

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ECOLOGIE VEGETALE

N° /SNV/2018

THÈSE

Présentée par

BOUCHAALA Meriem

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: Valorisation et Protection de la Biodiversité Végétale

THÈME

Etude phytochimique, caryologique et activités biologiques des huiles essentielles du genre *Helichrysum* Auct. Plur. de l'Est Algérien

Soutenue publiquement le : 28 / 02 / 2019

DEVANT LE JURY

Président	Laouer Hocine	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Ramdani Messaoud	Pr. UFA Sétif 1
Co-directeur	Chalard Pierre	Pr. Univ. Clermont Ferrand, France
Examinateurs	Lograda Takia	Pr. UFA Sétif 1
	Akkal Salah	Pr. Univ. Constantine 1
	Yahia Abdelouahab	Pr. Univ. Mila

الملخص

تم استخلاص الزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية للنباتات ، *Helichrysum italicum var. numidicum* وتحت النوعين *H. stoechas ssp. rupestre*، *H. stoechas ssp. scandens* و *H. lactuem var. typicum*. التي تم الحصول عليها من شرق الجزائر بواسطة التقطير المائي. أسفرت عملية الاستخلاص عن سائل لزج مع مردود ضعيف قدر بـ 0.025 %. أظهر التحليل الكيميائي للزيوت العطرية للنباتات *Helichrysum* بواسطة كروماتوغرافية المزاوجة بالمطيافية الكتالية GC-SM وجود 46 مركب مع وجود تباين كبير بين هذه الأنواع. يؤكد التحليل الإحصائي انفصال أنواع جنس *Helichrysum* . أظهر تقييم النشاطية ضد الميكروبية للزيوت الأساسية لأنواع من *Helichrysum* تأثيراً متواضعاً ضد جميع البكتيريا التي تم اختبارها، في حين أنها لم تظهر أي نشاط ضد الخميرة *Candida albicans* . تقييم نشاط السمية الخلوية للزيوت الأساسية لأنواع التابعة للجنس *Helichrysum* على خلايا سرطانية MCF-7، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الزيوت الأساسية لأنواع جنس *Helichrysum* ليس لها أي نشاط سمي على الخلايا السرطانية MCF-7 مكنت الدراسة الكاريولوجية لأنواع من جنس *Helichrysum* من تحديد عدد كروموسومي رباعي الصيغة الصبغية $2n=4x=28$ مع العدد الأساسي $x=7$ لكل الأنواع المدروسة التابعة لهذا الجنس.

الكلمات المفتاحية: *Helichrysum*، زيت أساسى، تركيب كيميائى، دراسة كاريولوجية، كروموسوم، السمية الخلوية ، نشاط مضادات الميكروبات، MCF-7 ، الجزائر.

Résumé

L'extraction des parties aériennes des huiles essentielles d'*Helichrysum italicum* var. *numidicum*, d'*H. lactuem* var. *typicum* et des deux sous-espèces, *H. stoechas* ssp. *scandens* et *H. stoechas* ssp. *rupestre*, de l'Est Algérien a été réalisée par hydrodistillation. L'extraction a donné un liquide visqueux avec un rendement moyen faible de 0,025%. La composition chimique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* a été analysée par GC et GC/SM. Cette analyse a permis d'identifier 46 composés avec la présence d'une variabilité interspécifique importante. L'analyse statistique confirme la séparation des espèces du genre *Helichrysum*. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du genre *Helichrysum* a montré un effet modeste contre toutes les bactéries testées, alors qu'elles ne présentent aucune activité antifongique significative contre *Candida albicans*. L'évaluation de l'activité cytotoxique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* a été réalisée sur une lignée des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles des espèces n'ont aucune activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses MCF-7. L'étude caryologique du genre *Helichrysum* a permis de déterminer un nombre chromosomique tétraploïde $2n= 4x= 28$ avec un nombre de base $x = 7$ pour chacune de ses espèces.

Mots clefs: *Helichrysum*, Huile essentielle, Composition chimique, Caryologie, Chromosome, Activité antimicrobienne, Cytotoxicité, MCF-7, Algérien

Abstract

The extraction of aerial parts of the essential oils of *Helichrysum italicum* var. *numidicum*, *H. lacteum* var. *typicum* and both subspecies, *H. stoechas* ssp. *rupestre* and *H. stoechas* ssp. *scandens*, from Eastern Algeria was carried out by hydrodistillation. Extraction gave a viscous liquid with a low average yield of 0.025%. The chemical composition of the essential oils of the genus *Helichrysum* was analyzed by GC and GC / MS. This analysis identified 46 compounds with the presence of significant interspecific variability. The statistical analysis confirms the separation of species of the genus *Helichrysum*. The evaluation of the antimicrobial activity of *Helichrysum* essential oils showed a modest effect against all bacteria tested, while they show no significant antifungal activity against *Candida albicans*. The evaluation of the cytotoxic activity of the essential oils of the species of the genus *Helichrysum* was carried out on a line of MCF-7 mammary cancer cells. The results obtained showed that the essential oils of the species have no cytotoxic activity on MCF-7 cancer cells. The karyology study of the genus *Helichrysum* made it possible to determine a tetraploid chromosomal number $2n = 4x = 28$ with a base number $x = 7$ for each of its species.

Keywords: *Helichrysum*, Essential oil, Chemical composition, Caryology, Chromosome, Cytotoxicity, antimicrobial activity, MCF-7, Algerian.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qui il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance..

Pouss, c'est tout simplement que

Je dédie cette Thèse...

A LA MEMOIRE DE MON TRES CHER PERE

A celui qui m'a aidé à découvrir le 'savoir', ce trésor inépuisable. De tous les pères, tu as été le meilleur, tu as su m'entourer d'attention, m'inculquer les valeurs nobles de la vie, m'apprendre le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité. Merci d'avoir été toujours là Pour moi. Tu as été et tu seras toujours un exemple à suivre pour tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme. Des mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon respect, ma considération, ma reconnaissance et mon amour éternel. Tu resteras à tout jamais dans mon cœur.

A MA TRES CHERE MERE

Honorale, aimable, Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A MES TRES CHERS FRERES

Redouane, Khalil et Anis

*Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour et mon attachement.
Puisse nos fraternelles liens se pérenniser et consolider encore. Je ne pourrais
d'aucune manière exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude
pour tous les sacrifices consentis. Votre aide et votre générosité extrêmes ont été
pour moi une source de courage, de confiance et de patience.*

A MON TRES CHER MARI OMED

*Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière
de mon chemin. Ma vie à tes cotés est remplie de belles surprises. Tes sacrifices,
ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement
m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes
encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que Dieu réunisse nos chemins
pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma
reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

A MA BELLE FAMILLE

*Je vous remercie tout particulièrement pour votre soutien et affection. Puissiez-
vous trouver dans ce travail le témoin de mon affection et estime.*

Remerciements

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel Proust

La soutenance d'une thèse marque assurément la fin d'une étape dans la vie d'un chercheur. Je voudrais saisir cette occasion pour exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont soutenu, encouragé à poursuivre ce travail et à le finir.

*Mes remerciements vont, en premier lieu à mon professeur et directeur de thèse monsieur **Ramdani Messaoud** qui m'a initié à la recherche, qui a su grâce à son savoir et son bon sens, m'orienter dans la bonne voie, qui avec sa générosité et sa patience, a guidé mes pas dans la recherche , qui a su m'obliger à aller toujours plus en avant, et m'a prodigué les conseils judicieux qui ont aidé à mener à bien cette recherche. Qu'il trouve, dans l'aboutissement de ce travail, l'expression de l'inférie reconnaissance de l'apprenant respectueux et fidèle.*

*Un grand merci à monsieur le Professeur **Chalard Pierre** de l'Université Clermont Ferrand, France qui m'a accueilli et qui a été attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.*

*J'aimerais également exprimer ma gratitude à Monsieur **Gilles Figueredo**, Directeur de LEXVA Analytique pour son aide dans la réalisation de l'analyse phytochimiques.*

*Tout le respect pour le Professeur **Grada Takia** de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, pour sa participation, son aide et ces conseils éclairés au cours de la préparation de ce travail.*

*A monsieur le Professeur **Laouer Houcine** de l'université Ferhat Abbas Sétif 1, président du jury de thèse qui a accepté de consacrer son temps en examinant le manuscrit. J'en suis honoré et je lui exprime toute ma profonde reconnaissance.*

*Mes remerciements vont également aux respectueux Professeurs **Akkal Salah** de l'Université de Constantine 1 et **Yahia Abdelouahab** de l'Université de Mila qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et dont les remarques étaient bénéfiques et importantes pour ce mémoire.*

*Je remercie madame **Boukhebtı habiba** pour son aide, ces conseils et sa gentillesse.*

*Je tiens à remercier Madame **Decombat Caroline**, Maitre de conférence, et Madame **Caldefie-Chezei Florence**, Professeur à L'Université de Clermont, France, pour m'avoir accueilli au sein de laboratoire Science Végétale et Fongiques pharmaceutique, pour sa disponibilité et ces précieux conseils.*

Pour tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien moral pendant ces années d'études, je les remercie sincèrement.

Enfin, un très grand MERCI à toute ma famille qui m'a gratifié de son amour et fourni les motivations qui ont permis l'aboutissement de mes entreprises. Je leur adresse toute ma gratitude du fond du cœur.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Position taxonomique de la famille des <i>Asteraceae</i>	25
Tableau 2 : Variabilité du nombre chromosomique dans le genre <i>Helichrysum</i>	33
Tableau 3 : Occurrence de la ploïdie chez le genre <i>Helichrysum</i>	35
Tableau 4 : Composition chimique d'huiles essentielles des espèces du genre <i>Helichrysum</i>	66
Tableau 5 : Classes chimiques et Composés majoritaires d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>rupestris</i>	69
Tableau 6 : Classes chimiques et Composés majoritaires d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>	72
Tableau 7 : Classes chimiques et Composées majoritaires chez <i>H. lacteum</i>	75
Tableau 8 : Classes chimiques et Composés majoritaires d' <i>H. italicum</i>	78
Tableau 9 : Activité antimicrobiennes d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>rupestris</i>	91
Tableau 10 : Activité antimicrobiennes d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>	93
Tableau 11 : Activité antimicrobiennes d' <i>H. italicum</i> var. <i>numidicum</i>	94
Tableau 12 : Activité antimicrobiennes d' <i>H. lacteum</i> var. <i>typicum</i>	95

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Quelques organes sécréteurs d'huiles essentielles	5
Figure 2 : Structure chimique de quelques monoterpènes des HE	10
Figure 3 : Structure chimique de quelques sesquiterpènes des HE	11
Figure 4 : Structure chimique de quelques composés aromatiques des HE	12
Figure 5 : Biosynthèse des terpènes	13
Figure 6 : Exemple de biosynthèse des dérivés de phénylpropanoides	14
Figure 7 : Schéma du procédé de la Hydrodistillation	16
Figure 8 : Schéma de montage de l'entraînement à la vapeur d'eau	17
Figure 9 : Schéma du dispositif de l'hydrodiffusion	18
Figure 10 : Réparation géographique du genre <i>Helichrysum</i>	30
Figure 11 : Distribution géographique d' <i>Helichrysum stoechas</i>	31
Figure 12 : Le niveau de polyplioïdie dans le genre <i>Helichrysum</i>	35
Figure 13 : Le pourcentage de niveaux de ploïdie dans le genre <i>Helichrysum</i>	36
Figure 14 : <i>Helichrysum stoechas</i> ssp. <i>rupestris</i>	42
Figure 15 : <i>Helichrysum stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>	43
Figure 16 : <i>Helichrysum lacteum</i> var. <i>typicum</i>	44
Figure 17 : <i>Helichrysum italicum</i> var. <i>numidicum</i>	45
Figure 18 : Zone d'échantillonnage des espèces du genre <i>Helichrysum</i>	46
Figure 19 : Dispositif d'extraction des huiles essentielles, type Clevenger	48
Figure 20 : Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme	51
Figure 21 : La réduction de la résazurine en résorufine	54
Figure 22 : Schémas de la gamme de criblage des huiles essentielles	56
Figure 23 : GC/MS profile d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>rupestris</i> (a : GC/Fid – b : GC/Mas)	62
Figure 24 : GC/MS profile d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>scandens</i> (a : GC/Fid – b : GC/Mas)	63
Figure 25 : GC/MS profile d' <i>H. lacteum</i> var. <i>typicum</i> (a : GC/Fid - b : GC/Mas)	64
Figure 26 : GC/MS profile d' <i>H. italicum</i> var. <i>numidicum</i> (a : GC/Fid – b : GC/Mas)	65
Figure 27 : Classes chimiques dans l'huile essentielle d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>rupetsre</i>	71
Figure 28 : Classes chimiques dans l'huile essentielle d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>	73
Figure 29 : Classes chimiques dans l'huile essentielle d' <i>H. lacteum</i>	77

Figure 30 : Classes chimiques dans l'huile essentielle d' <i>H. italicum</i>	79
Figure 31 : Variation de la concentration des composés majoritaires	80
Figure 32 : Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x2)	81
Figure 33 : Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x3)	82
Figure 34 : Projection des espèces du genre <i>Helichrysum</i> sur le plan (1x2)	83
Figure 35 : Projection des espèces du genre <i>Helichrysum</i> sur le plan (1x3)	84
Figure 36 : Projection spatiale des six espèces du genre <i>Helichrysum</i>	84
Figure 37 : UPGMA cluster des espèces du genre <i>Helichrysum</i>	85
Figure 38 : UPGMA cluster des espèces <i>H. stoechas</i> du genre <i>Helichrysum</i>	87
Figure 39 : UPGMA cluster des espèces <i>H. italicum</i> du genre <i>Helichrysum</i>	88
Figure 40 : UPGMA cluster des espèces du genre <i>Helichrysum</i>	89
Figure 41 : Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>rupestre</i>	92
Figure 42 : Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>	93
Figure 43 : Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>H. italicum</i> var. <i>numidicum</i>	94
Figure 44 : Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>H. lacteum</i> var. <i>typicum</i>	96
Figure 45 : Cytotoxicité des huiles essentielles des espèces du genre <i>Helichrysum</i>	98
Figure 46 : Plaque métaphasique des cellules méristimatiques racinaires des espèces du genre <i>Helichrysum</i>	101

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP : Analyse en Composantes Principales

AFNOR : Association Française de Normalisation

APG I : The Angiosperm Phylogeny Group, 1998

APG III : The Angiosperm Phylogeny Group, 2009

ATCC : American Type Collection Culture

CCM : Chromatographie sur couche mince

CG/FID : Chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse

CGP : Chromatographie en Phase Gazeuse

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CS : Colistin

CTX : Cefotaxime

DMAPP : Diméthylallyl diphosphate

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

ECD : Détecteur à capture d'électron

FPP : Farnésyl pyrophosphate

GENT : Gentamicine

GGPP : Géranylgeranyle pyrophosphate

Gln : Glutamine

GPP : Géranyl pyrophosphate

HCL : Acide chlorydrique

HE : Huiles Essentielle

Hinton MH : Milieu de Mueller

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice médiane

IK : Indice de Kovats

IPP : Isopentényle pyrophosphate

IPPS : Isopentényle pyrophosphate isomérase

IR : Indice de Rétention

ISO : Organisation Internationale de normalisation

MCF-7 : Acronyme de Michigan Cancer Fondation 7

MVA : Acide mévalonique

PBS : Phosphate Buffered Saline

PEP : Phosphoénol pyruvate

RMN-13C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13

RMN-1H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

RPMI : Roswell Park Mémorial Institute medium

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TR : Temps de Rétention

TSD : Détecteur termo-ionique spécifique

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

VRBN : Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Introduction	1
--------------	---

