (2016). Isolation and characterization of santolinoidol, a bisabolene sesquiterpene from *Achillea santolinoides* subsp *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter *Tetrahedron Letters*, 57:1892-1894
- Falconieri D., Pirasa A., Porcedda S., Marongiua B., Gonçalves M.J., Cabral C., Cavaleiro C. and Salgueiro L. (2011). Chemical composition and biological activity of the volatile extracts of *Achillea millefolium*. *Natural Product Communications*. 6 (10): 1527-1530.
- Farhang Sardrodi A., Soleimani A., Kheiry A. and Zibaseresht R. (2017). Essential oil composition of *Achillea aucheri* Boiss at different growing altitudes in Damavand, Iran. *Journal of agricultural science and technology*. 19:357-364
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- Fekih N., Allali H., Merghache S., Chaib F., Merghache D., Dib M.A., Djabou N., Muselli A., Tabti B. and Costa J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4(2): 97-103
- Feng, R. and Isman M.B. (1995). Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid *Myzus persicae*. *Experientia* 51: 831-833.
- Fisher K. and Phillips C. (2009). In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *British Journal of Biomedical Science*. 66: 180-185
- Flamini G., Cioni P.L., Maccioni S. and Baldini R. (2007). Composition of the essential oil of *Daucus gingidium* L. ssp. *Gingidium*. *Food Chemistry*. 103 (4), 1237–1240.
- Flamini G., Smaili T., Zellagui A., Guerraf N. and Cioni P.L. (2013). Effect of growth stage on essential oil yield and composition of *Daucus sahariensis*, *Chemistry and Biodiversity*. 10(11): 2014-2020.
- Flamini G., Cosimi E., Cioni P.L., Molfetta I. and Braca A. (2014). Essential oil composition of *Daucus carota* ssp. *major* (Pastinocello Carrot) and nine different commercial varieties of *Daucus carota* ssp. *sativus* fruit, *Chemistry and Biodiversity*. 11(7):1022-1033.
- Flück H. (1942). Nos plantes médicinales. Traduit par Weitzel R., librairie Payot, Lausanne, pp. 8-14.
- Fournier G., Habib J., Reguigui A., Safta F., Guetari S. and Chemli R. (1989). étude de divers échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus* de Tunisie. *Plantes médicinales et phytothérapies*, XXIII (3): 180-185.
- France-Ida J. (1996). Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*. 3 : 5-6.
- France-Ida J. (1998) – Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle? *Info – essences*. 7 : 1-2.
- Gachkar L., Yadegari D., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I. (2007).

- Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry. 102: 898-904.
- Gakuubi M.M., Maina A.W. and Wagacha J.M. (2017). Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against Selected *Fusarium* spp. International Journal of Microbiology. 7 p
- Gardner P. (1997). Superoxide-driven a conitase FE-S center cycling. Bioscience Reports. 17, 33-42.
- Garnéro J. (1991). Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France. 2-20.
- Garnero J. (1996). Huiles essentielles. Dossier : K345. Base documentaire: Constantes physico-chimiques. vol. papier n°: K2.
- Gausson H. and Leroy H. F. (1982). Précis de Botanique (végétaux supérieurs), 2ème Ed. 426p.
- Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L., Benbia S. and Mouloud Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L.. Phytothérapie. 12:15-24.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M. and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, -Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
- Giacobini E., Spiegel R., Enz A., Veroff A.E. and Cutler N.R. (2002). Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. Journal of Neural Transmission. 109: 1053-1065.
- Glisic S.B., Misic D.R., Stamenic M.D., Zizovic I.T., Asanin R.M. and Skala D.U. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. Food Chemistry. 105 (1): 346-352.
- Granger M. M. R., Passet J. and Arbousset G. (1973). L'essence de *Rosmarinus officinalis*, influence du mode de traitement du matériel végétal. Parf. Cosm. Sav. France 3(3): 133-137.
- Graziose R., Lila M.A. and Raskin I. (2010). Merging traditional Chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods. Current drug discovery technologies 7 (1): 2-12.
- Greig N.H., Lahiri D.K. and Sambamurti K. (2002). Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. International Psychogeriatrics. 14(1), 77-91.
- Grosso C., Ferraro V., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Coelho J. A. and Palavra, A.M. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds, Food chemistry. 111 (1): 197-203.
- Guignard J.L., Cosson L. and Henry M. (1985). Abrégé de phytochimie. Ed. Masson Paris. 155-174.
- Guignard J.L. (1994). Abrégé Botanique, 9ème Ed. 204.
- Guignard J.L. (2000). Biochimie végétale. 2^{ème} Ed. De l'abrégé Dunod, Paris. 177-185.
- Guignard J., Dupont F. (2004). Botanique- systématique moléculaire- Ed. Masson. 13^è édition.

- Güllüce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., Polissiou M., Sokmen A. and Gupta V., Mittal P., Bansal P., Khokra S.L. and Kaushik D., (2010). Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. *International journal of pharmacology science of drug research*. 2, 12-6.
- Hada T., Shiraishi A. and Furuse S. (2003). Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Natural Medicines*. 57: 64-67
- Hajji M, Masmoudi O, Souissi N, Triki Y, Kammoun S and Nasri M. (2010). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Periploca laevigata* root barks. *Food Chemistry*. 121(3):724-731.
- Hami H., Soulaymani A., Skalli S., Mokhtari A., Sefiani H. and Soulaymani R., (2011). Poisoning by *Atractylis gummifera* L. Morocco poison control center data. *Bultin de la société de Pathologie Exotique*. 104 (1) : 53-57.
- Hamouda T. and Baker J.R. (2000). Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 89. 397 - 403.
- Hart P.H., Brand C., Carson C.F., Riley T.V., Prager R.H. and Finlay-Jones J.J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca altemifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*. 49, 619-626.
- Hashem M.Y., Ahmed S.S., El-Mohandes M.A. and Gharib M.A. (2012). Susceptibility of different life stages of saw-toothed grain beetle *Oryzaephilus surinamensis* (L.)(Coleoptera: Silvanidae) to modified atmospheres enriched with carbon dioxide. *Journal of stored products research*. 48: 46-51
- Haubruge E., Shiffers B., Gabriel E., Verbstraeten (1988). Etude de la relation dose-efficacité de six insecticides à l'égard de *Sitophilus granarius* L., *S. oryzae* L., et *S. zeamais* Mots. (Col., curculionidae). *Medicine Faculty Landbouww Ryksuniv (Gent)* .53/2b: 719-26.
- Hernandez Ochoa L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.
- Heywood V.H. (1971). *The Biology and chemistry of the Umbelliferae*, Academic Press. London.
- Heywood V. H., Moore D. M., Richardson I. B. K. and Stearn W. T., (1996). *Les plantes à fleurs 306 Familles de la flore mondiale* P. 218- 219.
- Hogan D. and Kolter L., (2003). why are bacteria referactory to antimicrobials ?*Current Opinion in Microbiology*, 5 : 472-477.
- Holley R.A. and Patel D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22 (4): 273–292.
- Howes M.J. and Houghton P.J. (2003a). Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function *Pharmacology. Biochemistry. Behaviour*. 75, 513–527.
- Howes M.R., Perry N.S.L. and Houghton P.J. (2003b). Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy. Research..* 17, 1–18.

- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L. (1998) - Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'aromes. *Sciences des aliments*. 18: 563-582.
- Hüsnü K. and Başer C. (2016). Essential Oils of *Achillea* Species of Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*. 3(1): 1-14.
- Hussain A.I., Anwar F., Sherazi T.H.S. and Przybylski R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108:986-995.
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:1070-1078.
- Hussain H., Al-Harrasi A., Abbas G., Rehman N.U., Mabood F., Ahmed I., Saleem M., Van Ree T., Green I.R., Anwar S., Badshah A., Shah A. and Ali I. (2013). The Genus *Pluchea*: Phytochemistry, Traditional Uses, and Biological Activities. *Chemistry and Biodiversity*, 10: 1944-1971.
- Isman M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. 19: 603-608.
- Issabeagloo E., Taghizadieh M., Abri B. (2012). Antimicrobial effects of yarrow (*Achillea millefolium*) essential oils against *Staphylococcus* species *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 6(41): 2895-2899.
- Jaleel C.A., Sankar B., Murali P.V., Gomathinayagam M., Lakshmanan G.M.A. and Panneerselvam R. (2008). Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 62: 105–111.
- Joulain D. and Koenig W.A. (1998). *The Atlas of Spectra Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, EB-Verlag, Hamburg.
- Kadri A., Zarai Z., Ben Chobba I., Békir A., Gharsallah N., Damak M. and Gdoura R. (2011). Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(29): 6502-6508.
- Kalemba D. and Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F. and Pirmoradei M.R. (2005). Comparison of essential oil composition of *Ferula assa.foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrosistillation methods. *Food Chemistry*, 91:639-644.
- Khalfallah L. A., Al-kaki S., Kabouche A., Touzani R., Kabouche Z. (2011). antibacterial activity and chemical composition of the essential oil *Ammi visnaga* L. from Constantine, Algeria; *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 1(3): 302-305.
- Khalil N., Ashour M., Singab A.N. and Salama O. (2015). Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oils Obtained From Yellow and Red Carrot Fruits Cultivated In Egypt. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 10(2):1. PP 13-19.
- Kim S.W., Kang J. and Park I.K. (2013). Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal*

of Asia Pacific Entomology. 16, 443–448.