Chapitre I. Généralités

1- Généralités sur la famille des Astéracées	3
1-1- La famille des <i>Asteraceae</i>	3
1-1-1- Description botanique	3
1-1-2- Systématique	3
1-1-3- Intérêts des <i>Asteraceae</i>	5
1-1-3-1- Intérêts économiques	5
1-1-3-2- Intérêts thérapeutiques	5
1-2- La tribu des <i>Gnaphalieae</i>	6
1-3- Le genre <i>Helichrysum</i>	7
1-3-1- Description botanique du genre	7
1-3-2- Réparation géographique du genre	8
1-3-3- Caryologie du genre	10
1-3-4- Utilisations médicinales des huiles essentielles du genre <i>Helichrysum</i>	16
1-3-5- Activité biologique des huiles essentielles du genre <i>Helichrysum</i>	17
1-3-6- Composition chimique des huiles essentielles du genre <i>Helichrysum</i> dans la littérature	18
2- Les huiles essentielles	20
2-1- Définition	20
2-2- Répartition, localisation et fonction des huiles essentielles	21
2-3-Rôle des huiles essentielles	22
2-4 Variation de la composition des huiles essentielles	23
2-4-1- Facteurs intrinsèques	23
2-4-2- Facteurs extrinsèques	23
2-5- Secteurs d'application des huiles essentielles	24
2-6- Conservation des huiles essentielles	25
2-7- Composition chimique des huiles essentielles	26
2-7-1- Les composés terpéniques	26

SOMMAIRE

2-7-2- Les composés aromatiques	28
2-7-3- Les composés d'origine diverses	28
2-8- Biosynthèse des constituants d'huiles essentielles	29
2-8-1- Biosynthèse des terpènes	29
2-8-2- Biosynthèse des composés aromatiques	30
2-9- Procédés d'extraction des huiles essentielles	31
2-9-1- Hydrodistillation	32
2-9-2- Entraînement à la vapeur d'eau	33
2-9-3- L'hydrodiffusion	34
2-10- Activités biologiques des huiles essentielles	35
2-11-Méthodes d'analyse des huiles essentielles	37
2-11-1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	38
2-11-2-Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (GC/SM)	39

Chapitre II. Matériel et méthodes

1- Matériel végétal	41
1-1- Description des espèces échantillonnées	41
1-1-1- <i>Helichrysum stoechas</i>	41
1-1-1-1- <i>Helichrysum stoechas</i> ssp. <i>rupestre</i>	41
1-1-1-2- <i>Helichrysum stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>	42
1-1-3- <i>Helichrysum lacteum</i>	43
1-1-4- <i>Helichrysum italicum</i>	44
1-2- Lieux de récolte des espèces étudiées (Zone d'étude)	45
2- Méthodes expérimentales	47
2-1- Extraction des huiles essentielles	47
2-1-1- Calcule du rendement en huile essentielle	48
2-2- Analyse chimique des huiles essentielles	49
2-3- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	50
2-3-1- Préparation des milieux de culture	50
2-3-2- Test de l'activité antibactérienne	50
2-3-3- Préparation de l'inoculum	51
2-3-4- Ensemencement	52

SOMMAIRE

2-3-5- Préparation des disques	53
2-3-6- Incubation et lecture	53
2-4- Evaluation de l'activité cytotoxique des huiles essentielles <i>in vitro</i>	53
2-4-1- Le test à la résazurine	53
2-4-2- Intensité de fluorescence	54
2-4-3- Mode opératoire	54
2-5- Technique caryologie	57
2-5-1- Prétraitement	57
2-5-2- Fixation	57
2-5-3- Maturation	58
2-5-4- Coloration et Technique d'écrasement (Squash)	58
2-5-5- Observation et photographie	59
2-5-6- Montage et conservation des préparations	59
2-6- Techniques numériques d'analyse des données	60
2-6-1- Analyse en Composantes Principales (A.C.P.)	60
2-6-2- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)	60

Chapitre III: Résultats et Discussions

1- Résultats chimiques	61
1-1- Le rendement	61
1-2- Analyse des huiles essentielles	62
1-2-1- Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>rupestre</i>	69
1-2-2- Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>H. stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>	71
1-2-3- Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>H. lacteum</i> var. <i>typicum</i>	74
1-2-4- Composition de l'huile essentielle d' <i>H. italicum</i> var. <i>numidicum</i>	77
1-3- Analyse en composantes principales (ACP)	80
1-3-1- Etude des variables	80
1-3-1-1- Matrice de corrélation	80
1-3-1-2- Cercle des corrélations	81
1-3-2- Etude des individus (espèces) du genre <i>Helichrysum</i>	83
1-4- Analyse UPGMA	85
1-5- Chimiotypes des espèces du genre	86

SOMMAIRE

2- Résultats microbiologiques	91
3- Résultats de l'activité cytotoxique	98
4- Résultats Caryologique	100
Conclusion	103
Références Bibliographiques	105
Annexe	

INTRODUCTION

Introduction

L'Algérie est un pays possédant d'importantes richesses en ressources phylogénétiques. Grâce à sa position géographique, à la diversité pédoclimatique, et sa flore et faune méditerranéenne, elle est considérée comme une zone disposant géographiquement d'un haut potentiel de variabilité génétique et d'une large gamme d'écosystèmes.

Divers botanistes ont contribué à faire connaître la flore d'Algérie. Parmi eux, Quézel et Santa (1963) et Ozenda (1977). Mais jusqu'à aujourd'hui aucun document d'ensemble ne fut publié.

La flore Algérienne reste mal connue, inexploitée, très peu étudiée en plus du danger de disparition qu'elle en court. En effet, 640 espèces sont considérées comme rares et menacées d'extinction, tandis que 168 espèces endémiques algériennes sont absolument à protéger, d'où l'urgence à étudier ces ressources et de mettre au point un plan pour leur sauvegarde et leur préservation.

L'étude caryologiques jouent un rôle principal dans les recherches systématiques en vue de compréhension des relations phylogénétiques les processus de spécialisation (Stebbins, 1971). Le comptage chromosomique consiste à déterminer le nombre chromosomique permettant d'établir des relations phylogénétiques entre espèces d'un même genre ou entre genres d'une même famille. Mais, leur développements est étroitement liée a l'évolution es techniques démarquages des chromosomes.

En effet les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique considérable dans plusieurs secteurs, tels que l'industrie cosmétique, l'industrie agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique. Les plantes représentent un réservoir immense de composé du métabolisme secondaire qui a l'avantage d'avoir une grande diversité structurale et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques.

Dans le cadre de la valorisation et la protection de la flore algérienne, nous nous sommes particulièrement intéressés au genre *Helichrysum*, qui est représenté dans notre pays par trois espèces et de sous-espèces. Certaines d'entre elles sont utilisées comme plantes médicinales dans les pays du pourtour méditerranéen et renferment une huile essentielle parfumée.

INTRODUCTION

Une première partie de ce travail est basée sur l'étude phytochimique, en prospectant le profil chimique des espèces de ce genre, en utilisant les différentes techniques de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse. Une deuxième partie de ce travail a fait l'objet de l'étude des activités biologiques des huiles essentielles de nos espèces. La troisième partie s'est consacrée à la caractérisation génétique des espèces en utilisant la caryologie pour le dénombrement chromosomique dans l'étude phylogénique.

CHAPITRE I

GENERALITES

1- Généralités sur les Astéracées

1-1- La famille des *Asteraceae*

La famille des Astéracées, étymologiquement, ce terme vient du grec *aster*, rappelant la forme des fleurs en étoile. La famille des *Asteraceae*, aussi appelée *Compositeae*, est la plus vaste la plus diversifiée des familles de plantes à fleurs. Il s'agit d'une famille cosmopolite. Elle est principalement distribuée en région tempérée, subtropicale et tropicale, souvent en région montagneuse (Cronquist, 2001; Singh, 2004). Elle comprend en effet entre 1600 et 1700 genres et de 24000 à 30000 espèces décrites (Funk *et al.*, 2005), dont 750 espèces endémiques (Gaussin et Leroy, 1982; Guignard, 1994). En Algérie, cette famille regroupe 408 espèces réparties sur 109 genres (Quézel et Santa, 1963).

1-1-1- Description botanique

Les Astéracées sont généralement des plantes herbacées érigées ou grimpantes, annuelles, bisannuelles ou pérennes, parfois des arbustes et plus rarement des arbres (Guichard, 2002). Les feuilles sont le plus souvent alternes, opposées ou verticillées, simples, parfois profondément lobées ou découpées, à nervation généralement pennée ou palmé (Usher, 1966; Gaussin et Leroy, 1982). L'inflorescence est indéterminée, les fleurs hermaphrodites ou unisexuées, parfois stérile, actinomorphes ou zygomorphes, sont aggrégées en capitules, entourés par un involucre de bractées, terminales ou axillaires.

Les sépales profondément modifiés, forment un pappus composé de deux à nombreuses écailles. Le grain de pollen est généralement tricolporés (Judd *et al.*, 1999). Les fruits sont des akènes, souvent couronnée généralement d'une aigrette de soie appelée *pappus* qui favorise la dispersion des graines par le vent (Usher, 1996). La graine est exalbuminée (Cronquist, 2001; Spichiger, 2002; Singh, 2004).

1-1-2- Systématique

Selon la classification établie par Cronquist (1988), les *Asteraceae* sont des dicotylédones, appartenant à l'ordre des *Asterales*. Dans la classification APG III,

l'ordre des *Asterales* contient 11 familles, dont la famille des *Asteraceae* (source «The Angiosperm Phylogeny Group, 2009 » (Tableau 1)).

Tableau 1: Position taxonomique de la famille des *Asteraceae*

Classification selon Cronquist (1988)		APG III (2009)
Règne		<i>Plantae</i>
Sous-Règne		<i>Tracheobionta</i>
Embranchement		<i>Spermaphytes</i>
Sous-Embranchement	<i>Angiospermes</i>	Clade
Classe	<i>Magnoliopsida (Dicotylédones)</i>	
	<i>Eudicotylédones</i>	Clade
	<i>Eudicotylédones supérieures</i>	Clade
Sous-classe	<i>Asterideae</i>	Clade
	<i>Campanulidae= Euasteridae II</i>	Clade
Ordre	<i>Asterales</i>	Ordre
Famille	<i>Asteraceae</i>	Famille
	<i>Asteroideae</i>	Sous-Famille
Tribu	<i>Gnaphalieae</i>	Tribu
Genre	<i>Helichrysum</i>	Genre

La classification n'a pas subi de grands changements depuis la première classification APG I en 1998 (The Angiosperm Phylogeny Group, 1998), si ce n'est des remaniements de familles.

La famille des *Asteraceae* est divisée en sous-familles, elles-mêmes divisées en tribus, bien que leurs nombres, noms et compositions varient selon les auteurs et dans le temps. Bremer en 1994, reconnaissait trois sous-familles *Asteroideae*, *Barnadesioideae* et *Cichorioideae*, divisées en 17 tribus (Bremer, 1994). Depuis, la famille des *Asteraceae* a fait l'objet de constants remaniements quant à ses divisions, notamment grâce aux récents travaux de biologie moléculaire et au nombre croissant de nouveaux échantillons. Actuellement, il existe 12 sous-familles au sein des *Asteraceae*, incluant elles-mêmes 43 tribus dont la tribu des *Gnaphalieae* (Funk *et al.*, 2009; Reveal, 2012; Angiosperm Phylogeny, 2014).

1-1-3- Intérêts des Asteraceae**1-1-3-1- Intérêts économiques**

Certaines espèces *d'Asteraceae* sont des plantes ornementales, comme les Asters, les Dahlias, les Chrysanthèmes, les Gerberas, les Zinnias, *Tagetus* et le genre *Helichrysum* (Singh, 2004). D'autres espèces sont à la base de l'alimentation comme la laitue (*Lactuca sativa*), l'artichaut (*Cynara scolymus*), l'endive (*Cichorium intybus*), la chicorée (*Cichorium intybus*), l'estragon (*Artemisia dracunculus*) et du tournesol (*Helianthus annuus*).

Autres espèces oléagineuse appartenant à la famille des *Asteraceae* comme le carthame des teinturiers ou le safran des teinturiers (*Carthamus tinctorius*), le tournesol *Helianthus annuus*), dont l'huile végétale extraite est à usage alimentaire, énergétique ou industriel (Li *et al.*, 1996; Zehra, 2005; Demirbaş and Kara, 2006 ; Sensöz and Angin, 2008).

Cette famille regroupe également un grand nombre de plantes adventices (mauvaises herbes) (chardons, par exemple) qui causent des pertes économiques pour de nombreuses cultures (Heywood, 1985).

1-1-3-2- Intérêt thérapeutique

La famille des *Asteraceae* offre des espèces très importantes d'un point de vue thérapeutique. 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.

Actuellement, quarante-trois espèces *d'Asteraceae* sont inscrites dans la liste des plantes médicinales de la Pharmacopée française, dont trente-sept sur la liste A et six sur la liste B (Pharmacopée française, 2014).

Les propriétés biologiques attribuées aux *Asteraceae* sont très nombreuses, notamment des propriétés antimicrobiennes (Casiglia *et al.*, 2015; Negreiros *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2016; Ferhata *et al.*, 2016; Majouli *et al.*, 2016; Abu-Darwish *et al.*, 2016; Zater *et al.*, 2016; Dane *et al.*, 2016; Gakuubi *et al.*, 2016; Valarezo *et al.*, 2016; Hellali *et al.*, 2017; Segueni *et al.*, 2017; Bel Hadj *et al.*, 2017; Al Jahid *et al.*, 2017), antioxydants (Hussein *et al.*, 2016; Zhiyuan *et al.*, 2016; Ferhata *et al.*, 2016;

Dif *et al.*, 2016; Segueni *et al.*, 2017; Hellali *et al.*, 2017; Dib *et al.*, 2017; Coté *et al.*, 2017; Toubane *et al.*, 2017), antiinflammatoire (Haimoud *et al.*, 2015; Abu-Darwish *et al.*, 2016; Toubane *et al.*, 2017; Coté *et al.*, 2017; Tadića *et al.*, 2017), cytotoxique (Jassbi *et al.*, 2016; Zater *et al.*, 2016; Kchaou *et al.*, 2016; Jassbi *et al.*, 2016; Coté *et al.*, 2017), anticholinesterase (Ferhata *et al.*, 2016), antimorale (Dou *et al.*, 2017), insecticides (Politi *et al.*, 2016), larvicides (Bouguerra *et al.*, 2017)

Les espèces d'Astéracées sont également très allergènes causant des dermatites de contact. Ces manifestations peuvent apparaître par contact direct avec la plante ou bien par disséminations de certaines parties sèches de la plante, des poils sécréteurs, ou même du pollen ; mais aussi au contact des cosmétiques ou produits formulés à partir d'extraits de plante (Picman, 1986; Paulsen *et al.*, 2008; Jack *et al.*, 2013).

1-2- La tribu des *Gnaphalieae*

La tribu des *Gnaphalieae* est l'une des plus grandes tribus de la famille des *Astéraceae*, contient plus de 185 Genres et 1240 espèces largement répandues sur la plupart des continents (Bayer *et al.*, 2007). C'est la tribu la plus diversifiée dans l'hémisphère sud, avec trois centres principaux de diversification, l'Amérique du Sud, l'Afrique du Sud et l'Australie (Anderberg and Freire, 1991; Bayer *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2009).

Les *Gnaphalieae* actuels ont d'abord été classés sous la tribu des *Inuleae* par Cassini (Cassini, 1822). Plus tard, Bentham (Bentham and Hooker, 1873) a divisé les *Inuleae* en neuf sous tribus basées sur la présence des capitules homogames ou hétérogènes, et sur d'autres caractères comme la morphologie de réceptacle, style et bractées. La majorité des *Gnaphalieae* étaient inclus dans les sous-tribus *Filagineae*, *Gnaphalieae*, *Angianthieae*, *Relhanieae* et *Athrixieae*. Merxmüller *et al.*, (1977) a reconnu trois sous-tribus dans la tribu des *Inuleae*: *Inulinae*, *Gnaphaliinae* et *Athrixiinae*, basées sur la cytologie, la phytochimie, la palynologie et d'autres Caractères morphologiques. Ces derniers auteurs ont placé les *Gnaphalieae* principalement dans la sous-tribu *Gnaphaliinae*, bien que certains genres aient également été accueillis dans les *Athrixiinae*.

Les Gnaphalieae ont d'abord été reconnus comme indépendants des *Inuleae* par Anderberg (Anderberg, 1989; Anderberg, 1991), qui ont divisé le classique Inuleae (Merxmüller, 1977) en trois tribus: *Inuleae*, *Plucheeae* et *Gnaphalieae*. Plusieurs études phylogénétiques basées sur des séquences d'ADN ont convenu de considérer les *Gnaphalieae* comme indépendantes des *Inuleae* (Bayer and Starr, 1998; Kim and Jansen, 1995; Wagstaff and Breitwieser, 2002).

Anderberg, (1991) a suggéré de classer les *Gnaphalieae* en cinq sous-tribus (*Angianthinae*, *Cassiniinae*, *Gnaphaliinae*, *Loricariinae* et *Relhaniinae*) basé sur d'analyses cladistiques de caractères morphologiques (Anderberg, 1991). Dans la sous-tribu *Gnaphaliinae*, regroupe les deux plus grands genres qui sont *Helichrysum* et *Gnaphalium*, avec des centaines d'espèces et avec de nombreux genres ségrégés étroitement liés (Osman, 2011).

1-3- Le genre *Helichrysum*

L'étymologie du terme *Helichrysum* n'est pas claire, l'interprétation la plus courante et celle qui viendrait du grec «*hélios*» soleil et «*chryos*» or. Une autre interprétation moins courante du terme *Helichrysum* stipule que ce terme peut aussi se rapporter à une plante aux fleurs dorées, grimpante en spirale (*helix*) dont l'immortelle aurait emprunté le nom (Lieutaghi *et al.*, 2006). Le nom français exprime une autre caractéristique, les Immortelles sèchent en conservant longtemps leur aspect et leur couleur car les capitules de fleurs sont entourés de bractées écailleuses qui ne se fanent pas (Pooley, 2003; Couplan *et al.*, 2009; Pen du, 2012).

1-3-1- Description botanique du genre

Le genre *Helichrysum* appartient à la tribu *Gnaphaliinae* (Hilliard, 1983 ; Anderberg, 1991). La plupart des plantes du genre *Helichrysum* sont vivaces et presque toujours sous-frutescentes à la base (Coste *et al.*, 1937). Ce sont des plantes à capitules hétérogames (rarement homogames par suppression des fleurs marginales femelles), multiflores, discoïdes. Le réceptacle est plan, non paléacé, alvéolé ou non.

Les fleurs du rayon femelles, peu nombreuses, sur un seul rang, ou nulles. Les fleurs du disque tubuleuses sont hermaphrodites, toutes fertiles ou presque.

L’involute est campanulé, hémisphérique ou cylindrique, à bractées brillantes et scarieuses, imbriquées sur plusieurs rangs. Les akènes petits, cylindriques ou pentagonaux un peu comprimés. Les aigrettes à soies ordinairement sont unisériées (Quézel et Santa, 1963).

1-3-2- Répartition géographique du genre

Le genre *Helichrysum* comprend environ 500 à 600 espèces (Hilliard, 1983; Engler, 1964). Ce genre est localisé sur les cinq continents: une zone regroupe les pays du pourtour méditerranéen, sur le continent américain : en Amérique du Nord et en Amérique du Sud, en Afrique : surtout à Madagascar, en Afrique du Sud et Afrique de l’Est, et dans les régions Masai du Sahel et de Somalie, en Asie : dans l’Est et le Sud du continent, et au Moyen-Orient, dans la péninsule Sud Arabique (Galbany-Casals *et al.*, 2014) (Figure 1).

L’*Helichrysum* est doté d’un polymorphisme élevé, avec la présence d’un grand nombre d’hybrides. Ces plants possèdent une grande ressemblance phénotypique, ce qui rend difficile l’identification des spécimens. En Italie, des espèces hybrides (*H. angustifolium* X *H. italicum* ssp. *italicum*) sont identifiées, des hybrides de (*H. rupestre* X *H. italicum* ssp. *microphyllum*) sont présentes en Sardaigne. Une espèce est présente dans tous les pays du pourtour méditerranéen est *H. stoechas* (Figure 2).

En Algérie Quézel et santa, (1963) identifient la présence de l’hybride (*H. rupestre* X *H. stoechas*), cet hybride a été signalé en Espagne et aux Baléares (Galbany-Casals *et al.*, 2014).

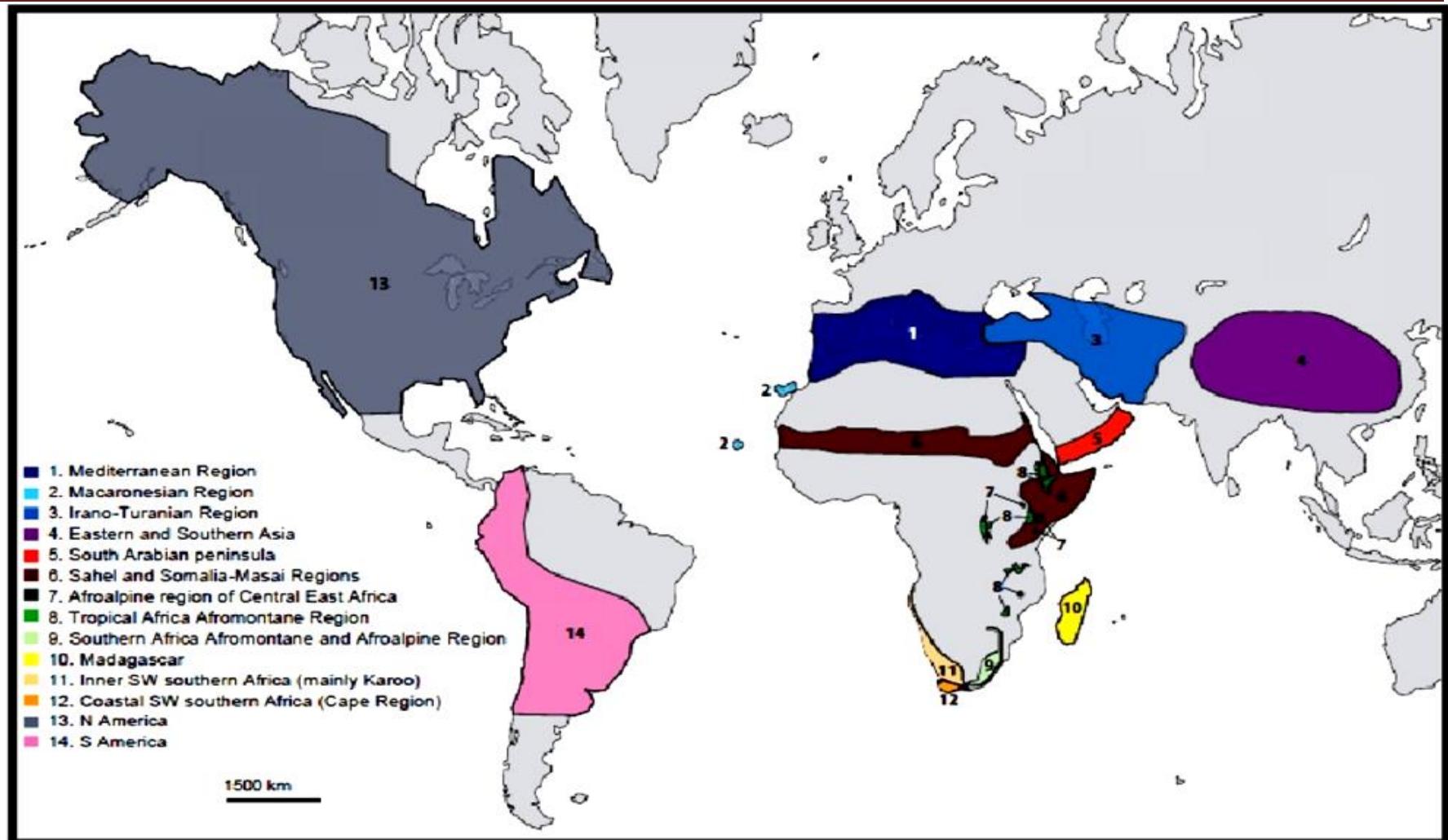


Figure 1 : Répartition géographique du genre *Helichrysum* (Galbany-Casals *et al.*, 2014)

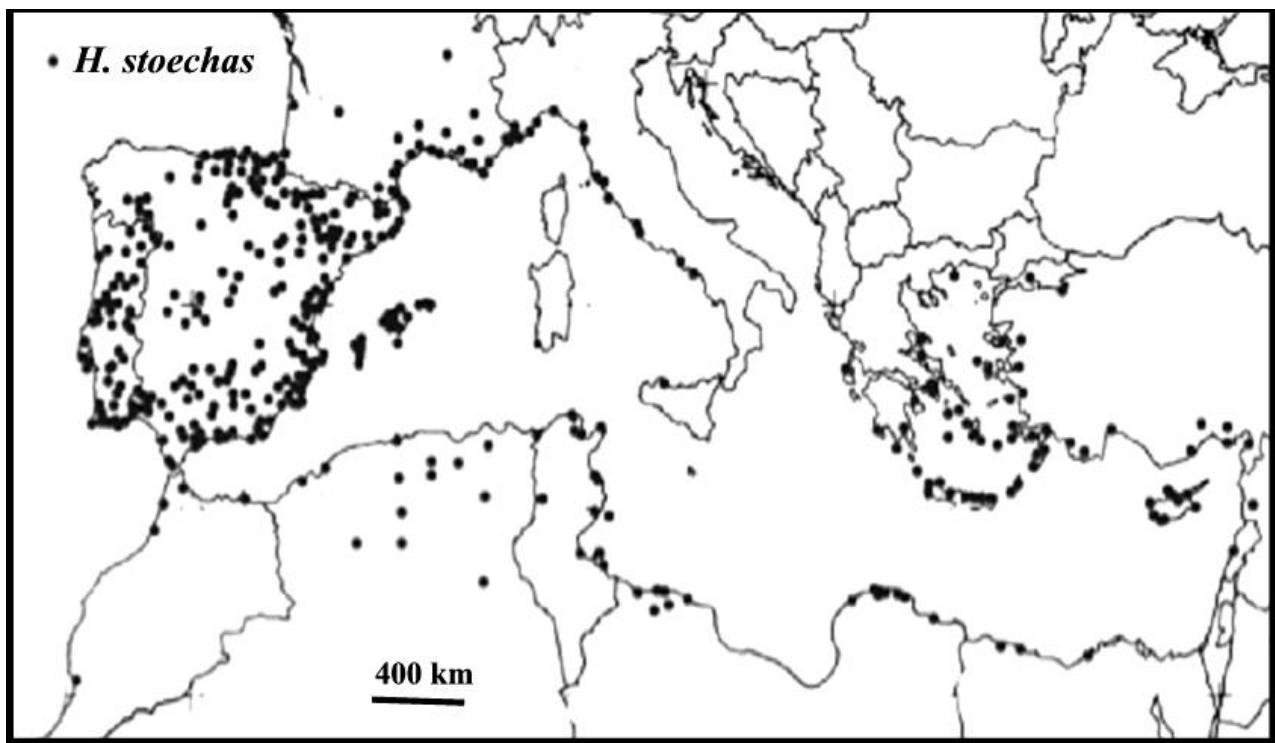


Figure 2: Distribution géographique d'*Helichrysum stoechas* (Degrelle, 2015)

1-3-3- Caryologie du genre

Les études cytologiques du genre *Helichrysum* ont été limités à quelques dénombrements chromosomiques et l'étude des caryotypes, seulement 10 à 12% des espèces du genre ont bénéficiées de ces études caryologiques (Galbany-Casals *et al.*, 2009). Ces études ont montré que les espèces du genre *Helichrysum* sont des polyploïdes (Galbany-Casals and Romo, 2008; Galbany-Casals *et al.*, 2009).

La polyploidie est une force significative de l'évolution des plantes, environ 50% des espèces d'angiospermes sont d'origine polyploïde (Stebbins, 1971; Averett, 1980; Dewet *et al.*, 1980, Levin, 1983; Masterson, 1994). La polyploidie aboutit généralement à une spéciation instantanée, augmentant la biodiversité et fournissant un nouveau matériel génétique pour l'évolution (Levin, 1983; Wendel and Doyle, 2005). Les polyploïdes peuvent avoir des niveaux supérieurs d'adaptabilité et des probabilités plus élevées de survie (Levin, 1983; Thompson et Lumaret, 1992; Soltis and Soltis, 2000).

Les espèces méditerranéennes et asiatiques du genre *Helichrysum*, sont des tétraploïdes à $2n = 28$ et des octaploïdes à $2n = 56$, avec un nombre chromosomique de base à $x = 7$. Ces races chromosomiques proviennent d'espèces diploïdes sud-africaines, principalement avec $2n = 14$, à travers les événements de polyploidisation (Namur et Verlaque, 1976). Carr *et al.*, (1999) ont montré que certaines espèces Australienne du genre *Helichrysum* ont un nombre chromosomique de $2n = 8, 14$ et 42 avec deux nombres de base $x = 4$ et $x = 7$.

Les travaux de Galbany-Casals and Romo, (2008) montrent que le nombre chromosomique le plus couramment trouvé dans le genre *Helichrysum* est $2n = 28$, principalement chez les espèces méditerranéennes, macaronésiennes, asiatiques et africaines.

Certaines espèces africaines du genre *Helichrysum* montrent un nombre chromosomique de $2n = 14$, alors que certaines espèces de la Méditerranée orientale et d'Asie ont un nombre chromosomique de $2n = 56$ (Galbany-Casals and Romo, 2008). Le nombre chromosomique à $2n = 42$ a été cité deux fois dans la littérature (Febles, 1989; Galbany-Casals and Romo, 2008).

Tous ces travaux sur le genre *Helichrysum* indiquent que le nombre chromosomique de base pour le genre est de $x = 7$. L'existence de différents niveaux de ploidie basé sur ce nombre de base ($x = 7$) montre que la polyploidie joue un rôle important dans l'évolution de nombre de chromosomes au sein du genre *Helichrysum* (Galbany-Casals and Romo, 2008).

Galbany-Casals *et al.*, (2009) montrent la présence de dysploidie dans l'évolution du nombre de chromosomes du genre, en découvrant deux nouveaux nombres de base pour le genre, ($x = 4$ et $x = 5$), représentés par plusieurs espèces d'Afrique du Sud, méditerranéennes et asiatiques, avec $2n = 8$ et $2n = 10$, qui sont dérivés d'espèces avec $2n = 14$.

Des études de caryotype réalisées sur des espèces d'*Helichrysum* en Iran montrent la présence d'une série polyploïde ($2n = 14, 24, 28, 32, 36, 42, 48, 54$ et 60), correspondant à des nombres de bases de ($x = 6, 7$ et 8), ce qui indique que la polyploidie n'est pas seulement importante pour le processus de spéciation mais joue

également un rôle dans la diversification des populations au sein du genre (Azizi *et al.*, 2014).

Les données chromosomiques disponibles indiquent que la polyplioïdie a joué un rôle important dans la spéciation et l'évolution du genre *Helichrysum* (Galbany-Casals and Romo, 2008 ; Galbany-Casals *et al.*, 2009), avec l'existence de variations extensives du nombre chromosomique et le niveau de ploïdie dans le genre, ce dernier ayant été rapporté comme $x = 4, 5, 7, 8$ (Namur et Verlaque, 1976; Carr *et al.*, 1999; Galbany-Casals and Romo, 2008 ; Galbany *et al.*, 2009; Azizi *et al.*, 2014) (Tableaux 2).