- Koenig W.A., Joulain D. and Hochmuth D.H. (2004). Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. MassFinder 3, Hamburg, Germany.
- Koh K.J., Pearce A.L., Marshman G., Finlay-Jones J.J., Hart P.H. (2002). Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British Journal Dermatology*. 147:1212-1217.
- Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M. and Mete E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene, *Bioresource Technology*. 99, 2008, 8788.
- Krishnaiah D., Sarbatly R. and Nithyanandam R. (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food Bioproducts Processing*. 10: 3-4.
- Ksouri A., Dob T., Belkebir A., Krimat S., Chelghoum C. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil and the methanol extract of Algerian wild carrot *Daucus carota* L. ssp. *carota*. (L.) Thell. *Journal of Materials and Environmental Science*. 6 (3):784-791.
- Kulisic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85:633–640.
- Kunduhoglu B., Kurcuoglu M., Duru M.E. and Baser K.H.C. (2011). Antimicrobial and anticholinesterase activities of the essential oils isolated from *Salvia dicroantha* Stapf., *Salvia verticillata* L. subsp. *amasiaca* (Freyne and Bornm.) Bornm. and *Salvia wiedemannii* Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(29): 6484-6490.
- Labad A., Chibani S., Semra Z., Kabouche A., Aburjai T., Touzani R. And Kabouche Z. (2012). Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential Oil of *Athamanta sicula* L. (Apiaceae) from Algeria *E-Journal of Chemistry*, 9(2): 796-800.
- Lagunez Rivera L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, institut national polytechnique de Toulouse. 15-35.
- Lahlou M. (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 435-448.
- Lamarti A., Badoc A., Deffieux G. and Carde J.P. (1994). Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133 :69-78
- Laouer H. (2004). Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Laouer H., Boulaacheb N., Akkal S., Singh G., Marimuthu P., Heluani C., Catalan C., and Nicholas Baldovini (2008). Composition and Antibacterial Activity of The Essential Oil of *Ammoides Atlantica* (Coss. Et Dur.) Wolf. *Journal of Essential Oils Research*. 20:1-4.
- Lee S-E, Lee B.H., Choi W.S., Park B.S., Kim J.G. and Campbell B.C. (2001). Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Management Science*. 57 (6):548-553.

- Leelaprakash G and Mohan Dass S. (2010). *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*, International Journal of Drug Development and Research. 3:189-196.
- Lehotay S.J. and Hajslova, J. (2002). Application of gas chromatography in food analysis. Trends in Analytical Chemistry, 21: 686-697.
- Li B., Stribley J.A., Ticu A., Xie W., Schopfer L.M. and Hammond P. (2000) Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. Journal of neurochemistry. 75, 1320-1331.
- Lichtenstein E.P. (1966). Insecticides occurring naturally in crops Advances. Chemistry Ser. 53: 34-38.
- Lis-Balchin M. (2002). Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London: 37, 40, 50, 155-200.
- Lopez S., Bastida J., Viladomat F. and Codina C. (2002). Acetylcholinesterase inhibitory activity of some *Amaryllidaceae* alkaloids and Narcissus extracts. Life Science, 71: 2521–2529.
- Mann C. M., Cox S. D. and Markham J. L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributors to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). Letters in Applied Microbiology. 30: 294-297.
- Mansour E.S S., Maatooq G. T., Khalil A. T., Marwan E.S M. and Sallam A. A. (2004) . Essential Oil of *Daucus glaber* Forssk Z. Naturforsch. 59c, 373-378.
- Marino M., Bersani C. and Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. International Journal of food microbiology. 67: 187-195.
- Martin R., Salgueiro R.L., Goncalves M.J., Vila R., Tomi F., Adzet T. And Casanova T. (2000). Activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*. Planta Medica. 66(7):647-650.
- Maruyama N., Sekimoto N. and Ishibashi H. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. Journal of inflammation. 2:1-11.
- Maxia A., Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., Gonçalves M.J., Cavaleiro C. and Salgueiro L. (2009). Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast, Fitoterapia, 80:57–61.
- May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. 45: 639-643.
- Mayer A. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates two steps of homotypic vacuole fusion. Mol. Biol. Cell. 11(3):807-17
- Mazandarani M., Mirdeilami S.Z. and Pessarakli M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in Northeast of Iran. Journal of Medicinal Plants Research .7(16):1063-1069.
- McLafferty F.W. and Stauffer D.B. (1989). The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, J

Wiley and Sons: New York.

- Meliani N., Dib M.A., Djaboua N., Costa J., Allali, Tabtia B. and Muselli A. (2013). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Daucus aureus* Essential Oils from Algeria, Natural Product Communications. 8 (6): 835-840.
- Mesulam M.M., Guillozet A., Shaw P. and Quinn B. (2002). Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. Neurobiology of disease. 9, 88-93.
- Miyazawa M., Tougo H. and Ishihara M. (2001). Inhibition of acetylcholine-esterase activity by essential oil from *Citrus paradisi*. Natural Products Letters. 15: 205-210.
- Miyazawa M. and Yamafuji C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids, Flavour and Fragrance Chemistry. 20, 617-620.
- Mizushima Y. and Kobayashi M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 20: 169-173
- Mneimne M., Baydoun S., Nemer N., Arnold Apostolides N. (2016). Chemical Composition and Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from *Achillea kotschyi* Boiss. subsp. *kotschyi* (Asteraceae) of Lebanon. The Pharmaceutical and Chemical Journal. 3(2):91-98.
- Mohammadhosseini M., Sarkerb S.D., Akbarzadehc A. (2017). Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review Journal of Ethnopharmacology. 199: 257–315.
- Mora C., Tittensor D.P., Adl S., A.G.B. Simpson, and Worm B. (2011). How many species are there on earth and in the ocean?. PLOS biology 9 (8): e1001127.
- Nadim M.M., Malik A.A., Ahmad J. and Bakshi S.K. (2011). The Essential Oil Composition of *Achillea millefolium* L. cultivated under tropical condition in India. World Journal of Agriculture Science. 7(5): 561-565.
- Ndomo A. F., Tapondjou A.L., Tendonkeng F., Tchouanguép F.M. (2009). Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). Tropicicultura. 27(3): 137-143.
- Ndoye Foe F.M., Tchingang T.F.K., Nyegue A.M., Abdou J.P., Yaya A.J.G., Tchinda A.T., Essame J.O., Etoa F.X. (2016). Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. BMC Complement Alternative Medicine. 7; 16:117.
- Neffati A. (2010). Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Caen, Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : *Pituranthos chloranthus*.
- Nemeth E. (2006). Caraway : the genus *Carum*. Ed. university of horticulture and food industry Switzerland. 1-13
- Németh E. and Bernath J. (2008). Biological Activities of Yarrow Species (*Achillea* spp.). Current pharmaceutical design. 14. 3151-67.
- Nenaah G. E. (2014). Chemical composition, insecticidal and repellence activities of essential oils

- of three *Achillea* species against the Khapra beetle (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Pest Science*. 87:273–283.
- Newman D. J. and Cragg G. M., (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *Journal of Natural Products*, 70 (3): 461-77.
- Ngamo L.S.T. and Hance Th. (2007). Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *Tropicicultura*. 25 (4) : 215-220.
- Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4): 593-656.
- Norel X., Angrisani M., Labat C., Gorenne I., Dulmet E. and Rossi F. (1993). Degradation of acetylcholine in human airways: role of butyrylcholinesterase. *British journal of pharmacology*. 108: 914- 919.
- Obeng-Ofori D., Reichmuth C.H., Bekele J. and Hassanali A. (1997). Biological activity of 1,8-cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. *Journal of Applied Entomology*. 121: 237-243.
- Odak I., Talić S. and Martinović Bevanđa A. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of three Lamiaceae species from Bosnia and Herzegovina. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*. 45, 23-30.
- Ojimelekwé P.C. and Alder C. (1999). Potential of Zimtaldehyde, 4-allylanisol, linalool, terpinol and others phytochemicals for the control of the confused flour beetle (*Tribolium confusum* J.D.C.) (G.L. Tenebrionidea). *Journal of Pest Science*. 72, 81-86.
- Okoh O. O., Sadimenko A. P. and Afolayan A. J. (2011). Antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydro-distillation and solvent free microwave extraction. *African Journal of Biotechnology*. 10(20): 4207-4211.
- Orhan I.E., Kartal M., Kan Y. and Sener B. (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase, *Z. Naturforsch Sect. C*. 63,547–553.
- Oroojalian F., Kasra-Kermenshahi R., Azizi M. and Bassami M.R. (2010). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effect on food-borne pathogens. *Food chemistry*.120: 765-770.
- Özcan M.M. and Chalchat J.C. (2007). Chemical composition of carrot seeds (*Daucus carota* L.) cultivated in Turkey: characterization of the seed oil and essential oil. *Grasas y aceites*. 58 (4):359-365.
- Ozenda P. (1991). Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris
- Paena A.T., D'Aquila P.S., Panin F., Pippia P., Moretti M.D.L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. 9 : 721-726
- Paré J. (1997). Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 :p.4.
- Paris M. et Hurabielle M. (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson 339 p.
- Pepin J. L. and Delwaide P. (1999). Actualités thérapeutiques dans la maladie d'Alzheimer. *Médecine et Hygiène*. 57:1546-1550.