Tableau 2: Variabilité du nombre chromosomique dans le genre *Helichrysum*

Espèces du genre <i>Helichrysum</i>	2n	x	Ploïdie	Références	Zone d'étude		
<i>Graveolens</i> (M. Bieb.) Sw.	28	7	Tétraploïde	Namur et Verlaque, 1976	Turquie		
<i>Pamphylicum</i> P. H. Davis and Kupicha							
<i>Stoechas</i> (L.) Moench			Octaploïde		Grèce		
<i>Plicatum</i> DC.					Turquie et Grèce		
<i>Orientale</i> (L.) Gaertn.							
<i>Lindleyi</i> H. Eichler	8	4	Diploïde	Carr <i>et al.</i> , 1999	Australie		
<i>Bracteatum</i> (Vent.) Andrews	14		Diploïde				
<i>Diosmifolium</i> (Vent.) Sweet							
<i>Obcordatum</i> Benth.			Hexaploïde				
<i>Scorpioides</i> Labill.	42		Diploïde	Galbany-Cassal and Romo, 2008	Afrique du Sud		
<i>Odoratissimum</i> (L.) Sw.	14		Tétraploïde				
	28		Hexaploïde				
	42		Diploïde				
<i>Foetidum</i> (L.) Moench	14		Tétraploïde	Caméroun	Afrique du Sud		
	28		Diploïde				
<i>Rugulosum</i> Less.	14	7	Diploïde				
	28		Tétraploïde				
<i>Cymosum</i> (L.) D. Don	14		Diploïde		Afrique du Sud		
<i>Asperum</i> (Thunb.) Hilliard and Burtt							
<i>Mariepscopticum</i> O.M. Hilliard							
<i>Patulum</i> (L.) D. Don							
<i>Splendidum</i> (Thunb.) Less.							
<i>Retortum</i> (L.) Willd.							
<i>Appendiculatum</i> (L. fil.) Less.							
<i>Mixtum</i> (O. Kuntze) Moeser							
<i>Cephaloideum</i> DC.							
<i>Reflexum</i> N.E.Br.							

<i>Opacum</i> Klatt	28		Tétraploïde			
<i>Nudifolium</i> (L.) Less.						
<i>Chionoides</i> Philipson	14		Diploïde		Kenya	
<i>Kilimanjari</i> Oliv.						
<i>Italicum</i> (Roth) G. Don ssp <i>siculum</i> (Jord. And Fourr.)	28	7	Tétraploïde		Italie	
<i>Italicum</i> ssp <i>Microphyllum</i> (Willd.) Nyman					Espagne, Italie	
<i>Crassifolium</i> (L.) D. Don					Espagne	
<i>Pendulum</i> (C. Presl) C. Presl					Espagne	
<i>Serotinum</i> (DC.) Boiss.					France	
<i>Stoechas</i> (L.) Moench					Arménie	
<i>Arenarium</i> (L.) Moench					Turquie	
<i>graveolens</i> (M. Bieb.) Sw.	56		Octaploïde	Galbany-Casals et al., 2009		
<i>Pamphylicum</i> P. H. Davis and Kupicha						
<i>Plicatum</i> DC.						
<i>Spiralepis</i> Hilliard and B.L. Burtt		8	4			
<i>Zwartbergense</i> Bolus					Afrique du Sud	
<i>Litorale</i> Bolus	10	5	Diploïde			
<i>Indicum</i> (L.) Grierson						
<i>Globosum</i> Sch. Bip.		14	7			
<i>Setosum</i> Harv.						
<i>Patulu</i> (L.) D.Don		28	Tétraploïde			
<i>Pendulum</i> (C. Presl) C. Presl						
<i>Erotinum</i> DC.						
<i>Plicatum</i> DC.						
<i>Leucocephalum</i> Boiss.	60	54	Decaploïde	Azizi et al., 2014		
<i>Davisanum</i> Rech.f.						
<i>Globiferum</i> Boiss.						
<i>Oligocephalum</i> DC.						
<i>Globiferum</i> Boiss.						
<i>Armenium</i> DC.						
<i>Oocephalum</i> Boiss.	48	36	Nonaploïde			
<i>Rubicundum</i> (K. Koch) Bornm.						
<i>Plicatum</i> DC.	14		Diploïde			
	32	8	Tétraploïde			

Selon les données bibliographiques le nombre de base le plus commun dans le genre *Helichrysum* est $x = 7$ avec l'existence de quatre différents niveaux de ploïdie.

On constate que le niveau de ploïdie commun le plus élevé dans le genre *Helichrysum*

est le diploïde à $2n = 2x = 14$ observé dans 22 espèces qui sont la plupart des espèces africaines, suivie par les espèces méditerranéennes, macaronésiennes, asiatiques et quelque espèces africaines qui sont principalement des tétraploïde $2n = 4x = 28$ observé dans 20 espèces. Seulement trois espèces méditerranéennes sont connues être octoploïdes avec $2n = 8x = 56$. Finalement, le niveau hexaploïde, $2n = 6x = 42$, est rarement observé (seulement deux fois) observé dans les espèces australiennes et africaines (Tableau 3).

Tableau 3 : Occurrence de la ploidie chez le genre *Helichrysum*

Ploidie Polyploidie \ Ploidie	4	5	6	7	8	Total	%
2x	4	1		22	-	27	41,54
4x	-	-	2	20	1	23	35,38
6x	-	-	2	2	-	4	6,15
7x	-	-	3	-	-	3	4,62
8x	-	-	3	3	-	6	9,23
9x	-	-	1	-	-	1	1,54
10x	-	-	1	-	-	1	1,54
Total	4	1	12	47	1	65	

La courbe de régression indique que lorsque le niveau de ploidie augmente dans le genre *Helichrysum* le nombre des espèces diminue (Figure 3).

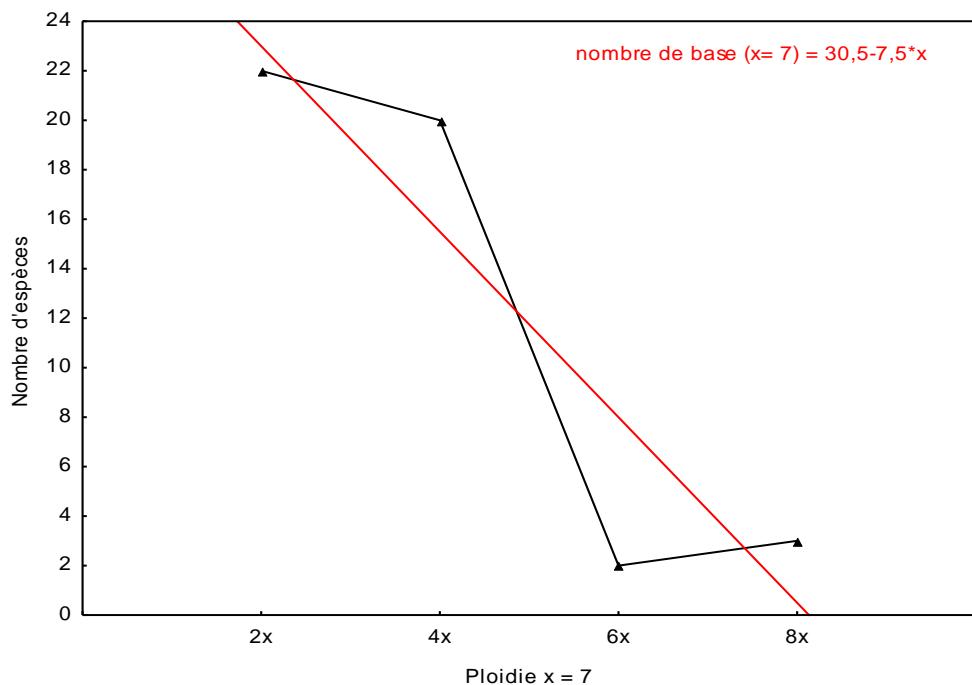


Figure 3: Le niveau de polyploidie dans le genre *Helichrysum*

Le pourcentage le plus élevé du niveau de ploïdie dans le genre *Helichrysum* est observé chez les espèces diploïdes avec 41,54%, suivie des espèces tétraploïdes dans la deuxième place avec un pourcentage de 35,38%, les espèces octaploïdes sont représentées par 9,23%, les espèces hexaploïdes se retrouvent dans la nature avec 6,15%, les espèces héptaploïdes avec 4,62% et enfin les espèces décapsoploïdes et nonaploïdes sont représentées par les pourcentages les plus faibles dans le genre *Helichrysum* avec 1,54%. La courbe de régression indique que le pourcentage de présence de la polyploïdie du genre *Helichrysum* dans la nature diminue lorsque le niveau de ploïdie augmente (Figure 4).

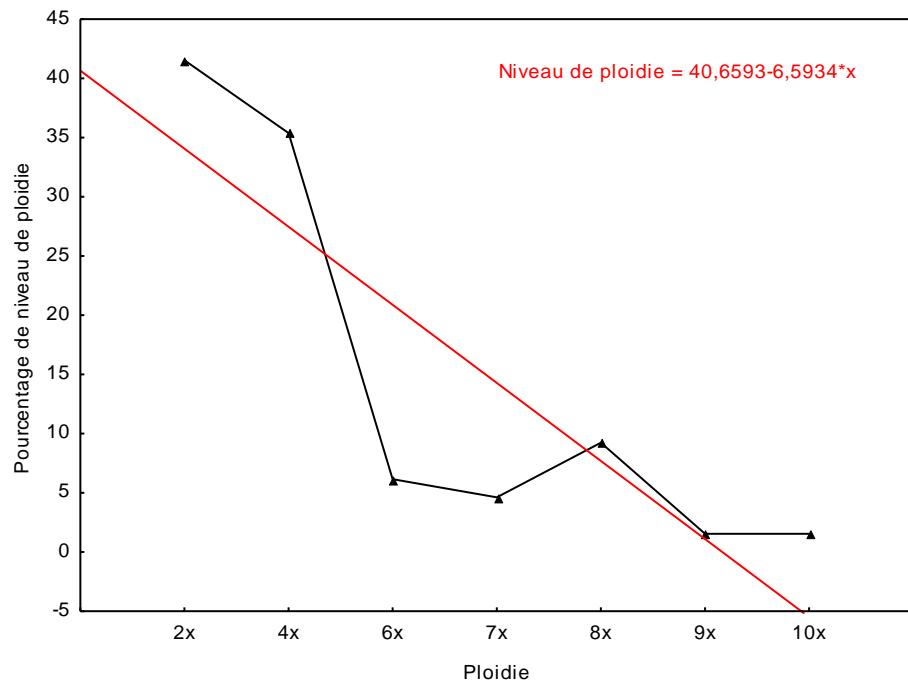


Figure 4: Pourcentage de niveaux de ploïdie dans le genre *Helichrysum*

1-3-4- Utilisation médicinale du genre *Helichrysum*

Des enquêtes ethnopharmacologiques ont été menées dans différentes régions du monde afin de recueillir des connaissances sur les usages traditionnels des espèces du genre *Helichrysum*, car l'utilisation pharmaceutique des immortelles est connue depuis la période greco-romaine (Ruberto *et al.*, 2002).

L'utilisation des inflorescences d'*H. arenarium* en Europe centrale a été signalée pour ses propriétés antiseptiques, coléreuses et spasmolytiques (Sala *et al.*, 2001), tandis qu'*H. graveolens* a été utilisé en Turquie dans le contrôle des symptômes du diabète sucré, de la cicatrisation et du diurétique (Aslan *et al.*, 2007).

L'espèce *H. stoechas* a été utilisée en Espagne et en Portugal sous forme d'infusion et de décoction pour traiter les maladies Infectieuses et diverses maladies liées au système respiratoire, contre les troubles digestifs et les troubles hépatiques et aussi contre la fièvre et le mal de dents (González-Tejero, 1989; Mulet, 1991; Peris *et al.*, 2001; Sanchez-Romero, 2003; Shunying *et al.*, 2005; Latorre, 2008; Rivera *et al.*, 2008; Carvalho, 2010; Silva *et al.*, 2011; Barroso *et al.*, 2014). En Lybie *H. Stoechas* a été utilisée contre les douleurs de colique rénale (El gadi *et al.*, 1994). Les fleurs d'*H. Stoechas* ont été utilisées sous forme de tisane en Espagne pour les problèmes cardio-vasculaire dont l'hypertension (Carrió and Valles, 2012).

L'espèce *H. italicum* a un intérêt économique élevé en raison de son huile essentielle très recherchée par l'industrie du parfum et l'aromathérapie (Mastelic *et al.*, 2008; Leonardi *et al.*, 2013). De nombreux travaux en Portugal rapportent que l'huile essentielle d'*H. italicum* est utilisée contre les problèmes dermatologiques comme cicatrisant et comme antihématome puissant (Voinchet et Giraud-Robert, 2007; Proença da Cunha *et al.*, 2007, 2012; Viegas *et al.*, 2014; Kladar *et al.*, 2015).

Les fleurs séchées d'*H. italicum* avaient une grande réputation dans la médecine traditionnelle en tant que cholérique, diurétique, cholagogue, expectorant, Analgésique et Astringent (Litvinenko *et al.*, 1992; Rivera and Obón, 1993; Chinou *et al.*, 1996, 1997). Les fleurs et les feuilles d'*H. italicum* sont utilisées en infusion et décoction dans le traitement de plusieurs maladies telle que, les troubles respiratoire et l'ORL comme le rhumes, la toux, la bronchite et pharyngite, asthme et l'allergie (Bruni *et al.*, 1997; Uncini and Tomei, 1999; Pieroni, 2000; Passalacqua *et al.*, 2007; Guarino *et al.*,

2008; Di Novella *et al.*, 2013), dans les troubles digestifs (Mulet, 1991; Luque *et al.*, 1998; Pardo de Santayana *et al.*, 2005; Parada, 2007; Benitez *et al.*, 2010), les troubles du foie et de la vésicule biliaire (Redzic, 2007), dans les insomnies et les maux de tête (Cornara *et al.*, 2009), les infections et les maladies de la peau (alopecie) (Ballero *et al.*, 2001; Latorre, 2008) et dans les infections intestinales parasitiques (Segarrai, 2008).

Il est aussi signalé que les infusions d'*H. italicum* sont utilisées comme un antiseptique buccale pour les maux de dents (González-Tejero, 1989; Barber *et al.*, 2005) et en poudre pour la guérison des plaies (Rivera *et al.*, 2008).

1-3-5- Activités biologiques des huiles essentielles du genre *Helichrysum*

Diverses études ont démontré l'activité biologique d'un grand nombre d'espèces appartenant au genre *Helichrysum* (Ramanoelina *et al.*, 1987; Tomas-Barberan *et al.*, 1988; Afolayan and Meyer, 1997; Tomas-Lorente *et al.*, 1989; Lourens *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2007; Kolayli *et al.*, 2010), l'activité antivirale et antituberculeuse des constituants d'*H. melanacme* (Lall *et al.*, 2006), l'effets antihistaminiques et antieicosanoïdes de la fraction d'acide oléanolique et d'acide ursolique d'*H. picardii* (Rosa *et al.*, 2007), les activités antimicrobiennes des espèces d'*Helichrysum* (Albayrak *et al.*, 2010; Demir *et al.*, 2009), l'activité antioxydant de l'huile essentielle de *H. microphyllum* ssp. *tyrrhenicum* (Ornano *et al.*, 2015), l'activité antioxydant in vitro d'*H. bubbleioides* (Prashith Kekuda *et al.*, 2017), l'activité antimicrobienne de l'extrait hydroalcoolique d'*H. leucocephalum* sur l'inhibition de la culture de *Streptococcus mutans* (Dubravka *et al.*, 2017). L'activité insecticide d'huile essentielle d' *H. faradifani* endémique à Madagascar est évaluée par (Benelli *et al.*, 2017).

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention des chercheurs, de ce fait, plusieurs études sur l'activité cytotoxique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* ont été réalisées (Lourens *et al.*, 2011; Afoulous *et al.*, 2011; Matić *et al.*, 2013; Gouveia-Figueira *et al.*, 2014; Mashigo *et al.*, 2015; Lawal *et al.*, 2015; Ornano *et al.*, 2015).

Des activités biologiques de nombreux métabolites isolés à partir d'*H. italicum* et en particulier de sa fraction volatile présentent des propriétés pharmacologiques, telles que des propriétés anti-inflammatoires (Sala *et al.*, 2003; Voinchet et Giraud-Robert, 2007), antiallergique (Angioni *et al.*, 2003; Voinchet et Giraud-Robert, 2007), antioxydant (Schinella *et al.*, 2002; Sala *et al.*, 2001, 2002; Rosa *et al.*, 2007; Appendino *et al.*, 2007) et des propriétés anti-VIH (Appendino *et al.*, 2007), l'activité antimicrobienne (Mastelic *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2008; Bouzid *et al.*, 2017) et des propriétés antifongique (Angioni *et al.*, 2003; Mastelić *et al.*, 2005; Bouzid *et al.*, 2017).

Il a été précédemment rapporté que *H. stoechas* a des activités antibactériennes (Rios *et al.*, 1990, 1991; Chinou *et al.*, 1997; Roussis *et al.*, 2002; Aslan *et al.*, 2006; Sobhy and El-Feky, 2007; Giovannini *et al.*, 2008; Haddouchi *et al.*, 2016; Chaouche *et al.*, 2016; Boubakeur *et al.*, 2017), anti-inflammatoire (Recio *et al.*, 1991; El-Dahmy, 1994; Bremnera *et al.*, 2009) et antioxydant (Carini *et al.*, 2001; Albayrak *et al.*, 2010; Haddouchi *et al.*, 2014; Barroso *et al.*, 2014; Faozia *et al.*, 2017; Boubakeur *et al.*, 2017), antinociceptif (Hwisa *et al.*, 2011), antifungique (Aslan *et al.*, 2006; Sobhy and El-Feky, 2007), antiviral (Aslan *et al.*, 2006) et antiallergique (Carini *et al.*, 2001).

1-3-6- Composition chimique des huiles essentielles du genre *Helichrysum* dans la littérature

La chimie du genre *Helichrysum* est très complexe avec une grande variété de composés organiques identifiés par des travaux antérieurs à partir de l'huile essentielle ou d'extraits aux solvants organiques, concernent principalement les composés terpéniques (Tira *et al.*, 1967; Theron *et al.*, 1994; Lloyd *et al.*, 1978; Bohlmann and Abraham, 1979; Jakupovic *et al.*, 1986; Jakupovic *et al.*, 1987, 1989), les flavonoïdes (Bohlmann *et al.*, 1979; Bohlmann and Abraham, 1979; Drewes *et al.*, 2006; Wollenweber *et al.*, 2005; Van Puyvelde *et al.*, 1989; Bohlmann and Zdero, 1983; Bohlmann and Ates, 1984; Bohlmann and Misra, 1984; Çubukçu et Damadyan, 1986; Tomas-Barberan *et al.*, 1988; Jakupovic *et al.*, 1989; Pietta *et al.*, 1992; Suezgec-Selcuk and Birteksoez, 2011; Popoola *et al.*, 2015), les lactones (Mezzitti *et al.*, 1970; Rios *et al.*, 1970; Orzalesi *et al.*, 1969), les composés coumariniques (Çubukçu, 1976;

Bohlmann and Zdero, 1980), les composés phénoliques (Vrkoc *et al.*, 1973, 1975; Randriamihaly *et al.*, 1992; Kolayli *et al.*, 2010; Taglialatela-Scafati *et al.*, 2013).

Depuis plusieurs décennies, de nombreux travaux ont été publiés sur l'étude phytochimique des huiles essentielles des espèces de genre *Helichrysum* (Annexe).

Plusieurs espèces du genre *Helichrysum* ont été étudiées, *H. orientale*, *H. heldreichii* et *H. doeryeri* (Roussis *et al.*, 2000), *H. fulgidum* et *H. cymosum* (Bougatsos *et al.*, 2004), *H. dasyanthum*, *H. excisum*, *H. felinum* et *H. petiolare* (Lourens *et al.*, 2004), *H. faradifani* (Cavalli *et al.*, 2006), *H. cymosum* ssp *cymosum* (van Vuuren *et al.*, 2006), *H. oocephalum* (Firouznia *et al.*, 2007), *H. pallasii* (Formisano *et al.*, 2009), *H. gymnocephalum* (Afoulous *et al.*, 2011), *H. noeaneum* (Elkiran *et al.*, 2013), *H. oligocephalum* (Esmaeili, 2013; Ghassemi-Dehkordi *et al.*, 2015).

La composition chimique d'huile essentielle de *H. italicum* varie en fonction de l'origine géographique et du cycle végétatif des espèces (Paolini *et al.*, 2006). Il existe de nombreuses études sur la composition chimique des huiles essentielles d'*H. italicum* cultivées en France (Bianchini *et al.*, 2001, 2003, Mastelić *et al.*, 2008; Perrini *et al.*, 2009; Morone-Fortunato *et al.*, 2010; Cristofari *et al.*, 2012), en Italie (Bianchini *et al.*, 2003; Paolini *et al.*, 2006; Morone-Fortunato *et al.*, 2010; Mancini *et al.*, 2011; Melito *et al.*, 2016), au Portugal (Costa *et al.*, 2015), en Croatie (Mastelić *et al.*, 2005; Ivanovic *et al.*, 2011), à Serbie (Stupar *et al.*, 2014), au Brésil (Nebojsa *et al.*, 2015) et en Algérie (Bouzid *et al.*, 2017).

Très peu d'études ont touchés à la phytochimiques d'espèce *H. stoechas*, en Portugal on trouve les travaux de (Ascensao *et al.*, 2001; Proença da Cunha and Cardoso do Vale, 1974), en Grèce (Chinou *et al.*, 1997 a et b; Roussis *et al.*, 2002), en France (Vernin and Poite, 1998), en Espagne (Tsoukatou *et al.*, 1999), en Libye (Sobhy and ElFeky, 2007). En Algérie jusqu'en ce jour aucune étude phytochimique n'avait été établie sur cette espèce.

2- Les huiles essentielles

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles (H.E) datent de l'an 3000 avant J.C (Baser and Buchbauer, 2010). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc... (Franchomme *et al.*, 2007).

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

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice Gattefosse a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (René, 1937 ; Besombes, 2008).

2-1- 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). De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles

essentielles. D'après William Naves (1874 - 1936), aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme « des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passent avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau » (Garnéro, 1996).

Cette définition a été reprise à peu de choses près par AFNOR et ISO: « L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» (ISO, 1997 ; AFNOR, 2000).

2-2- Répartition, localisation et fonction des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des quantités d'essence aromatique même infimes (Bruneton, 1999; Degryse *et al.*, 2008). Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent, en particulier les Labiées, les Ombellifères, les Myrtacées, les Lauracées, les Rutacées, les Lamiacées, les Astéracées, les Apiacées, les Cupressacées (Bruneton, 1999; Benayad, 2008).

Tous les organes végétaux peuvent renfermer des huiles essentielles (Belaïche, 1979; Paris et Hurabielle, 1981; Bruneton, 1999; Ghuestem *et al.*, 2001; Anton et Lobstein, 2005; Scimeca, 2007; Festy, 2008; Teixeira, 2013). On en trouve dans les parties aériennes (Bel Hadj *et al.*, 2017; Dib *et al.*, 2017; Behbahani *et al.*, 2017; Hussain *et al.*, 2017), dans les écorces (Yusei and Miyazawa, 2012; Elgendi *et al.*, 2017; Piyamas *et al.*, 2017; Labib *et al.*, 2017), dans les racines (Dhouiouia *et al.*, 2016; Fraternale *et al.*, 2016; Sitarek *et al.*, 2017), dans le bois (Quan *et al.*, 2014), dans les graines (Zhao *et al.*, 2017; Bel Hadj *et al.*, 2017; Bouchachia *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017), dans les boutons floraux (Natalija *et al.*, 2017; Morshedloo *et al.*, 2017), dans les Fruits (Ben Marzoug *et al.*, 2011; Hui *et al.*, 2014; Mehmet *et al.*, 2017; Piras *et al.*, 2017), dans les rhizomes (Sudipta *et al.*, 2017) et dans les feuilles (Sudipta *et al.*, 2017; Piras *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

Les huiles essentielles sont classées parmi les métabolites secondaires; leur biosynthèse et leur accumulation se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante (Bruneton, 1999). Elles se situent soit dans les poils sécréteurs, soit au niveau des canaux sécréteurs ou encore des poches sécrétrices (Figure 5) (Bruneton, 1999; Hazzit, 2002; Boz *et al.*, 2009; Deleu *et al.*, 2010). Les poils sécréteurs ou poils glandulaires épidermiques sont rencontrés dans les organes de plantes de quelques familles (*Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Geraniaceae* et autres), les canaux sécréteurs ou canaux glandulaires sont présents dans la plupart des bois résineux de la famille des *Cupressaceae*, ces glandes sont aussi retrouvées dans des organes des espèces de la famille des *Burseraceae*, des *Anacardiaceae*, *Apiaceae* et *Dipterocarpaceae*, et les poches sphériques schizogènes sont des glandes qu'on retrouve chez les espèces des familles *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Hypericaceae* et *Rosaceae* (Belaïche, 1979; Bruneton, 1999; Paris et Hurabielle, 1981; Ghuestem *et al.*, 2001; Endrias, 2006).

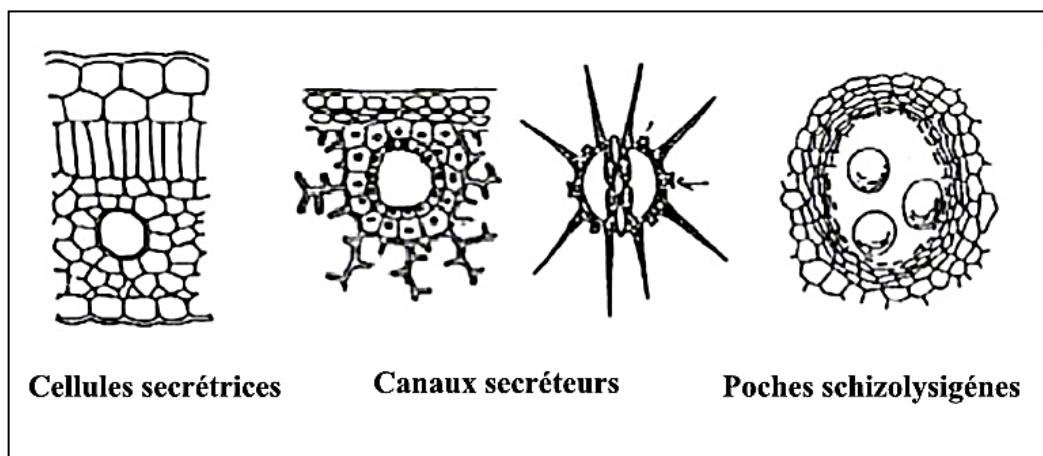


Figure 5: Quelques organes sécréteurs d'huiles essentielles (Ngakengi-Limbili, 2012)

2-3- Rôle des huiles essentielles

Les plantes aromatiques produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires (Normant et Normant, 1968; Roberts et Marjorie, 1977), mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste mal connu (Rai *et al.*, 2003). Elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme cellulaire de la plante (Salle et Pelletier, 1991; Amiot, 2005). Certains auteurs pensent que les

huiles essentielles pourraient avoir un rôle attractif ou répulsif vis-à-vis des prédateurs (insectes, herbivores...) et favoriseraient ainsi la pollinisation (Bruneton, 1999; Guignard, 2000).

D'autres auteurs affirment que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement (Belaïche, 1979). D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaïche, 1979; Guignard *et al.* 1985).

2-4- Variation de la composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles 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 huiles essentielles peuvent être très différentes (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Benini, 2007). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du patrimoine génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance, facteurs de l'environnement ou de développement de la plante.

2-4-1- Facteurs intrinsèques

Parmi les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles sont l'influence du stade végétatif (Garnéro, 1991, Bruneton, 1999; Stefanini *et al.*, 2006; Aprotosoaie *et al.*, 2010), l'organe de la plante (Maffeir and Sacco, 1987; Barry, 2001, Stefanini *et al.*, 2006; Chowdhury *et al.*, 2009), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploidie (Garnéro, 1991; Aprotosoaie *et al.*, 2010) et le polymorphisme chimique (Garnéro, 1991; Anton et Lobstein, 2005; Belyagoubi, 2006).

2-4-2- Facteurs extrinsèques

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de

la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Bruneton, 1999; Mohammad *et al.*, 2009; Olle and Bender, 2010).

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique sur la composition et le rendement des huiles essentielles (Barry, 2001; Mohammedi and Fouzia, 2007; Marzoukia *et al.*, 2009).

Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement en huiles essentielles (Barry, 2001; Lahlou, 2004; Stefanini *et al.*, 2006; Benini, 2007; Aprotoisoaie *et al.*, 2010).

Les facteurs édaphiques: les propriétés physiques du sol (porosité, rétention d'eau...), la nature (argileuse, sablonneuse..), la composition (teneur en azote, terrains calcaires, siliceux...) etc., sont des facteurs déterminants pour l'huile essentielle (Guignard, 1983).

Le prétraitement du matériel végétal: le séchage, les conditions de conservation, notamment les modifications physiques et biochimiques dues à l'action de l'air, du soleil... etc., ont également une influence sur la composition de l'huile essentielle (Abdoul, 2002).

La méthode d'extraction (Huang, 1987; Weinreich and Nitz, 1996; Bruneton, 1999, Mohamed, 2005; Abramson *et al.*, 2007; Benini, 2007; Silano and Delbò, 2008) et l'état du matériel végétal (Pinto *et al.*, 2006; Hettiarachichi, 2008), influent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles. Il faut aussi signaler que le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles (Besombes, 2008).

2-5- Secteurs d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles constituent une matière première destinée à divers secteurs d'activités (Bessah et Benyoussef, 2015). Quatre principaux secteurs de leur utilisation, à une échelle industrielle, peuvent être retenus (Ouamba, 1988; Jouhanneau, 1991 ; Bruneton, 1999; Nicole, 1996; Grysole, 2004).

Les industries des cosmétiques, savonneries et parfumeries constituent le plus gros consommateur d'huiles essentielles (Balandrin *et al.*, 1985; Shahi *et al.*, 2009).

Elles représentent 60 % de la demande totale en substances naturelles, selon le National Research Development Corporation (NRDC) (Lubbe and Verpoorte, 2011).

Les huiles essentielles sont utilisées comme matière première de base dans la fabrication des parfums et d'autres produits cosmétiques (Muyima *et al.*, 2002; Fischetti, 2010).

Les huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour rehausser le goût des aliments (Heath, 1981; Sacchetti *et al.*, 2011). Elles sont aussi utilisées pour la conservation des aliments grâce aux effets antimicrobiens et antioxydants de certains de leurs constituants (Burt, 2004; Shan *et al.*, 2005). Ces agents naturels viennent réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques qui présentent des effets néfastes sur la santé (Viuda-Martos *et al.*, 2009; Miguel, 2010).

Les huiles essentielles représentent un outil thérapeutique important qui permet d'élargir le champ des traitements médicaux conventionnels (Robard, 2004; Millet *et al.*, 2010). Elles peuvent être utilisées directement comme agents thérapeutiques (Bardeau, 2009; Hamid *et al.*, 2011), mais aussi comme matières premières pour la synthèse de principes actifs (Bessah et Benyoussef, 2015).

L'utilisation des huiles essentielles dans différentes pathologies (digestive, infectieuse...) fait appel à leurs propriétés: anti-infectieuse, antalgique, anti-inflammatoire, sédative, antimicrobien, antispasmodique, antioxydants et cytotoxiques (Steflitsch and Steflitsch, 2008; Bardeau, 2009; Le Hir, 2009).

L'industrie chimique est le principal utilisateur des isolats issus des huiles essentielles comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes (Ouamba, 1988; Jouanneau, 1991).