- Perry N.S.L., Houghton P.J., Theobald A., Jenner P. and Perry E.K. (2000). *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 52, 895-902.
- Perry J.J., Staley J.T. and Lory S. (2004). *Microbiologie. Cours et questions de révision*. Ed. Dunod.
- Pibiri M. C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, 161 p.
- Pilotto A., Franceschi M., Leandro G., Paris F., Niro V., Longo M.G., D'Ambrosio L.P., Andriulli A. and Di Mario F. (2003). The risk of upper gastrointestinal bleeding in elderly users of aspirin and other non-steroidal antiinflammatory drugs: The role of gastroprotective drugs. *Aging Clinical and Experimental Research*. 15: (6): 494-499.
- Pimenov M. G. and Leonov M. V. (1993). The genera of the *Umbelliferae* Nomenclature. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Piochon M. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire de maîtrise, option ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi 13-51.
- Platzer N. (2002). Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.
- Politeo O., Botica I., Bilusic T., Jukic M., Carev I., Burculand F., Milos M., (2011). Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco. *Journal of medicinal plants research*. 5(30), 6590-6596.
- Porter N. (2001). Essential oils and their production. *Crops and Food Research*. Number 39.
- Pourrut B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat, Toulouse, France.
- Pyrzynska K. and Pękal A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical methods*. 17
- Quezel P. and Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ; Editions du Centre National de la Recherche Scientifique : Paris.
- Radilovic N.D.E. and Stojanovic-Radic S. (2011). Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota* – A comparison study. *Food Chemistry*. 125: 35–43.
- Rahal K. (2005). Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème Ed, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- Rai M.K., Acharya D. and Wadegaonkar P. (2003). Plant derived-antimycotics: potential of Asteraceous plants, In : *plant-derived antimycotics : Current Trends and Future prospects*, Haworth press, N-York, Londin, Oxford. 165-185.
- Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry*. 135-140.

- Raut J. and Karuppayil S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 62. 250–264.
- Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M.K., Kawachi M., Eslamifar A., Schmidt O.J., Schmidt A., Allameh A. and Yoshinari T. (2006). Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacid^{®plus}, on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 48. 1075-82.
- Reichling J., Weseler A., Landvatter U. and Saller R. (2002). Bioactive essential oils used in phytomedicine as antiinfective agents: Australian tea tree oil and manuka oil. *Acta Phytotherapeutica*. 1: 26-32.
- Relinger L.M, Zettler J.L., Davis R. and Simonaitis R.A. (1988). Evaluation of pirimiphos methyl as a protectant for export grain. *Journal of Economic Entomology*. 81 : 718-21.
- Reynaud J. (2002). *La flore du pharmacien*. Ed.TEC et DOC, Paris.
- Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170p.
- Rivas da Silva A.C, Monteiro Lopes P., Barros de Azevedo M.M., Machado Costa D.C., Alviano C.S. and Alviano D.S. (2012). Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers *Molecules*, 17: 6305-6316.
- Rodriguez E., Towers G.H.N. and Mitchell J.C. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones, *Phytochemistry*. (15): 1573-1580.
- Rosua J. L. and Granados A.G. (1987). Analyse des huiles essentielles d'espèces du genre *Rosmarinus* L. et leur intérêt en tant que caractère taxonomique. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, XXI(2) : 138-143.
- Ruberto G. and Baratta, M.T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* 69: 167-174
- Russel A. D. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics : food additives and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*. 71(3): 191-201.
- Saad H-E.A., El-Sharkawy S.H. and Halim A.F. (1995). Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*. *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 70:79-84.
- Safaralie A., Fatemi S. and Sefidkon F. (2008). Essential oil composition of *valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran Comparative analysis between supercritical CO2 extraction & hydrodistillation. *Journal of chromatography A*. 1180:159.
- Salle J.L. et Pelletier J. (1991). Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, 19-45.
- Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. 8: 121-137.
- Sanz J., Martinez-Castro I. and Pinar M. (1985). Chemical constituents of *Achillea santolinoides* *Journal of Natural Product*. 48 (6), 993.

- Savelev S. U. (2003). Extracts of salvia species - relation to Potential cognitive therapy doctor of philosophy of The university of newcastle upon tyne newcastle university library.
- Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z. and Ahmadi S. (2007). The effect of distillation methods and stage of plant growth n the essential oil content and composition of *Satureja Rechingeri* jamzad. Food chemistry. 100: 1054-1058.
- Seguin E. (2001). Le préparateur en pharmacie « Botanique - Pharmacognosie - Phytothérapie - Homéopathie ». Ed. O.P.U, Alger. 208 p.
- Shahidi F. (1997). Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications, Ed aocs mission statement. 174-197.
- Shahraki A. and Ravandeh M. (2012). Comparative survey on the essential oil composition and antioxidant activity of aqueous extracts from flower and stem of *Achillea Wilhelmsii* from Taftan (Southeast of Iran). Journal of Health Scope. 1(4): 173-178.
- Shin S and Kim J.H. (2005). In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. Archives of Pharmacal Research 28: 897-901
- Sieniawska E., Baj T., Kowalski R., Skalicka-Woźniak K. and Glowniak K. (2014). Chemical Composition and *in vitro* Antioxidant Activity of *Mutellina purpurea* Thell. Flowers Essential Oil, Records of Natural Products. 8:(2)203-207.
- Singh G. (2004). Plant Systematics: An Integrated Approach. Science Publishers.
- Smaili T., Zellaoui A, Cioni P.L.; Flamini G. (2011). A myristicin-rich essential oil from *Daucus sahariensis* growing in Algeria composition chimique. Natural Product Communications. 6 (6): 883-886.
- Smith E.H. and Whitman R.C. (1992). Field Guide to Structural Pests. National Pest Management Association, Dunn Loring, VA.
- Song M.J. and Kim N.M. (2003). Antimicrobial action of *p*-hydroxyphenyl acrylate. International biodeterioration and biodegradation. 52: 107-113.
- Soreq H. and Zakut H. (1990). Amplification of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase genes in normal and tumor tissues: putative relationship to organ phosphorous poisoning. Pharmaceutical research (7): 1-7.
- Sosa S., Balicet M.J., Arvigo R., Esposito R.G., Pizza C. and Altinier G.A. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. Journal of Ethnopharmacology. 8: 211-215.
- Spichiger R.E. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. PPUR presses polytechniques.
- Staniszewska M. and Kula J. (2001). Composition of the essential oil from wild carrot. *L. ssp. carota*) growing in Poland. Journal of Essential Oil Research. 13:439-441.
- Stojanovic G., Asakawa Y., Pali R. and Radulovi C.N. (2005). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* and *Achillea holosericea* essential oils Flavour and Fragrance Journal 20: 86-88.

- Tabanca N., Kirimer N., Demirci B., Demirci F., and Baser K. H. C. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9): 4300-4303.
- Tabanca N., Demirci B., Ozek T., Kirimer N., Baser K.H.C., Bedir E., Khan I.A. and Wedge D.E. (2006). Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography. A*, 1117: 194–205.
- Tapondjou L.A., Alder C., Bouda H. and Fontem D.A. (2003). Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* et *Eucalyptus saligna* à l'égard de la bruche du niébé, *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera, Bruchidae). *Cahiers Agricultures*. 12: 401-407.
- Tapondjou L.A., Alder C., Fontem D.A., Bouda H. and Reichmuth C. (2005). Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research*. 41, 91-102.
- Taran M., Ghasempour H.R. and Shirinpour E. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. *Carduchorum* Jundishapur. *Journal of Microbiology* 3(1): 10-14.
- Tavares A.C, Gonc M.J., Cavaleiro A., Cruz M.T., Lopes M.L., Canhotoa J. and Salgueiro L.R. (2008). Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*. 119: 129–134.
- Tepe B., Daferera D., Sökmen M., Polissiou M. and Sökmen A. (2004). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *thymus eigii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:1132-1137.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., SokmenM. And Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food. Chemistry*. 90: 333-340.
- Teuscher E., Anton R. and Lobstein A. (2005). *Plantes aromatiques, Épices, aromates, condiments et huiles essentielles*, Tec & Doc : Paris.
- Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Phytomedicine*. 17: 142-145
- Trabut L. (1935). *Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique*, Alger, La Typo-Litho, 15 p
- Trendafilova A., Todorova M. and Vitkova A. (2010). Essential oil composition of *Achillea clusiana* from Bulgaria. *Natural Product Communications*, 5: 129-132.
- Tripathi A.K., Prajapati V., Aggarwal K.K. and Kumar S. (2001) Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8-Cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 94:979-983.
- Turkmenoglu F.P., Agar O.T., Akaydin G., Hayran M. and Demirci B. (2015). Characterization of Volatile Compounds of Eleven *Achillea* Species from Turkey and Biological Activities of

- Essential Oil and Methanol Extract of *A. hamzaoglu* Arabacı & Budak. *Molecules*. 20, 11432-11458.
- Valente J., Zuzarte M., Resende R., Goncalves M.J., Cavaleiro C., Pereira C.F., Cruz M.T. and Salgueiro L., (2015). *Daucus carota* subsp. *gummifer* essential oil as a natural source of antifungal and anti-inflammatory drugs. *Industrial crops and products*. 65: 361-366.
- Valnet J. (1984). *Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes*. Maloine S.A. éditeur. Paris. 544p.
- Valnet M. (2005). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth *International Journal of Food Microbiology*.85, 73-81.
- Verma R.S., Padalia R.C. and Chauhan A. (2014). Chemical composition variability of essential oil during ontogenesis of *Daucus carota* L. subsp. *sativum* (Hoffm.) Arcang, *Industrial Crops and Products* 52: 809– 814.
- Viljoen A.M., Denirci B., Baser K.H.C., Potgieter C.J. and Edwards T.J. (2006). Micro distillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 72:99-104.
- Vinodhini M., Kalaiselvi M., Amsaveni R. and Bhuvaneshwari R. (2017). Chemical composition and biological activities of essential oil from citrus sinensis peel. *World journal of pharmaceutical and medical research wjpmr*. 3(8), 164-168
- Walter V.E. (1990). Stored product pests. *In Handbook of Pest Control* (Story K, Moreland D. (editors.)). Franzak & Foster Co., Cleveland, OH. pp. 526-529.
- Wang G.W., Qin J.J., Cheng X.R., Shen Y.H., Shan L., Jin H.Z. and Zhang W.D. (2014). *Inula* sesquiterpenoids: structural diversity, cytotoxicity and anti-tumor activity. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 23 (3): 317-345.
- Wang H., Zhou G., Gao X., Wang Y. and Yao W. (2007). Acetylcholinesterase inhibitory-active components of *Rhodiola rosea* L. *Food Chemistry*. 105: 24-27.
- Weber F.J. and DeBont J.A.M. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 12:225-245.
- Wendakoon C. N. and Sakaguchi M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58: 280-283
- Wichtel M. and Anton R. (1999). *Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques*. Ed. Tec et Doc.
- Yousefzadeh N. and Zeinivand J. (2013). Essential oil composition of *Achillea millefolium* growing in Darreh-shahr township. *Iranian Chemical Communication*. 1(1):25-34.
- Yousefzadi M., Mirjalili M.H., Alnajjar N., Zeinali A. And Parsa M. (2011). Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. fruit from Iran, *Journal of Serbian Chemical Society*. 76 (6) 857–863.
- Yu Z., Wang B., Yang F., Sun Q., Yang Z. and Zhu L. (2011). Chemical composition and anti acetylcholinesterase activity of flower essential oils of *Artemisia annua* at different flowering stage, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 10(2):265-271.

Zaibet W. (2016). Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de *Daucus aureus* (Desf.) et de *Reutera lutea* (Desf.) Maire, et leur application comme agents antimicrobiens dans le polyéthylène basse densité (PEBD). Thèse de doctorat en science. Département de génie des procédés, faculté de technologie, UFA de Sétif.

Zaibet W., Laouer H., Amira S., Flamini G., Ramdani M. And Akkal S. (2015). Chemical Composition And Biological Activities Of *Daucus Aureus* Essential Oils From Eastern Algeria. Journal of Chilean Chemical Society. 60:(4). 2721-2728.

Zengin H. and Baysal A.H. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. Molecules. 19(11): 17773-17798.

Zheng X., Wang W., Piao H., Xu W., Shi H. and Zhao C. (2013). The genus *Gnaphalium* L.(Compositae): phytochemical and pharmacological characteristics. Molecules (Basel, Switzerland). 18 (7): 8298-8318.

Zhiri A. (2006). Aromathérapie, Nutranews, Ed: fondation libre choix. 2-16.

هيكل م. ا و عمر ع.ع(1993). النباتات الطبية و العطرية. كيمياؤها, إنتاجها و فوائدها. منشأة المعارف بالإسكندرية

أبو زيد ن.ح. (1988) - النباتات العطرية و منتجاتها الزراعية و الدوائية.الدار العربية للنشر و التوزيع القاهرة 472صفحة

أبو زيد ن. ح (2000) - الزيوت الطيارة الدار العربية للنشر و التوزيع القاهرة 256 صفحة

Annexes

Annexe I :

Les milieux de culture

Muller Hinton agar :

-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300 g
-Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
-Amidon de maïs.....	5 g
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée	1000 ml

Bouillon nutritif

-Peptone.....	5 g
-Extrait de viande.....	1 g
-Extrait de levure.....	2 g
-Chlorure de Sodium.....	5 g
-Eau distillée.....	1000 ml

Sabouraud simple

-Peptone	10 g
-Gélose.....	20 g
-Glucose.....	20 g
-Eau distillée.....	1000 ml

Chemical Composition and Cholinesterase Inhibitory Activity of Different Parts of *Daucus aristidis* Coss. Essential Oils from Two Locations in Algeria

Mebarka Lamamra^{1*}, Hocine Laouer¹, Smain Amira²,
Ilkay Erdogan Orhan³, Fatma Sezer Senol³, Betul Demirci⁴ and Salah Akkal⁵

¹Laboratory of Natural Resources Valorization, Department Of Biology and plant ecology, Ferhat Abbas University, Setif-1, Algeria

²Laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases, Department Of animal Biology and physiology, Ferhat Abbas University, Setif-1, Algeria

³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Gazi University, 06330 Ankara, Türkiye

⁴Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, 26470 Eskisehir, Türkiye

⁵Laboratory of Chemistry, Chemical and Biological Analyze, University of Mentouri, Constantine, Algeria

(Received March 28, 2016; Revised October 22, 2016; Accepted October 24, 2016)

Abstract: The chemical composition of the essential oils obtained by hydrodistillation from the different parts of *Daucus aristidis* Coss. (syn. *Ammiopsis aristidis* Batt.) (Apiaceae) from two locations (Ghoufi and Bousaada) in East of Algeria, was investigated for the first time by GC and GC-MS and evaluated for their *in vitro* acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity, the enzymes linked to Alzheimer's disease, by a spectrophotometric method of Ellman using ELISA microplate reader at 100 µg/mL. The main components of *D. aristidis* oils from Ghoufi and Bousaada were α -pinene (74.1%- 49%) and β -pinene (11.9% - 19.2%). This suggests that β -pinene was the main component from Bousaada. The oils exhibited a moderate inhibitory activity (over 50%) against both of the enzymes.

Keywords: *Daucus aristidis*; Apiaceae; essential oil; anticholinesterase; α -pinene; β -pinene. © 2016 ACG Publications. All rights reserved.

1. Introduction

Since ancient times, the plants from Apiaceae family have been used as spices or crude drugs, particularly due to their essential oils. A dozen important herbal medicinal products from this botanical family are described in several pharmacopoeias, having antiseptic, expectorant, diuretic, carminative, vasodilator or spasmolytic actions [1]. *Daucus* is a genus belonging to this family, which comprises of about 300-455 genera and 3000-3750 species worldwide [2]. In Algeria, it is represented by 55 genera, 130 species and 27 subspecies. The species have a bipolar distribution (in temperate regions), but the majority live in the temperate northern hemisphere [3].

* Corresponding author: E-Mail: lamamramebarka@yahoo.fr; Tel: 00213550352141

Daucus aristidis Coss. (synonymous: *Ammiopsis aristidis* Batt. [4]) is an endemic plant to Algeria and has been locally known as “noukhia”, which is an annual plant with high and smooth erect stem. The leaves are glabrous and pinnatisect with capillary segments. It possesses bracts that have many divided involucre and involucre with white flowers which yellowish in a herbarium and large to very large umbels rays, contracted at the end. The ovoid fruit is small 2-2.5 mm, grayish and finely tuberculate over their entire surface [3]. Several investigations have reported the chemical composition of the essential oils from *D. carota* as well as its subspecies [5-10]. However, many species and subspecies of *Daucus* still remain to be examined for their essential oil components such as *D. aristidis*. In this paper, we investigated the chemical composition of *D. aristidis* essential oil from two locations in eastern Algeria (Ghoufi and Boussaada) for the first time. The volatile compounds, extracted using hydrodistillation, were analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), and evaluated for their *in vitro* acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity, the key enzymes that are linked to Alzheimer’s disease (AD), which is a progressive and degenerative neurologic disorder resulting in impaired memory and behavior. Most treatment strategies have been based on the cholinergic hypothesis which postulated that memory impairments in patients suffering from this disease result from a deficit of cholinergic function in brain [11]. One of the most promising approaches for treating this disease is the cholinesterase inhibitors, which show consistent efficacy towards mild and moderate to severe types of Alzheimer’s disease. Amongst them, galanthamine, the latest anticholinesterase drug in the market, is a plant originated-compound [12], which reinforces the interest in finding better cholinesterase inhibitors from natural resources.