2-6- Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances très délicates et s'altèrent facilement, ce qui rend leur conservation difficile. Les risques de dégradation des huiles essentielles sont multiples (Lobstein *et al.*, 1983; Bruneton, 1999). Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons

propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté, qui sont conservés à l'abri de la lumière et de la chaleur (Valnet, 1984; Salle et Pelletier, 1991; Bruneton, 1999).

2-7- Composition chimique des huiles essentielles

Comme toute substance, les huiles essentielles, sont des mélanges complexes et variables appartenant principalement à deux groupes chimiques qui se caractérisent par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des composés terpéniques et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane (Guignard *et al.*, 1985 ; Teisseire, 1991; Buchanan *et al.*, 2000; Guestem *et al.*, 2001). Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

2-7-1- Les composés terpéniques

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représentés dans les huiles essentielles et d'un intérêt chimique considérable. Ce sont des composés hydrocarbures formés par un assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques, ce sont des polymère de l'isoprène formule brute $(C_5H_8)_n$ (Lamarti *et al.*, 1994). Selon le nombre d'unités associées on distingue : les monoterpènes (2 unités: C_{10}), les sesquiterpènes (3 unités: C_{15}), les diterpènes (4 unités: C_{20}), les triterpènes (6 unités: C_{30}), les tétraterpènes (8 unités: C_{40}) et les polyterpènes (n unités: C_{5n}) (Bruneton, 1999; Lamarti *et al.*, 1994).

Les terpènes ont des structures très diverses, ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou polycycliques, ils contiennent la plupart des fonctions chimiques des matières organiques (alcools, éthers, aldéhydes, cétones, etc...) (Paris et Hurabielle, 1981, Svoboda, 2000).

Les terpènes volatils à faible masse moléculaire tels que les monoterpènes (C_{10}) et les sesquiterpènes (C_{15}) sont les plus rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999), leur conférant un caractère volatile et des propriétés olfactives (Pibiri, 2006 ; Bakkali *et al.*, 2008 Couic-Marinier et Lobstein, 2013). A titre indicatif quelques monoterpènes et sesquiterpènes sont représentées dans les figures 6 et 7.

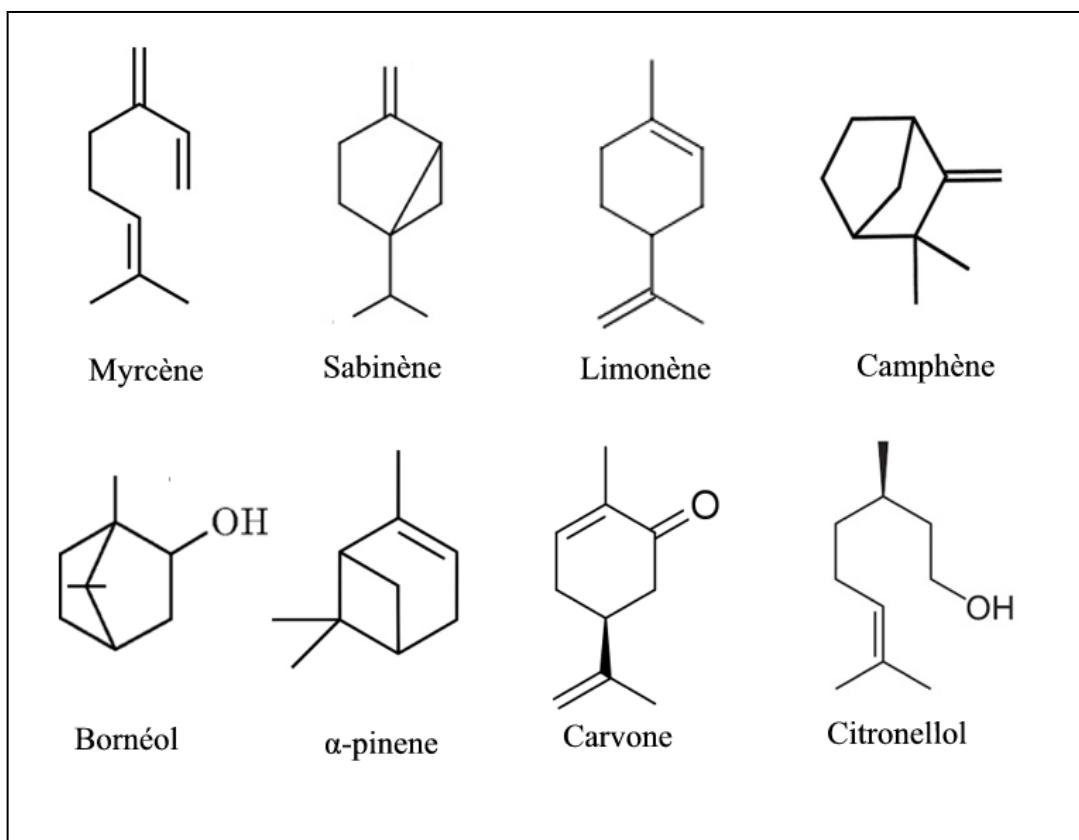


Figure 6: Structure chimique de quelques monoterpènes des HE

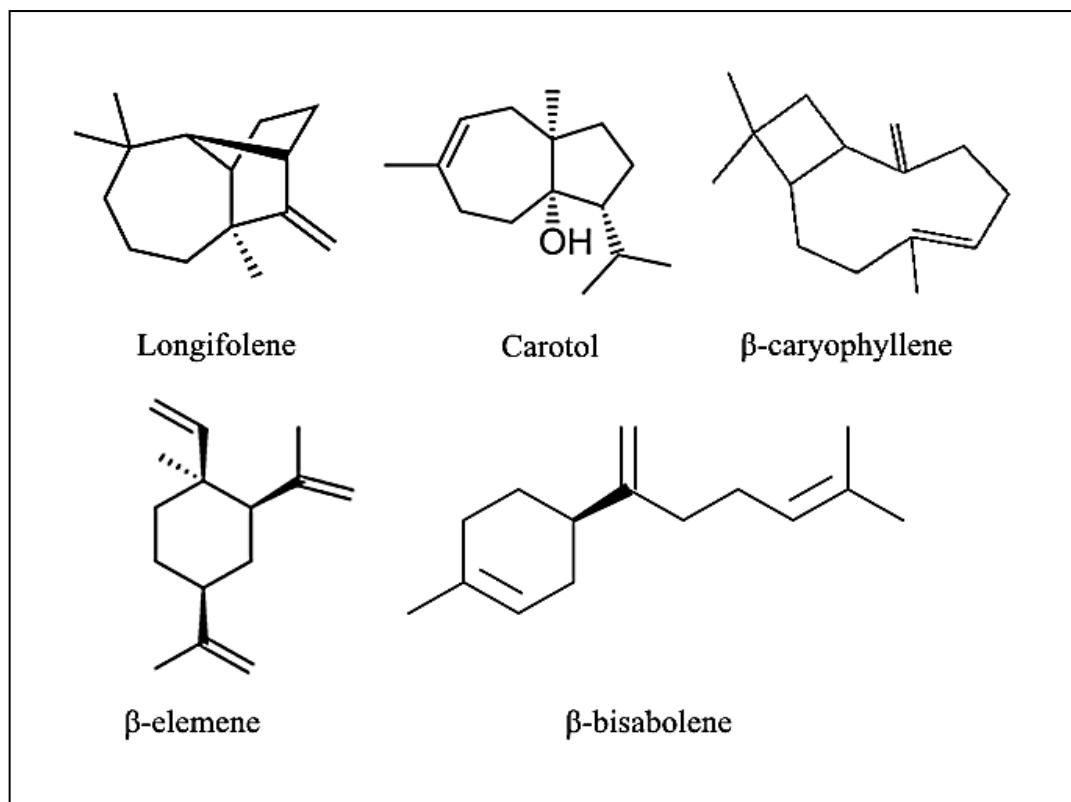


Figure 7: Structure chimique de quelques sesquiterpènes des HE

2-7-2- Les composés aromatiques

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C₆-C₃) (Figure 8), mais ils sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les composés terpéniques (Paris et Hurabielle, 1981; Kurkin, 2003). Ils peuvent comprendre des phénols (eugénol, chavicol) ex : huile essentielle de girofle (eugénol), des aldéhydes (cinnamaldéhyde) ex : huile essentielle de cannelle, des alcools (alcool cinnamique) ex : huile essentielle Baume du Pérou, des dérivés méthoxy (anéthol, estragol, élémicine) ex : huile essentielle de fenouil (anéthole) ou méthylène dioxy (apiole, myristicine, safrole) ex : huile essentielle de persil (apiole) (Bruneton, 1999).

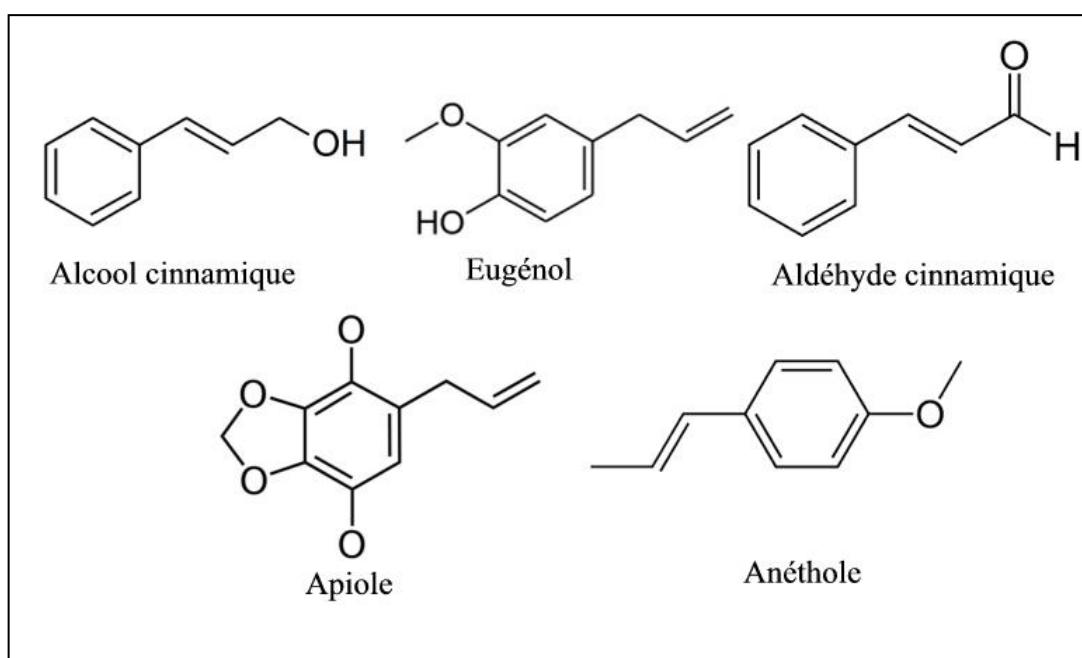


Figure 8: Structure chimique de quelques composés aromatiques des HE

2-7-3- Les composés d'origine diverses

Les huiles essentielles peuvent contenir d'autres produits résultant de la dégradation d'acides gras comme: le (3Z)-hexen-1-ol et d'autres composés issus de la dégradation des terpènes comme les ionones (Teisseire, 1991). D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).

2-8- Biosynthèse des constituants d'huiles essentielles

La Biosynthèse des constituants des huiles essentielles emprunte deux voies utilisant comme intermédiaire, l'acide mévalonique pour les terpénoïdes et l'acide shikimique pour les phénylpropanoides (Mann, 1987; Bruneton, 1999).

2-8-1- Biosynthèse des terpènes

Biogénétiquement, le précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mévalonique (MVA), obtenu après condensation enzymatique de trois molécules d'acides acétique (Mann, 1987; Bruneton, 1999). Sa phosphorylation suivie d'une décarboxylation aboutie à l'unité isoprénique de base: le pyrophosphate d'isopenténe-3-yile (IPP). L'isopentényle diphosphate isomérase (IPP) catalyse l'isomérisation de l'IPP en diméthylallyl pyrophosphate (DMAP). La liaison covalente de l'IPP à son isomère conduit à la formation du précurseur des monoterpènes en C10, le géranyle diphosphate (GPP). De la même manière, la liaison covalente du le géranyle diphosphate (GPP) avec l'IPP conduit à la formation de la farnésyle diphosphate (FPP), le précurseur des sesquiterpènes en C15, puis une troisième molécule IPP réagissant sur le farnésyl pyrophosphate (FPP) donne le géranyl pyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes en C20 (Figure 9).

Ces réactions de condensation sont catalysées par des prényltransférases (PT) ayant comme substrat des prényl-PP à courte chaîne, la GPP synthase, la FPP synthase et la GGPP synthase (Yeh and Rilling, 1977; Spurgeon and Porter, 1981; Gershenson and Croteau, 1993). Selon le processus, les diterpènes, triterpènes, ainsi que les tétraterpènes sont obtenus (Bruneton, 1999).

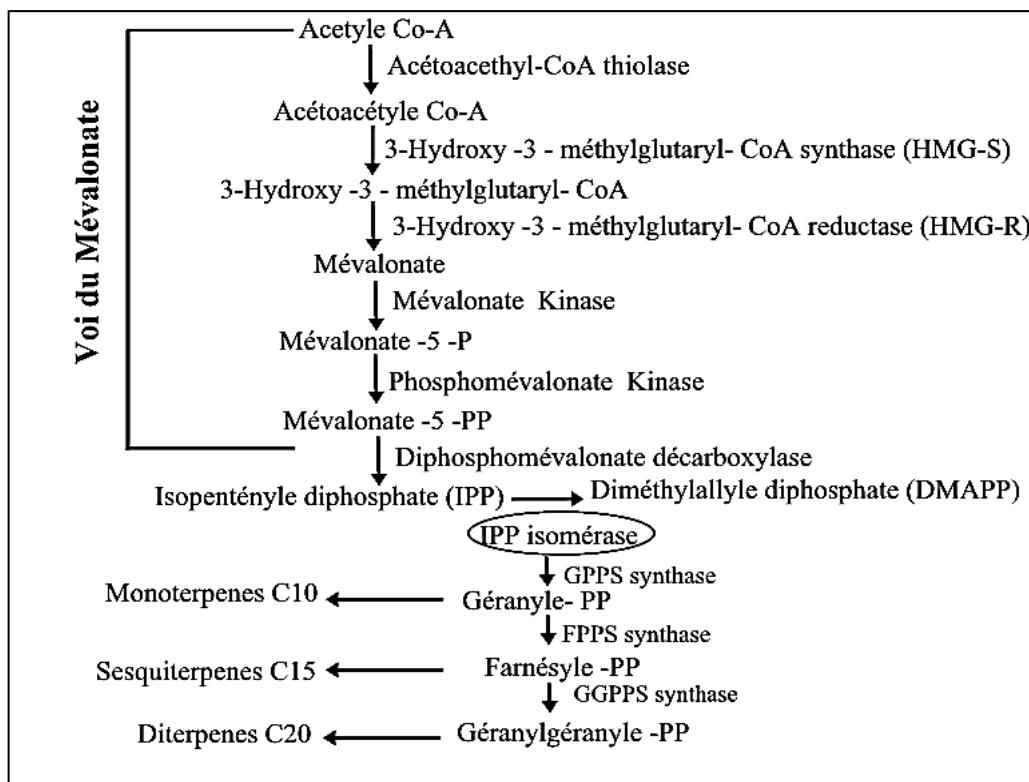


Figure 9: Biosynthèse des terpènes

2-8-2- Biosynthèse des composés aromatiques

Les dérivés de phénylpropane sont biogénétiquement issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique, qui est la plus courante et qui conduit principalement aux acides cinnamiques et à leurs dérivés via les acides aminés (Mann, 1987). Cet intermédiaire se forme par une série de conversions biologiques dont la première étape est une condensation aldolique stéréospécifique entre le phosphoénolpyruvate (PEP) et l'érythrose-4-phosphate pour former un composé en C₇, dont la cyclisation conduit à l'acide déhydroquinique. Ce dernier se déhydrate pour donner l'acide déhydroshikimique qui à son tour conduit à l'acide shikimique par une réaction de réduction.

L'acide shikimique obtenu est transformé en acide chorismique qui occupe une position clé dans ce métabolisme. Il est réarrangé en acide préphénique qui après décarboxylation et oxydation donne l'acide phénylpyruvique. Cet acide aromatique se transforme en phénylalanine, acide aminé aromatique qui est à l'origine des composés aromatiques (Hahlbock and Scheel, 1989) (Figure 10).

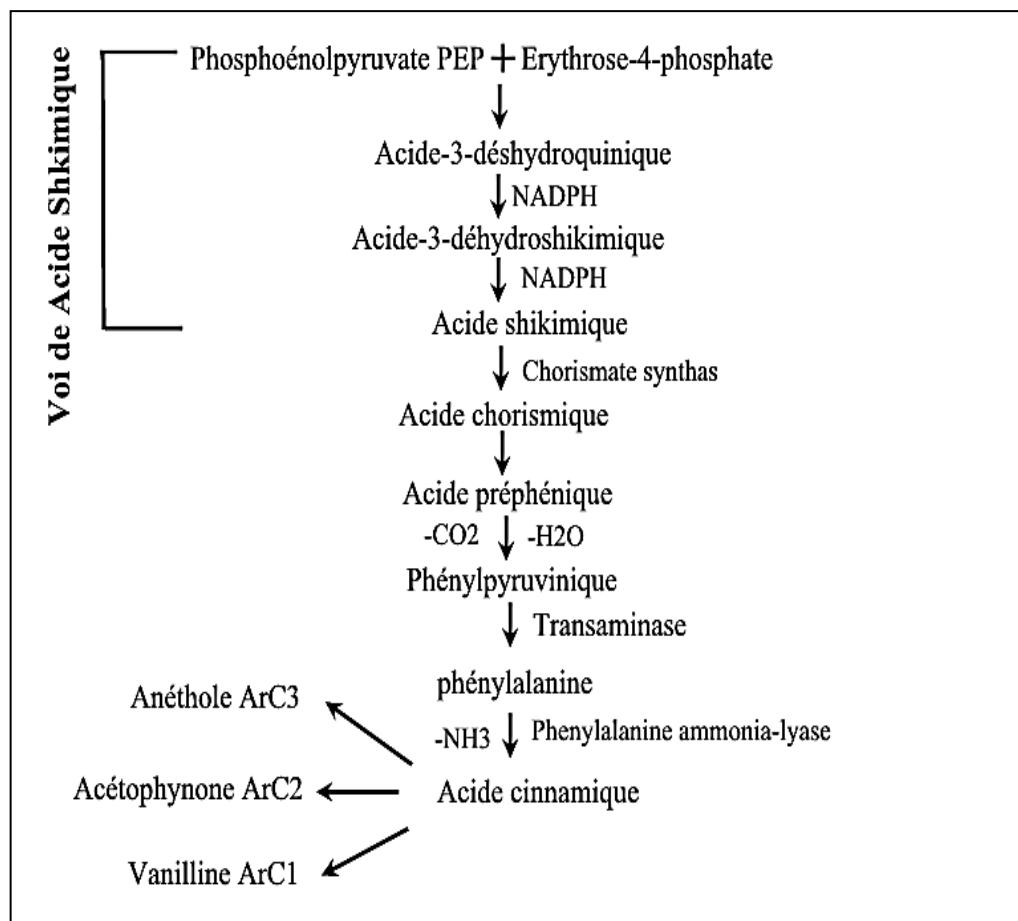


Figure 10: Biosynthèse des dérivés de phénylpropanoides

2-9- Procédés d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut-être réalisée au moyen de nombreux et divers procédés, basée sur des techniques anciennes, distillation (Bruneton, 1999; Benjilali, 2004), enfleurage (Belaiche, 1979; France-Ida, 1996) et expression (Bruneton, 1999). Ces techniques d'extraction ont démontré leur efficacité mais aussi leur limite en termes de productibilité, de rentabilité et de qualité des extraits. En effet la perte de certains constituants, la dégradation de certains composés par effet thermique, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus au moins toxiques, peuvent être engendrer par ces techniques d'extraction (Garnéro, 1996).

Des techniques plus récentes, d'un emploi très limité, présentent plusieurs avantages, pourraient résoudre tous ces problèmes, telle que l'extraction par micro-ondes ou ultrasons (Kaufmann and Christen, 2002; Lucchesi, 2004; Vivekananda *et*

al., 2007; Boukroufa *et al.*, 2010), l'extraction par les solvants organiques (Kaufmann and Christen, 2002; Chemat *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2017) et l'extraction par fluides supercritiques (Cavero *et al.*, 2006; Garcia-Salas *et al.*, 2010; Sharif *et al.*, 2014; Arranz *et al.*, 2015; Özkal and Yener, 2016). Parmi ces diverses méthodes, la distillation est de loin la méthode la plus utilisée pour extraction des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

2-9-1- Hydrodistillation

La distillation à l'eau ou «hydrodistillation», est une méthode simple et la plus anciennement utilisée. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur (Figure 11). L'ensemble est ensuite porté à ébullition sous une pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (Bruneton, 1999). La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage (recyclage de l'eau de distillation à l'aide d'un siphon) des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe, généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles, est le Clevenger.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

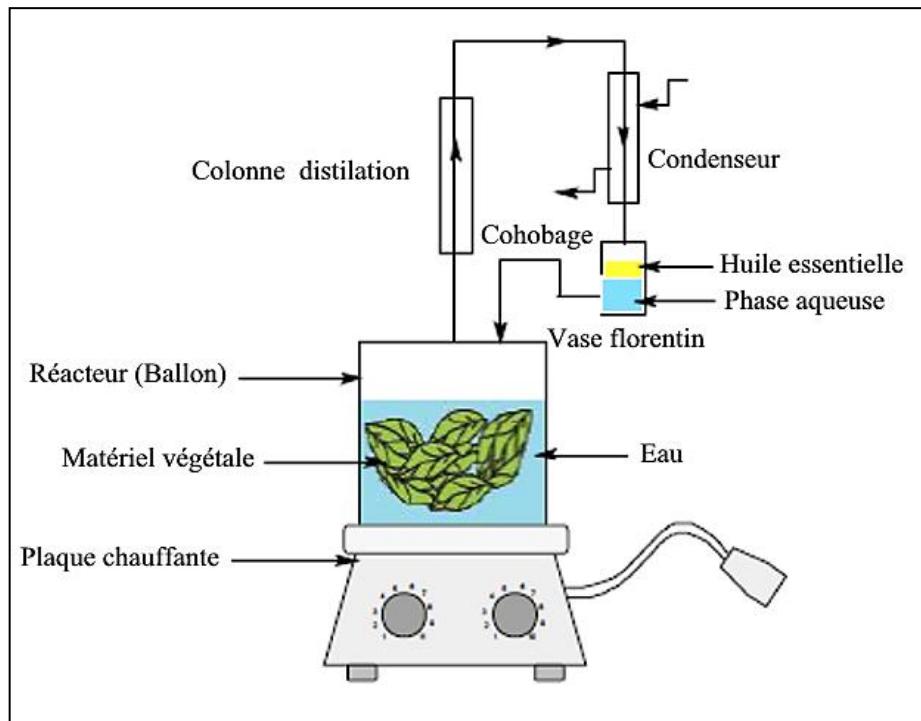


Figure 11: Schéma du procédé de la Hydrodistillation (Chenni, 2016)

2-9-2- Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes anciennes pour l'obtention des huiles essentielles, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques (Bego, 2001). A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct, l'eau et la matière végétale à traiter (Figure 12). Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement.

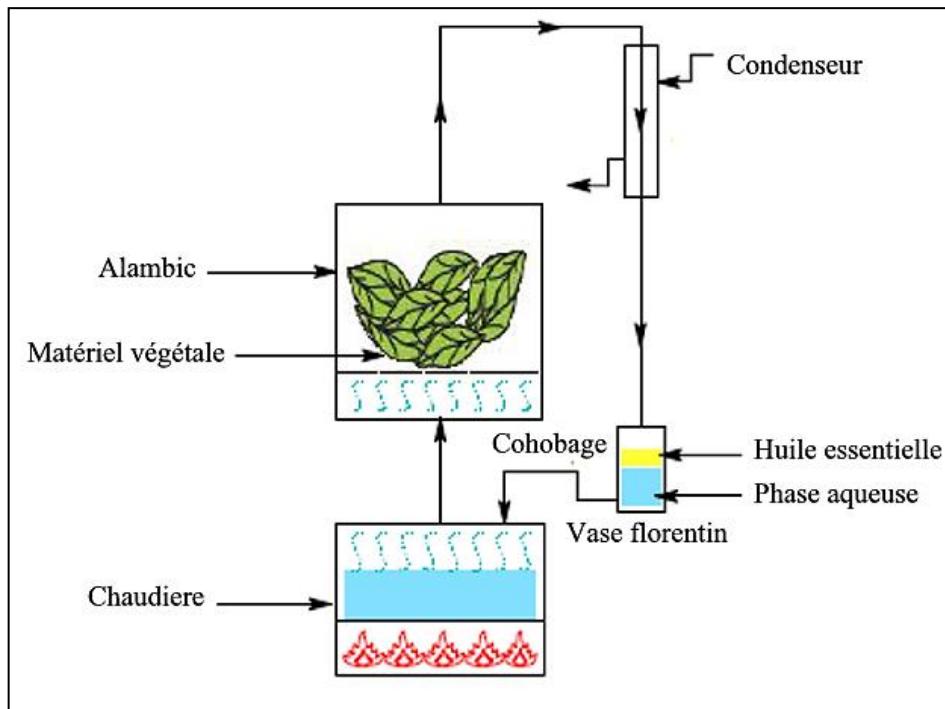


Figure 12: Schéma du montage de l'entraînement à la vapeur d'eau (Chenni, 2016)

Les vapeurs d'eau chargées en composés volatils sont ensuite condensées avant d'être décantées. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes, phase aqueuse et phase organique: l'huile et l'eau condensées que l'on appelle eau florale ou hydrolat (Belaïche, 1979). Cette technique permet d'éviter des réactions lors du contact des constituants des huiles essentielles avec l'eau conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait (Nixon and McCaw, 2001).

2-9-3- L'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure 13). Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau + huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (Lucchesi, 2005).

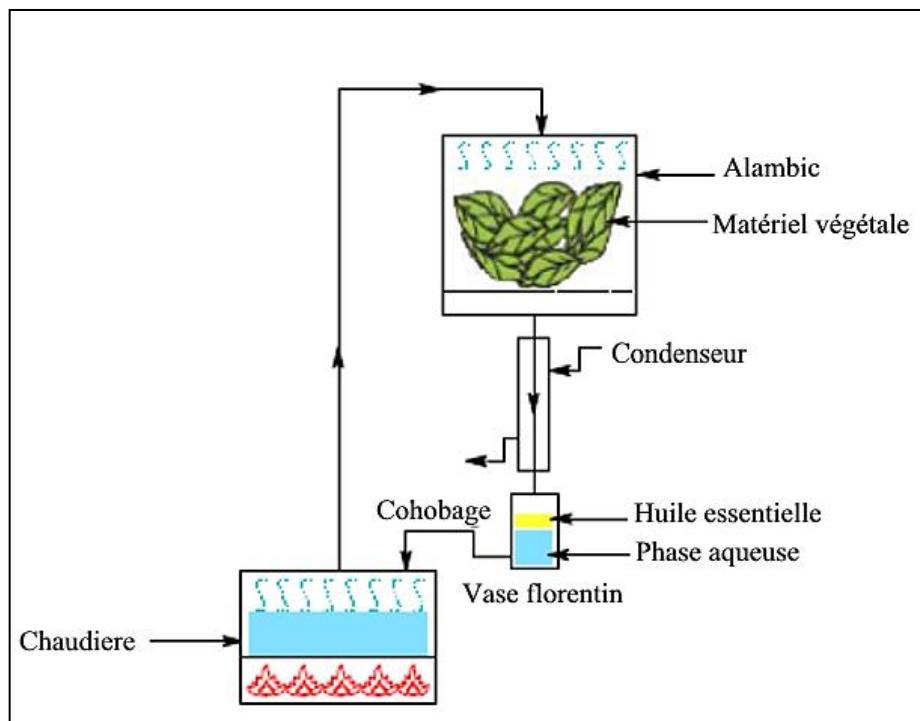


Figure 13: Schéma du dispositif de l'hydrodiffusion (Chenni, 2016)

2-10- Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les plantes aromatiques. Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques. Certains constituants des huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant très marqué et sont aujourd’hui commercialisés, c'est le cas de l'eugénol (Nagababu and Lakshmaiah, 1992; Ogata *et al.*, 2000; Barclay *et al.*, 2006; Amorati *et al.*, 2013), le thymol (Echazú *et al.*, 2017; Luna *et al.*, 2017; Meeran *et al.*, 2017; Razavi *et al.*, 2017) et le carvacrol (Zareiyan *et al.*, 2017; Baranauskaite *et al.*, 2017; Homayounia *et al.*, 2017).

De nombreuses huiles essentielles présentent un pouvoir antioxydant (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006; Aazza *et al.*, 2011; Trifan *et al.*, 2015; Sudipta *et al.*, 2017; Baschieri *et al.*, 2017; Tohidi *et al.*, 2017; Asprea *et al.*, 2017; Hailu *et al.*, 2017; Dib *et al.*, 2017; Zaixiang *et al.*, 2017; Sahraoui *et al.*, 2017; Dahmane *et al.*, 2017; Guenane *et al.*, 2017; Bendif *et al.*, 2017; Benabed *et al.*, 2017).

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers (Edris, 2007), l'huile

essentielle des graines de *Nigella sativa* (Ait Mbarek *et al.*, 2007; Vaiyapuri *et al.*, 2016; Khalife *et al.*, 2016; Bahramian *et al.*, 2017; Czajkowska *et al.*, 2017), l'huile essentielle des rhizome de *Curcuma* (Hongping *et al.*, 2017; Naqvi *et al.*, 2017; Youdi *et al.*, 2017), d'autre part l'huile essentielle d'*Allium sativum* (Srivastava *et al.*, 1995; Singh and Singh *et al.*, 2008; Chunyang *et al.*, 2017; Toshihiro *et al.*, 2017).

Plusieurs études ont mis en évidence l'activité cytotoxique des huiles essentielles dans leur ensemble (Ahmad *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1992 ; Mary Helen *et al.*, 2012; Hajlaoui *et al.*, 2016; Aliberti *et al.*, 2016; Su and Hou, 2016; Hamdan *et al.*, 2016; Felhi *et al.*, 2017; Coté *et al.*, 2017; Oukerrou *et al.*, 2017; Da silva *et al.*, 2017; Al-Gendy *et al.*, 2017; Nur *et al.*, 2017; Jardak, *et al.*, 2017; Bendif *et al.*, 2017; Ramdane *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2017).

Beaucoup d'articles scientifiques sont publiés chaque année par des médecins, des pharmaciens, des biologistes et des chercheurs qui travaillent sur les multiples propriétés des huiles essentielles et l'intérêt s'est porté tout particulièrement sur leur activité antimicrobienne. Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Lamiaceae* (Ramdan *et al.*, 2017), l'huile essentielle de thym (El Ajouri *et al.*, 2008 ; Kamdem *et al.*, 2015; Adrar *et al.*, 2016; Tamert *et al.*, 2017), l'huile essentielle de origan (Soares *et al.*, 2017; Bouyahya *et al.*, 2017; Nabet *et al.*, 2017; Özkan *et al.*, 2017), l'huile essentielle de la lavande (Minooeianhaghghi *et al.*, 2017; Miliani, *et al.*, 2017; Benbelaid *et al.*, 2012, Ouedrhiri *et al.*, 2017); l'huile essentielle de menthe (Mimica-Dukić *et al.*, 2003; Abdelli *et al.*, 2016; Chrysargyris *et al.*, 2017), l'huile essentielle du romarin (Khia *et al.*, 2014; Bouyahya *et al.*, 2017; Hadian *et al.*, 2017), l'huile essentielle de la sauge (Adrar *et al.*, 2016; Salari *et al.*, 2016; Cutillas *et al.*, 2017; Moghimi *et al.*, 2017).