Therefore, in the present study, we aimed to investigate the cholinesterase inhibitory effects of *D. aristidis* essential oils tested by the spectrophotometric method of Ellman using ELISA microtiter assays at concentration of 100 µg/mL.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

The separated organs (stem, leaves and umbels) of *D. aristidis* were collected in May, 2014 and 2015 from Ghoufi (Algeria), while the aerial parts of *D. aristidis* from Boussaada region (Algeria) were collected in May, 2014 at the flowering stage at the altitude of 708 m and 854 m, respectively. After taxonomic identification by Dr. Boulachaab Nacira from Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University Ferhat Abbas, Setif 1, a voucher specimen was deposited at the Herbarium of Department of Biology and Plant Ecology, University of Setif 1, Algeria.

2.2. Chemicals

Electric eel AChE (Type-VI-S; EC 3.1.1.7, Sigma, St. Louis, MO, USA) and horse serum BChE (EC 3.1.1.8, Sigma, St. Louis, MO, USA) were used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as the substrates of the reaction. 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the measurement of the anticholinesterase activity.

2.3. Isolation of the essential oils

The oils were isolated by hydrodistillation (100 g of plant *per* sample) for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The oils have a light green color with a yield of 0.68% (w/w), 0.85% (w/w), 0.95% (w/w) and 0.26% (w/w) for aerial parts, stems, leaves and umbels of *D. aristidis* from Ghoufi and 0.72% (w/w) for *D. aristidis* from Boussaada. The obtained essential oils were dried over anhydrous sodium sulfate, stored at +4°C until tested, and analyzed.

2.4. Determination of AChE and BChE inhibitory activities

The AChE and BChE inhibitory activity was measured by slightly modified spectrophotometric method of Ellman [13]. In this method, 140 μL of sodium phosphate buffer (pH 8.0), 20 μL of DTNB, 20 μL of the test solution and 20 μL of AChE/BChE solution were added by multichannel automatic pipette (Gilson pipetman, Paris) in a 96-well microplate and incubated for 15 min at 25°C. The reaction was then initiated with the addition of 10 μL of acetylthiocholine iodide/butrylthiocholine chloride. Hydrolysis of acetylthiocholine iodide/butrylthiocholine chloride was monitored by the formation of the yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as a result of the reaction of DTNB with thiocholines, catalyzed by enzymes at 412 nm utilizing a 96-well microplate reader (VersaMax Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software (Sunnyvale, CA, USA). The percentage of inhibition of AChE/BChE was determined by comparison of the rates of reaction of samples relative to the blank sample (ethanol in phosphate buffer pH=8) using the formula $(E-S)/E \times 100$, where E is the activity of the enzyme without test sample and S is the activity of the enzyme with the test sample. The experiments were performed in triplicate. Galanthamine (Sigma, St. Louis, MO, USA), the anticholinesterase alkaloid-type of drug obtained from the bulbs of snowdrop (*Galanthus* sp.), was used as the reference.

2.5. GC and GC-MS analysis

The GC-MS analysis was carried out with an Agilent 5975 GC-MSD system. Innowax FSC column (60 m \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness) was used with helium as a carrier gas (0.8 mL/min). The GC oven temperature was kept at 60°C for 10 min and programmed to 220°C at a rate of 4°C/min, and kept constant at 220°C for 10 min and then programmed to 240°C at a rate of 1°C/min. Split ratio was adjusted at 40:1. The injector temperature was set at 250°C. Mass spectra were recorded at 70 eV. Mass range was from m/z 35 to 450.

The GC analysis was carried out using an Agilent 6890N GC system. The FID detector temperature was 300°C. To obtain the same elution order with GC-MS, simultaneous auto-injection was done on a duplicate of the same column applying the same operational conditions. Relative percentage amounts of the separated compounds were calculated from FID chromatograms.

Identification of the essential oil components was carried out by comparison of their relative retention times with those of authentic samples or by comparison of their relative retention index (RRI) to series of *n*-alkanes. Computer matching against commercial (Wiley GC/MS Library, Adams Library, MassFinder3 Library), and in-house "Baser Library of Essential Oil Constituents" built up by genuine compounds and components of known oils, as well as MS literature data was used for the identification.

3. Results and Discussion

GC-MS analysis of *D. aristidis* essential oils (from Ghoufi) obtained from the aerial parts, stems, leaves and umbels accounted for 99.7%, 93.6%, 94.4% and 99.0% respectively, and the essential oil obtained from the aerial parts of *D. aristidis* originated from Bousaada represented 99.5%, these analyses allowed the identification of 61 and 32 compounds in essential oils from the separated parts of *D. aristidis* from Ghoufi and the whole aerial parts from Bousaada, respectively (Tables 1 and 2).

The constituents were characterized by a high hydrocarbon fraction ([97.1%-57%-70.4%-74.5%] and 95.7%), respectively, and represented mainly by monoterpene hydrocarbons ([95.8% - 56.5%- 70%- 71.6%] and 94.3%). Sesquiterpenes presented only ([2.1%-0.2%-0.2%-2.9%] and 2.2%) of the essential oils, whereas stems, leaves and umbels of *D. aristidis* from Ghoufi were characterized by a high oxygenated fraction (36.6% - 24% - 24.5%), respectively.

Table 1. Chemical composition of the different parts of *Daucus aristidis* essential oil from Ghoufi

Constituents	RI ^a	Ghoufi (%)	S ^b	L ^c	U ^d
α -Pinene	1032	74.1	43.5	53.5	55.5
α -Thujene	1035	-	0.1	0.1	0.1
Camphene	1076	0.5	0.5	0.5	0.5
Hexanal	1093	-	0.2	-	-
β -Pinene	1118	11.9	7.5	7.8	8.1
Sabinene	1132	2.2	1.1	1.4	1.6
Thuja-2,4(10)-diene	1135	0.1	0.9	1.3	0.6
δ -3-Carene	1159	t ^e	-	-	-
Myrcene	1174	3.9	0.6	0.9	1.3
α -Terpinene	1188	0.1	-	-	-
Limonene	1203	2.4	1.5	3.6	3.1
β -Phellandrene	1218	0.3	-	0.2	0.2
(Z)- β -Ocimene	1246	t	-	-	-
γ -Terpinene	1255	0.2	0.1	0.1	0.2
(E)- β -Ocimene	1266	t	-	-	-
<i>p</i> -Cymene	1280	0.1	0.6	0.6	0.4
Terpinolene	1290	0.1	0.1	-	-
Perillene	1429	-	0.1	0.1	-
γ -Campholene aldehyde	1439	-	0.2	0.2	t
<i>p</i> -Cymenene	1452	-	0.3	0.2	-
α -Copaene	1497	0.1	-	-	-
α -Campholene aldehyde	1499	0.1	2.3	1.4	1.0
Linalool	1553	0.1	0.3	0.2	0.5
Pinocarvone	1586	tr	1.5	1.0	0.8
Bornyl acetate	1591	0.1	0.2	0.1	0.2
Terpinen-4-ol	1611	0.4	0.5	0.5	t
β -Caryophyllene	1612	0.4	0.2	0.2	0.6
β -Cedrene	1613	-	-	-	0.4
Thuj-3-en-10-al	1642	0.1	-	-	-
Myrtenal	1648	-	2.9	1.8	1.0
<i>cis</i> -Verbenol	1663	0.1	2.5	1.4	0.6
<i>trans</i> -Pinocarveol	1670	0.1	4.4	2.6	1.1
α -Humulene	1687	0.1	-	-	0.4
<i>trans</i> -Verbenol	1683	0.2	10.6	6.5	3.1
α -Terpineol	1706	0.2	0.5	0.3	0.3
Verbenone	1725	-	3.1	2.6	0.8
Germacrene D	1726	0.4	-	-	-

β -Bisabolene	1741	-	-	-	1.3
Carvone	1751	-	0.3	0.3	0.3
Bicyclogermacrene	1755	0.1	-	-	-
δ -Cadinene	1773	0.1	-	-	-
(<i>E</i>)- α -Bisabolene	1784	0.1	-	-	0.2
Myrtenol	1804	0.2	2.2	1.2	0.6
<i>trans</i> -Carveol	1845	0.1	1.2	0.9	0.5
Germacrene-B	1854	t	-	-	-
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1864	t	1.1	0.9	0.2
<i>p</i> -Cymen-9-ol	1912	-	0.2	0.2	-
Isocaryophyllene oxide	2001	-	-	-	0.2
Caryophyllene oxide	2008	0.1	0.7	0.7	3.0
Carotol	2045	0.1	0.1	-	0.5
Humulene epoxide-II	2071	-	0.2	0.2	1.2
Humulene epoxide-III	2081	-	-	-	0.2
Cedrol	2143	0.1	-	-	3.7
Spathulenol	2144	-	0.4	0.3	-
τ -Cadinol	2187	0.1	0.2	-	0.2
<i>epi</i> - α -Bisabolol	2256	0.1	0.2	0.2	0.5
β -Eudesmol	2257	0.1	0.3	0.2	0.3
Alismol	2264	0.1	-	-	-
Guaia-6,10(14)-dien-4 β -ol	2269	-	0.2	0.2	0.9
Juniper camphor	2320	0.1	-	-	2.0
β -Asarone	2361	t	-	-	0.8
Total		99.7	93.6	94.4	99.0

^aRI: retention indices ^bS: Stems ^L: Leaves ^U^d: Umbels ^t^e: trace

The major constituents of the aerial parts, stems, leaves and umbels of *D. aristidis* oils from Ghoufi were established as α -pinene (74.1%- 43.5% - 53.5% - 55.5%) and β -pinene (11.9%- 7.5%- 7.8%-8.1%), respectively. In addition the stems and leaves oils had another major component, *trans*-verbenol (10.6% -6.5%), respectively. However, α -pinene (49%), β -pinene (19.2%), limonene (7.5%), myrcene (6.7%) and sabinene (4.3%) were the major components of *D. aristidis* oil native to Boussaada region.

The essential oils were screened for their AChE and BChE inhibitory activity *in vitro* by Ellman method at concentration of 100 μ g/mL. As illustrated in Table 3, the essential oils appeared to have a moderate level of inhibitory effect against both enzymes as compared to that of galanthamine (reference compound). The essential oil of *D. aristidis* from Boussaada region displayed a modest inhibition against AChE and BChE (61.75 % and 56.79%, respectively), while the aerial parts, stems, leaves and umbels of *D. aristidis* essential oils from Ghoufi displayed low to moderate inhibition against AChE (51.0, 34.69, 13.44, and 33.07%, respectively),and BChE (41.46,22.32, 23.70, and 30.00%, respectively).

Table 2. Chemical composition of *Daucus aristidis* essential oil from Bousaada

Constituents	RI ^a	Boussaada (%)
α -Pinene	1032	49.0
α -Thujene	1035	0.4
Camphene	1076	1.8
β -Pinene	1118	19.2
Sabinene	1132	4.3
Thuja-2,4(10)-diene	1135	0.1
δ -3-Carene	1159	0.2
Myrcene	1174	6.7
α -Terpinene	1188	0.1
Limonene	1203	7.5
β -Phellandrene	1218	3.3
(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1246	0.3
γ -Terpinene	1255	0.4
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1266	0.2
<i>p</i> -Cymene	1280	0.7
Terpinolene	1290	0.2
α -Campholene aldehyde	1499	0.1
Linalool	1553	0.3
Bornyl acetate	1591	0.4
Terpinen-4-ol	1611	0.9
β -Caryophyllene	1612	0.6
Thuj-3-en-10-al	1642	0.2
<i>trans</i> -Pinocarveol	1670	0.2
α -Humulene	1687	0.1
<i>trans</i> -Verbenol	1683	0.3
α -Terpineol	1706	0.3
Germacrene D	1726	0.6
Bicyclogermacrene	1755	0.1
Myrtenol	1804	0.2
Caryophyllene oxide	2008	0.2
Spathulenol	2144	0.2
<i>epi</i> - α -Bisabolol	2256	0.4
Total		99.5

^aRI: retention indices

Table3. AChE and BChE inhibitory activities of the essential oils at 100 µg/mL

Essential oils tested	AChE inhibition	BChE inhibition
<i>D. aritidis</i> (aerial parts,Ghoufi)	51.00 ± 0.58	41.46± 2.33
<i>D. aristidis</i> (leaves,Ghoufi)	13.44± 0.87	23.70± 2.64
<i>D. aristidis</i> (umbels, Ghoufi)	33.07± 3.67	30.00± 1.09
<i>D. aristidis</i> (stems, Ghoufi)	34.69± 0.99	22.32± 2.83
<i>D. aritidis</i> (Boussaada)	61.75± 5.08	56.79± 2.95
Galanthamine (Reference)	94.48± 3.81	92.25± 0.79

The chemical analysis of *D. aristidis* essential oils from Ghoufi and Boussaada corroborate that α -pinene is the core constituent of the most essential oils of the genus species. In fact, it was reported that the major proportion of the essential oil of *D. carota* subsp. *carota* from Poland was represented by α -pinene with a percentage of 41% [7]. Similarly, the major constituents of the oil from the flowers of *D. carota* subsp. *carota* from Morocco were α -pinene (22.25%), β -asarone (15.13%), sabinene (12.46%), and α -himachalène (10.14%)[14]. Interestingly, in our study, the latter component was completely absent in both essential oils of *D. aristidis*, while β -asarone was found only in the umbels of *D. aristidis* oil from Ghoufi (0.8%). In addition, the essential oil of the aerial parts of *D. reboudii* from El Kala (Algeria) contained α -pinene (39.7%) followed by sabinene (21.2%) as the main constituents [15]. Nevertheless, the essential oil of the leaves and fruits of *D. sahariensis* revealed the presence of a significant amount of myristicin (34.3% and 43.9%, respectively) [16], which was absent in the oil of *D. aristidis* studied herein. α -Pinene was found to be also present in small amounts (5.4 to 13.1%) in the oils of *D. sahariensis* [16]. Similarly, the comparative study of essential oils of *D. guttatus* subsp. *zahariadii* and the wild sample of *D. carota* from Balkans demonstrated that the oil of *D. guttatus* subsp. *zahariadii* contained the following main constituents as apiole (43.3%) and β -bisabolene (34.2%) (this latter component was present in the umbels oils of *D. aristidis* from Ghoufi with small amount 1.3%), and contained α -pinene in a minor amount (0.3%), whereas, the oil of the aerial parts of wild *D. carota* contained 29.3% of α -pinene in major amount[17]. On the other hand, the seeds of the essential oil from the wild *D. carota* sample has been shown to possess a minor amount of α -pinene (3.3%) and the geranyl acetate (53.2%) as the major component [17], which is completely absent in the oils analyzed in the current study. The oils of the aerial part of *D. carota* subsp. *carota* and *D. carota* subsp. *gummifer* from Algeria were also characterized by the presence of α -pinene (26% - 34.1%, respectively), sabinene (1.5% -14%, respectively), limonene (0.5% -13%, respectively) and β -pinene (0.6% -11.2%, respectively) [18]. The latter component, β -pinene, is one of the dominating components of *D. aristidis* oil, which is known to be generally present in most oils of the genus *Daucus* in varying proportions. In fact, the essential oil of the flowers and umbels of *D. carota* subsp. *carota* from Portugal consisted of geranyl acetate (5.2% and 65%) and α -pinene (3.5% and 37.9%) as the major components, while β -pinene (3.5% and 2.3%) as the minor constituent [19]. Similarly, the essential oil of the aerial parts of *D. muricatus* was reported to contain 18.9% of sabinene, 16.7% of α -pinene, and 14.2% of limonene which were determined as the major constituents along with a minor amount of 2.5% of β -pinene[20].

It should be noted that the proportions of α -pinene and β -pinene found in *D. aristidis* oils from Ghoufi and Boussaada possess the highest percentage ever in comparison with the values found in the oils of the genus *Daucus* reported in the literature.

In addition to α -pinene and β -pinene, the major constituents present in the oils of *D. aristidis* native to Ghoufi and Boussaada were revealed as limonene (7.5%), myrcene (6.7%), and sabinene (4.3%). It was found the presence of these abundant components in the essential oil of *D. carota* subsp. *sativus* during ontogenesis: limonene (4.4% to 12.7%), sabinene (0.2% to 5.3%), myrcene (6.4% to 14.1%), α -pinene (21.2% to 41.2%) and carotol (10.2% -58.5%)[21]. In contrary, carotol was present only in a minor amount (0.1%, 0.5%, and 0.1%) in the umbels, leaves and aerial parts of *D. aristidis* oils from Ghoufi but totally absent in the oil from Boussaada. Similarly, carotol and sabinene were reported to be the major constituents of the oil of *D. carota* fruit from the northern Serbia with proportions of 20.3% and 18.7%, respectively [22]. Besides, the study of *D. carota* subsp. *major* fruit essential oil has proved the presence of geranyl acetate (34.2%), α -pinene (12.9%), geraniol (6.9%), myrcene (4.7%), *epi*- α -bisabolol (4.5%), sabinene (3.3%), and limonene (3%)[23]. In a study conducted on the effect of different vegetative stages on the chemical composition of the oil of *D. sahariensis*, this oil was found to consist of myristicine (29.8% -51.7%), myrcene (6.7% - 31.1%), α -pinene (11.6% -14.8%), and limonene (5.3% -11.5%)[24].

As also commented from findings, variations in chemical composition of the essential oil might be due to several factors, *i.e.* environmental (temperature, humidity, soil texture, altitude, etc.), geographical origin, plant organ, stage of growth, the time of picking, storage of plant material, individual genetic variability, and extraction method[25-30].

Regarding the moderate AChE inhibitory activity of *Daucus aristidis* essential oil, it could be explained by a notable AChE inhibitory activity reported for its individual components, α - and β -pinene. According to the study conducted on the *in vitro* inhibition of human erythrocyte AChE by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and its major monoterpenes including camphor, 1,8-cineole, α -pinene, β -pinene, bornyl acetate, as well as some minor components (1% or less) geraniol, linalool, and γ -terpinene. Consequently, α -pinene, 1,8-cineole and camphor were found to be the competitive reversible inhibitors of AChE and it was suggested that the inhibitory activity of this essential oil was primarily due to main inhibitory terpenoids, which resulted from the major synergistic effect[31]. Besides, the anti-AChE activity of the oil of *Artemisia annua* flower has been mainly attributed to α -pinene, β -pinene, limonene, 1,8-cineole, camphor, borneol, α -terpineol, α -caryophyllene, and α -caryophyllene oxide, furthermore, the different level of the anti-AChE effect of the flower oil of *A. annua* at three flowering stages may have resulted from the different content of those terpenoids and their different interactions with anti-AChE activity [11]. In another study, worked on anti-AChE activity of bicyclic monoterpenoids commonly encountered in essential oils, the results pointed out that the bicyclic monoterpenoids containing allylic methyl group showed a strong inhibition. Moreover, (+) and (-)- α -pinene, and (+)-3-carene were observed to be the potent inhibitors of AChE as well[32]. Similarly, it was described that α -pinene had the strongest AChE inhibition activity followed by β -pinene and limonene on the adult rice weevil, *Sitophilus oryzae* [33]. Relevantly, the relatively high AChE inhibitory activity of *Pinus nigra* subsp. *dalmatica* essential oil was explained by marked AChE inhibitory activity of its main components, α - and β -pinene [34], which is in accordance with our data.

On the other hand, it was suggested for plant extracts or essential oils that is not always necessarily to be only one compound responsible for these effects, which may as well be depend on several compounds that act in a synergistic manner or on compounds which regulate one another because essential oils are complex mixtures of components that show usually higher activities than their isolated components; their final activities are due to the combine effects of several minor components [35].

Acknowledgments

This project is supported by the National Fund for Scientific Research, CNEPRU projects, Ministry of Higher Education and Scientific Research, Algeria. Code N°:F01220140021

References

- [1] A.C. Tavares, M.J. Gonc, A. Cavaleiro, M.T. Cruz, M.L. Lopes, J. Canhoto and L.R. Salgueiro (2008). Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity, *J. Ethnopharmacol.* **119**, 129–134.
- [2] N. Tabanca, B. Demirci, T.Ozek, N. Kirimer, K.H.C. Baser, E. Bedir, I.A.Khan and D.E. Wedge . (2006). Gas chromatographic mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey, *J. Chromatography A.* **1117**, 194–205.
- [3] P. Quezel and S. Santa (1962). [New flora of Algeria and the southern desert regions]. Paris: CNRS; Volume 2, 62-63.
- [4] J.A. Battandier and L.C. Trabut (1902). [Analytical and synoptic flora of Algeria and Tunisia]. Alger: Vve Giralt, 152.
- [5] H.E.A. Saad, S.H. ElSharkawy and A.F. Halim (1995). Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*, *Pharmaceut. Act. Helv.* **70**(1), 79-84.
- [6] V. Kilibarda, N. Nanusevic, N. Dogovic, R. Ivanic and K. Savin (1996). Content of the essential oil of the carrot and its antibacterial activity, *Pharmazie.* **51**, 777-778.
- [7] M. Staniszewska and J. Kula (2001). Composition of the essential oil from wild carrot umbels (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) growing in Poland, *J. Essent. Oil. Res.* **13**, 439-441.
- [8] J. Kula, K. Izydorczyk, A. Czajkowska and R. Bonikowski (2006). Chemical composition of carrot umbels oils from *Daucus carota* ssp. *sativus* cultivated in Poland, *Flavour Fragr J.* **21**, 667-669.
- [9] A. Jabrane, H. Ben Jannet, F. Harzallah-Skhiri, M. Mastouri, J. Casanova and Z. Mighri (2009). Flower and root oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): integrated analyses by GC, GC/MS, and ¹³C-NMR spectroscopy and *in vitro* antibacterial activity, *Chem. Biodivers.* **6**, 881-889.
- [10] H. Marzouki, A. Khaldi, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, P. Mollicotti and S. Zanetti (2010). Essential oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction, *Nat. Prod. Comm.* **5**, 1955-1958.
- [11] Z. Yu, B. Wang, F. Yang, Q. Sun, Z. Yang and L. Zhu (2011). Chemical composition and anti acetylcholinesterase activity of flower essential oils of *Artemisia annua* at different flowering stage, *Iran. J. Pharm. Res.* **10**(2), 265-271.
- [12] I.E. Orhan, G. Orhan and E. Gurkas (2011). An overview on natural cholinesterase inhibitors – a multi-targeted drug class - and their mass production, *Mini. Rev. Med. Chem.* **11**, 836-842.
- [13] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres and R.M. Featherstone (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95.
- [14] M. Elhourri, A. Amechrouq, M. El idrissi and A. Boughdad (2014). Study of the chemical composition and the insecticidal activity of essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) (chenopodiaceae) and *Daucus carota* (L.) ssp. *carota* (apiaceae) on *Bruchus lentis* (coleoptra :chrysomelidae)], *Science Lib.* **6**, 1-19.
- [15] L. Djarri, K. Medjroubi, S. Akkal, A. Elomri, E. Seguin and P. Verité (2006). Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss., *Flavour Fragr. J.* **21**; 647-649.
- [16] T. Smaili, A. Zellagui, P.L. Cioni, G. Flamini (2011). A myristicin-rich essential oil from *Daucus sahariensis* growing in Algeria, *Nat. Prod. Comm.* **6** (6), 883-886.
- [17] N.D.E. Radilovic and S. Stojanovic-Radic' (2011). Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota* – A comparison study, *Food Chem.* **125**, 35–43.
- [18] N. Meliani, M.A. Dib, N. Djaboua, J. Costa, B. Allali-Tabtia and A. Muselli (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus aureus* essential oils from Algeria, *Nat. Prod. Comm.* **8** (6), 835-840.
- [19] A. Maxia, B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda, E. Tuveri, M.J. Gonçalves, C. Cavaleiro and L. Salgueiro (2009). Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast, *Fitoterapia.* **80**, 57–61.
- [20] A. Bendiabdellah, M.A. Dib, N. Djabou, H. Allali, B. Tabti, J. Costa and A. Muselli . (2012). Biological activities and volatile constituents of *Daucus muricatus* L. from Algeria, *Chem. Cent. J.* **6**; 48-58.
- [21] R.S. Verma, R.C. Padalia and A. Chauhan (2014). Chemical composition variability of essential oil during ontogenesis of *Daucus carota* L. subsp. *sativum* (Hoffm.) Arcang., *Ind. Crops Prod.* **52**; 809-814.
- [22] S.B. Glisic, D.R. Misic, M.D. Stamenic, I.T. Zizovic, R.M. Asanin and D.U. Skala (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chem.* **105** (1); 346-352.

- [23] G. Flamini, E. Cosimi, P.L. Cioni, I. Molfetta and A. Braca (2014). Essential oil composition of *Daucus carota* ssp. *major* (Pastinocello Carrot) and nine different commercial varieties of *Daucus carota* ssp. *sativus* fruit, *Chem. Biodivers.* **11**(7);1022-1033.
- [24] G. Flamini, T. Smaili, A. Zellagui, N. Guerraf and P.L. Cioni (2013). Effect of growth stage on essential oil yield and composition of *Daucus sahariensis*, *Chem. Biodevers.* **10**(11),2014-2020.
- [25] S.F. Van Vuuren, A.M. Viljoen, T. Ozek, B. Demirici and K.H.C. Baser (2007). Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity, *S. Afr. J. Bot.* **73**(3), 441-448.
- [26] E.R. Chamorro, G. Ballerini, A.F. Sequeira and G. Velasco (2008). Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *J. Arg. Chem. Soc.* **96**,80-86.
- [27] B.S. Lakušić, M.S. Ristić, V.N. Slavkowska, D.Lj Stojanović and D.V. Lakušić (2013). Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages, *Bot. Serb.* **37**(2), 127-139.
- [28] M. Khajeh, Y. Yamini, N. Bahramifar, F. Sefidkon and M.R. Pirmoradei (2005). Comparison of essential oil composition of *Ferula assafoetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrosistillation methods, *Food Chem.* **91**, 639-644.
- [29] A.M. Viljoen, B. Denirci, K.H.C Baser, C.J. Potgieter, T.J. Edwards (2006). Micro distillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus*(Lamiaceae), *S. Afr. J. Bot.* **72**, 99-104.
- [30] F. Sefidkon, K. Abbasi, Z. Jamzad and S. Ahmadi (2007). The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad., *Food Chem.***100**, 1054-1058.
- [31] N.S.L. Perry, P.J. Houghton, A. Theobald, P. Jenner and E.K. Perry (2000). *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes, *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 895-902.
- [32] M. Miyazawa and C. Yamafuji (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids, *Flavour. Fragr. Chem.* **20**, 617-620.
- [33] S.W. Kim, J. Kang and I.K. Park (2013). Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity, *J. Asia. Pac. Entomol.* **16**, 443-448.
- [34] O. Politeo, I. Botica, T. Bilusic, M. Jukic, I. Carev, F. Burculand M. Milos. (2011). Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco., *J. Med. Plants Res.* **5**(30), 6590-6596.
- [35] I.E. Orhan, M. Kartal, Y. Kan and B. Sener (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase, *Z. Naturforsch Sect. C.* **63**,547-553.

المخلص

تظهر النباتات الطبية قدرات متزايدة الأهمية فيما يتعلق بنشاطيتها البيولوجية الشبه خالية أو الخالية تماما من الآثار الجانبية. لهذا الغرض، تمت دراسة نوعين نباتيين: *Ammiopsis aristidis* (العائلة الكرفسية) من غوفي (باتنة) وواد العرعار (بوسعادة، المسيلة) و *Achillea santolinoides* (العائلة النجمية) من الحلفة. تم الحصول على الزيوت الأساسية للأجزاء المختلفة من كل نبتة عن طريق التقطير المائي باستخدام جهاز الاستخلاص من نوع Clevenger. ثم تم إجراء التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بتقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة. وقد تم تقدير النشاطية الضد ميكروبية للزيوت الأساسية نوعيا على 6 سلالات ميكروبية بواسطة تقنية الانتشار على الوسط الصلب ثم كميًا عن طريق تحديد التركيز الأدنى المثبط. بموازاة ذلك، تم اختبار النشاطية المضادة للأكسدة للزيوت الأساسية بواسطة تقنية DPPH واختبار تبييض حمض β كاروتين / حمض اللينوليك كما تم كذلك تقييم النشاط المثبط للأسيتيل كولين استراز و بوتيريل كولين استراز للزيوت الأساسية بواسطة طريقة Ellman. واستخدمت الحشرة *Tribolium confusum* لاختبار التأثير المبيد للحشرات للزيوت الأساسية. وقد تم أيضا دراسة قدرة الزيوت الأساسية على حماية البروتينات من التمسخ. كشف التحليل الكيميائي للأجزاء المختلفة من *Ammiopsis aristidis* من غوفي والجزء الهوائي ل *A. aristidis* (بين α -pinene و 43.5% و 74.1%) و β pinene (بين 7.5% و 19.2%) مكونات اساسية على التوالي. تحتوي الزيوت في الأجزاء المختلفة من *Achillea santolinoides* أساسا على camphre (بين 60.8% و 62%) و Cineole (بين 14.1% و 15.7%). وأظهر الاختبار المضاد للميكروبات نشاطا امتد بين المقاومة والحساسية لجميع السلالات المختبرة. القيم الواعدة للتركيز الدنيا المثبطة هي تلك المسجلة من زيت اوراق *A. aristidis* والجزء الهوائي من *A. santolinoides* (4.64 ملغ / مل و 3.12 ملغ / مل) ضد *S. aureus* على التوالي. زيت الأزهار ل *A. aristidis* أظهر أكبر نشاط مضاد للأكسدة باستخدام فحص إزاحة الجذور الحرة DPPH بنسبة تثبيط $75.75 \pm 1.40\%$ ولكن نسبة تثبيط زيوت *A. santolinoides* كانت منخفضة نسبيا. وقد أظهرت هذه الزيوت أيضا تأثير مثبط لأكسدة الدهون وقدرة على حماية البروتينات من التمسخ مرتبطين بالجرعة. الزيوت الأساسية ل *A. aristidis* من غوفي وبوسعادة لها نشاط تثبيطي معتدل لانزيمي BChE وAChE، بينما كان هذا النشاط منخفضا لزيوت *A. santolinoides* مقارنة ب *Ghalanthamine*. ووجد أن زيوت *Ammiopsis* و *Achillea* سامة لحشرة *Tribolium confusum* و قدرت الجرعة القاتلة (DL_{50}) ب (0.13 ميكرو لتر / سم² و 0.10 ميكرو لتر / سم² على التوالي).

الكلمات المفتاحية: العائلة الكرفسية - العائلة النجمية - الزيوت الأساسية - النشاط المضاد للميكروبات - النشاط المضاد للأكسدة - مضاد الكولين استراز - مبيد الحشرات.

Résumé

Les plantes médicinales montrent de plus en plus des effets significatifs concernant leurs pouvoirs biologiques totalement ou presque exemptes d'effets secondaires. Pour cet objectif, deux espèces ont fait l'objet de cette étude : *Ammiopsis aristidis* (syn : *Daucus aristidis*) (Apiaceae) provenant de Ghoufi (Batna) et Oued Arrar (Boussâada, M'sila) et *Achillea santolinoides* (Asteraceae) provenant de Djelfa. Les HE ont été obtenues par hydrodistillation en utilisant un appareil d'extraction de type Clevenger. L'analyse des HE a été faite par CPG/FID et CPG/SM. L'activité antimicrobienne des HE a été estimée qualitativement sur 6 souches microbiennes par la technique de diffusion sur gélose puis quantitativement en déterminant la CMI. En parallèle, l'effet antioxydant des HE a été testé par la technique du DPPH et par le test du blanchiment du β -carotène/acide linoléique. L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et du butyrylcholinestérase des HE a été évaluée par la méthode d'Ellman. L'insecte *Tribolium confusum* a été utilisé pour tester l'effet insecticide de ces huiles. Ces dernières ont été également étudiées pour leurs pouvoirs dénaturants des protéines. L'analyse chimique des huiles des différentes parties d'*A. aristidis* de Ghoufi et la partie aérienne de Boussâada a révélé la présence de l' α -pinène (entre 43.5% et 74.1%) et β -pinène (entre 7.5% et 19.2%) comme composants majoritaires. Les huiles des différentes parties d'*A. santolinoides* contiennent principalement le camphre (entre 60.8% et 62%) et le 1,8 cinéole (entre 14.1% et 15.7%). Le test antimicrobien a montré une activité allant de la résistance à la sensibilité sur l'ensemble des souches testées. Les valeurs des CMI les plus prometteuses sont celles des huiles des feuilles d'*A. aristidis* et de la partie aérienne d'*A. santolinoides* avec des valeurs CMI de 4.64 mg/ml et de 3.12 mg/ml contre *S. aureus* respectivement. L'huile des fleurs d'*A. aristidis* présente l'activité antiradicalaire la plus importante en utilisant le test de piégeage du radical libre DPPH avec un pourcentage d'inhibition de $75.75 \pm 1.40\%$; cependant, l'activité des huiles d'*A. santolinoides* est relativement faible par rapport à celle du BHT. Ces huiles ont également montré une activité dose-dépendante de l'inhibition de la peroxydation lipidique et de la dénaturation des protéines. Les huiles d'*A. aristidis* de Ghoufi et de Boussâada ont une activité inhibitrice de l'AChE et du BChE modérée cependant les huiles d'*A. santolinoides* ont une activité anticholinestérase faible par rapport à celle de la Galanthamine. Les huiles d'*Ammiopsis* et d'*Achillea* se sont révélées toxiques à l'égard de l'insecte *Tribolium confusum* (DL_{50} : 0.13 μ l/cm² et 0.10 μ l/cm² respectivement).

Mots clés: Apiaceae - Asteraceae - huiles essentielles - activité antimicrobienne - antioxydante, anticholinestérase - insecticide.

Abstract

Medicinal plants show increasingly significant capacities regarding their biological powers totally or almost free of side effects. For this purpose, two species were studied: *Ammiopsis aristidis* (syn: *Daucus aristidis*) (Apiaceae) from Ghoufi (Batna) and Oued Arrar (Boussâada, M'sila) and *Achillea santolinoides* (Asteraceae) from Djelfa. EOs of each plant was obtained by steam distillation of their different parts using a Clevenger type extraction apparatus. The Analysis of the EOs was carried out by gas chromatography coupled with mass spectrometry GC/FID and GC/MS. The antimicrobial activity of the EOs was estimated qualitatively on 6 microbial strains by the agar diffusion method and then quantitatively by determining the MIC. In parallel, the antioxidant effect of the EOs was tested by the DPPH method and the bleaching of β -carotene / linoleic acid assay. The inhibitory activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of the EOs was evaluated by the Ellman method. The insect *Tribolium confusum* was used to test the insecticidal effect of the EOs. These latter have also been the subject of the study of their denaturing power of proteins. Chemical analysis of the different parts of *A. aristidis* from Ghoufi and the aerial part from Boussâada revealed the presence of α -pinene (between 43.5% and 74.1%) and β -pinene (between 7.5% and 19.2%) as major compounds. The oils of the different parts of *A. santolinoides* contain mainly camphor (between 60.8% and 62%) and 1.8 Cineole (between 14.1% and 15.7%). The antimicrobial test showed an activity ranging from resistance to susceptibility on all strains tested. The most promising MIC values are those of leaves oil of *A. aristidis* and the aerial part of *A. santolinoides* with MIC values of 4.64 mg / ml and 3.12 mg / ml against *S. aureus* respectively. The flowers oil of *A. aristidis* exhibits the highest antiradical activity by DPPH free radical scavenging assay with an inhibition percentage of $75.75 \pm 1.40\%$ however the activity of *A. santolinoides* oils is relatively low compared to that of BHT. These oils have also shown a dose-dependent activity of the lipid peroxidation and protein denaturation inhibition. The oils of *A. aristidis* from Ghoufi and Boussâada have a moderate AChE and BChE inhibitory activity, but the oils of *A. santolinoides* have a low anticholinesterase activity compared to that of the Galanthamine. *Ammiopsis* and *Achillea* oils were found to be toxic to the *Tribolium confusum* insect (LD_{50} : 0.13 μ l / cm² and 0.10 μ l / cm² respectively).

Keywords: Apiaceae – Asteraceae - essential oils - antimicrobial activity - antioxidant activity- anticholinesterase- insecticide.