Cette activité de ces huiles est due principalement à ces composés majoritaires tels que le thymol, le carvacrol, le 1,8-cinéole et le p-cymène, qui sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques (Pellecuer *et al.*, 1980; Didry *et al.*, 1994; Kordali *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009; Raquel *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011; Morcia *et al.*, 2012; Ulloa *et al.*, 2017; Boonruang *et al.*, 2017; Miladi *et al.*, 2017; Marchese *et al.*, 2017).

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles 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; Amara *et al.*, 2017).

De nombreux travaux ont mentionnés les propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes (Qiang *et al.*, 2016; Hanáková *et al.*, 2017; Dzoyem *et al.*, 2017; Nile *et al.*, 2017; Sülsen *et al.*, 2017). Les huiles essentielles, possédant des aldéhydes, ont des propriétés actives contre l'inflammation, comme l'huile de Gingembre (Ezzat *et al.*, 2017; Rondanelli *et al.*, 2017; Abolaji *et al.*, 2017).

Malgré les nombreuses molécules synthétiques susceptibles d'être utilisées, la protection des végétaux peut également se faire avec certaines essences naturelles. Une dizaine d'huiles essentielles sont répertoriées comme ayant des activités insecticide ou insectifuge sur les moustiques et autres insectes (Ayvaz *et al.*, 2010; Zoubiria *et al.*, 2014; Sharon *et al.*, 2014; Jun-Hyung and Murray *et al.*, 2015; Govindarajan *et al.*, 2016; Hussein *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2017; Ganiyu *et al.*, 2017; Demircia *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2017).

2-11- Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont considérées comme une matière première destinée à divers domaines (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante.

Plusieurs techniques et méthodes permettent d'analyser quantitativement et qualitativement les huiles essentielles (Joulain and König, 1994; Audigie *et al.*, 1995). Parmi ces méthodes d'analyse, la chromatographiques est la méthode la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles (Schwedt, 1993).

2-11-1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est basée sur le principe de la chromatographie de partage (Tranchant, 1964). La phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti ou greffé sur un support inerte, la phase mobile est constituée de gaz inerte (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur, Il doit être très pur et surtout ne pas contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur. La solution est injectée au moyen d'une seringue soit manuellement, soit avec un injecteur automatique qui permet d'obtenir une meilleure reproductibilité. La chambre d'injection est maintenue à une température telle que la vaporisation de l'échantillon, se fait dans un temps le plus court possible. La séparation des composés dépend du type de colonne utilisée et de la polarité de la phase stationnaire (Arpino *et al.*, 1995).

Après avoir choisi le type de colonne appropriée et un programme de température adéquat, la détection des composés, est obtenue par un détecteur FID (détecteur par ionisation à flamme). Dans le cas des huiles essentielles, le FID est le détecteur le plus cité dans la littérature. Pour d'autres applications particulières, recherche de pesticides par exemple, les détecteurs de type ECD (détecteur à capture d'électron) ou TSD (détecteur thermo-ionique spécifique) sont les plus adaptés. Ces détecteurs sont rarement utilisés pour l'analyse des huiles essentielles en raison de leur grande sensibilité envers les atomes de chlore, d'azote ou de phosphore, atomes qui sont peu rencontrés dans celles-ci (Caude et Jardy, 1996).

L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. En effet, les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne etc...) (Sutour, 2010).

Une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation des indices de rétention (IR), mesurés sur les colonnes apolaire et polaire, qui sont plus fiables que les temps de rétention (TR).

Les indices de rétention (IR) sont calculés à partir d'une gamme d'étalon d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires. Le calcul peut se faire pour une expérimentation à température constante par interpolation logarithmique: indices

de Kováts (IK) (1965). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes.

L'indice de rétention de Kovats par la relation :

$$IK = 100n + 100x \frac{Tr[A] - Tr[Cn]}{Tr[C(n+1)] - Tr[Cn]}$$

Où : IK est l'indice de Kovats

n : nombre d'atomes de carbone de la paraffine (alcano) précédent immédiatement le produit inconnu x.

Tr (A) : temps de rétention du produit inconnu x.

Tr (Cn) : temps de rétention de la paraffine (alcano) à n atomes de carbone précédent immédiatement le produit x.

Tr [C (n+1)]: temps de rétention de la paraffine (alcano) à n+1 atomes de carbone suivant immédiatement le produit x.

Les indices de rétention sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence (bibliothèque du laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire. (Van Den Dool et Kratz, 1963). Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique: en général la spectrométrie de masse CPG/SM.

2-11-2- Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (GC/SM)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine la séparation et l'identification (les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse) afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par la spectrométrie de masse. (Longevialle, 1981; Lafferty and Michnowicz, 1992; Constantin, 1996; De Hoffmann *et al.*, 1999).

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. (Desjobert et *al.*, 1997; Bruneton, 1999). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (IR) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées construites au laboratoire ou commerciales (Lafferty and Stauffer, 1994; Joulain and König, 1998; NIST, 1999; Adams, 2001).

Lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus dans les bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatoires telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CLC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparatoire (CGP). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-1H) et du carbone-13 (RMN-13C), SM, IRTF,...(Paolini, 2005).

CHAPITRE II

MATERIEL ET

METHODES

1- Matériel végétal

1-1- Description des espèces échantillonnées

Diverses recherches ont été consacrées aux plantes médicinales appartenant au genre *Helichrysum*, dont certaines espèces sont peu étudiées. Les espèces du genre *Helichrysum* sont des Angiospermes dicotylédones appartenant à la famille des *Asteraceae* et à la tribu des *Gnaphalieae*. Ce genre est très largement répandu dans le monde ; en Algérie il est représenté par trois espèces: *Helichrysum stoechas*, *H. italicum* et *H. lacteum* (Quézel et Santa, 1963).

1-1-1- *Helichrysum stoechas*

L'immortelle commune, est une espèce vivace, polymorphe, aromatique. La tige, de 10-60 cm, est ligneuse à la base. Les feuilles sont linéaires, lancéolées-obtuses, non odorantes par froissement. Les capitules sont assez gros de 5-7 mm, regroupés en corymbes, globuleux ou campanulés, de couleur jaune doré. Les bractées externes de l'involucré sont ovales ou oblongues, entièrement scarieuses, glabres ou velues à la base, les akènes sont finement papilleux. Les fleurs qui se dessèchent persistent sur la plante, tout en gardant leur belle couleur dorée, ce qui évoque l'immortalité. C'est une plante cosmopolite.

En Algérie l'*H. stoechas* est représentée par deux sous-espèces (*rupestre* et *scandens*) (Quézel et Santa., 1963).

1-1-1-1- *Helichrysum stoechas* ssp. *rupestre*

C'est un arbuste vivace endémique du pourtour méditerranéen caractérisé par ses capitules en corymbe lâche, peu nombreux. Les feuilles sont souvent glabrescentes en dessus et tomenteuses en dessous. Les bractées de l'involucré sont ovoïdes. Cette plante se trouve dans le Tell algérois et constantinois (Figure 14). Cette sous espèce possède plusieurs synonymie: *H. fontanesii*., *H. rupestre*., *Gnaphalium stoechas* (Quézel et Santa, 1963).



Figure 14: *Helichrysum stoechas* ssp. *rupestre* (Photo Bouchaala Meriem, 2015)

1-1-2- *Helichrysum stoechas* ssp. *scandens*

C'est une plante vivace à capitules en corymbe peu nombreux. Les feuilles sont tomenteuses en dessus (bien que vertes), très blanches en dessous. Les bractées de l'involucré sont aiguës, les intérieurs linéaires à partie coriace, elle est couverte de glandes dorées (Figure 15).

La sous-espèce *scandens* possède plusieurs synonymes : *Gnaphalium scandens*, *H. caespitosum*, *H. rupicolum*, *H. decumbens*, *H. stoechas* ssp. *ruplicolum* (Quézel et Santa, 1963).



Figure 15: *Helichrysum stoechas* ssp. *scandens* (Photo Bouchaala Meriem, 2015)

1-1-3- *Helichrysum lacteum*

C'est une plante vivace, gazonnante, de 10 à 40 cm. Les rameaux sont stériles présentent la particularité de se terminer par une rosette de feuilles et de se renfler parfois en tubercules aériens. Les feuilles sont oblongues ou spatulées, tomenteuses aranéeuses; celles des hampes florifères sont flexueuses. Les capitules globuleux, de près de 1 cm, sont pédonculés et réunis en corymbe dense. Les bractées de l'involucré sont poilues à la base et égalant les fleurs, de couleur argentée, laiteuses et brillantes et dressées.

L'*H. lacteum* est une plante aromatique d'Afrique du Nord (Algérie, Maroc) aux fleurs blanches (Figure 16). Cette espèce est représentée en Algérie par une variété endémique *typicum*, elle est commune dans les clairières de cèdres et de pâturages de montagne (Quézel et Santa, 1963).



Figure 16: *Helichrysum lacteum* var. *typicum* (Photo Bouchaala Meriem, 2015)

1-1-4- *Helichrysum italicum*

Helichrysum italicum, appelée l'immortelle d'Italie, est une plante vivace, aromatique, atteignant 20 à 50 cm de hauteur, tomenteuse, à feuilles odorantes par froissement, grises, fortement enroulées. Les fleurs de couleur jaune sont regroupées au sommet des tiges en bouquet compact. Les capitules sont disposés en corymbe fourni, cylindriques, étroits, pédonculés. Les bractées de l'involucre dorées, sont étroites, les intérieures généralement glanduleuses. Les fruits sont des akènes à glandes disséminées, blanches et brillantes (Figure 17).

Cette espèce possède plusieurs synonymes: *H. angustifolium* var. *numidum*, *H. stoechas* ssp. *numidicum*, *Gnaphalium italicum*, *H. angustifolium* (Quézel et Santa, 1963). L'espèce *H. italicum* se localise au sud de l'Europe et en Afrique du Nord, c'est une plante endémique méditerranéenne (Mastelic *et al.*, 2008). Elle pousse dans les forêts claires, sur des graviers montagnards ou sur des sols secs. Cette espèce est représentée en Algérie par une variété endémique *numidicum* (Quézel et Santa, 1963).



Figure 17: *Helichrysum italicum* var. *numidicum* (Photo Bouchaala Meriem, 2015)

1-2- Lieux de récolte des espèces étudiées (Zone d'étude)

La détermination des espèces a été réalisée sur des échantillons possédant les parties aériennes végétatives (tiges et feuilles) et reproductives (fleurs, et graines) qui constituent les éléments fondamentaux de leur identification. L'identification a été facilitée par l'utilisation de la flore de Quézel et Santa (1963). Les échantillons témoins, sont conservés au laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles.

Après la localisation des espèces du genre *Helichrysum* le choix des stations échantillonnées, lieu de prélèvement des espèces étudiées, est basé sur la présence et l'accessibilité à ces espèces et selon les moyens mis à notre disposition. Cinq stations ont été choisies pour la récolte des échantillons du genre *Helichrysum*.

L'H. italicum a été récoltée dans la station des Bibans (wilaya de Bordj Bou Arreridj) durant le mois de mai 2014, l'*H. lacteum* de la station de Mègres au mois de

juin 2014 (wilaya de Sétif) et pour les échantillons de l'espèce *H. stoechas*, sous-espèce *rupestris* de la station de Darguina au moins d'avril 2014 (wilaya de Bejaïa) alors que la sous-espèce *scandens* est prélevée de la station de Boutaleb durant le mois de février 2014 (wilaya de Sétif) (Figure 18). De chaque station, un prélèvement de la plante (tige, feuille et inflorescence) en plein stade de floraison a été réalisé pour les analyses phytochimiques et des graines matures ont été prélevées pour l'étude caryologique.

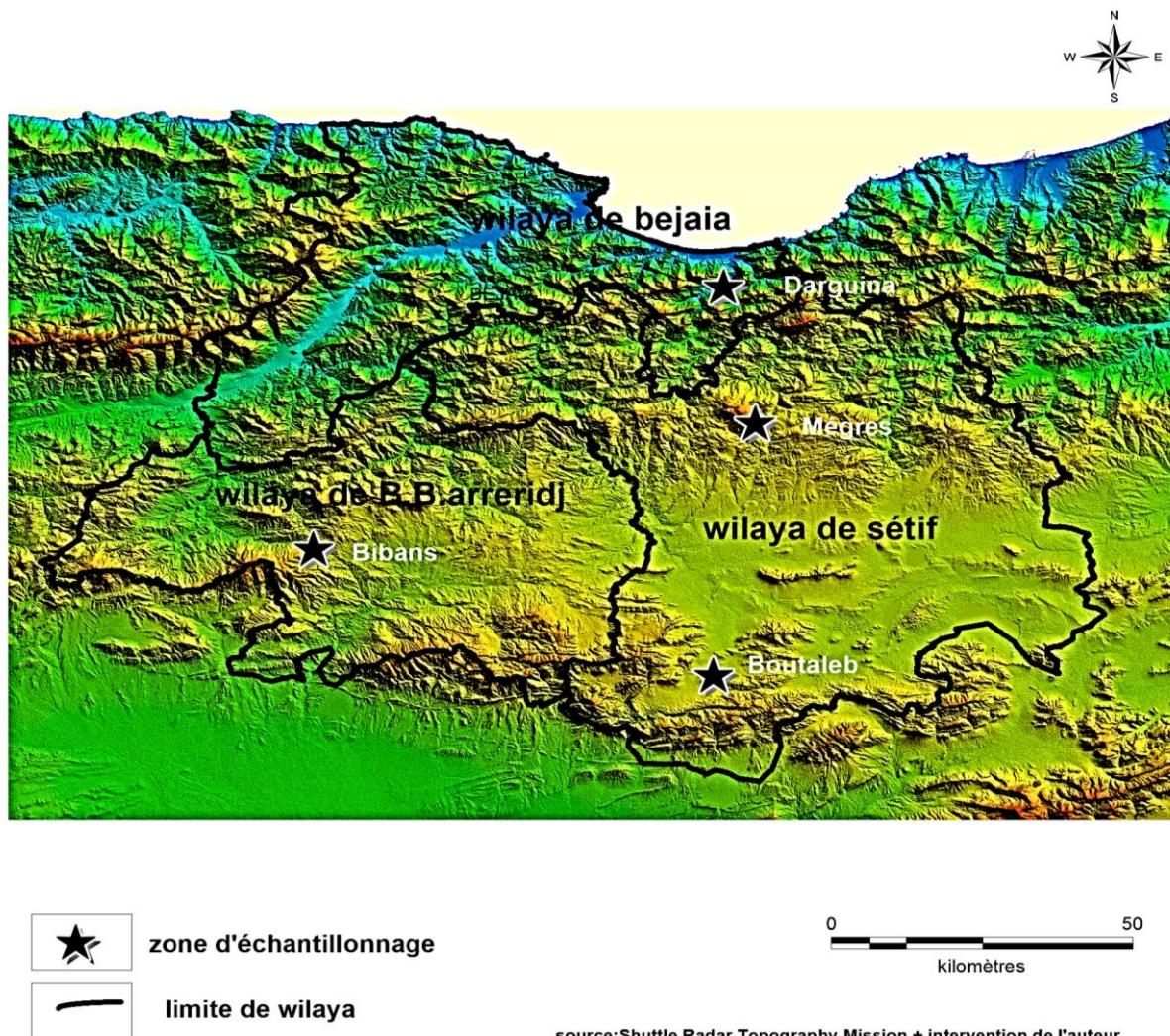


Figure 18 : les zones d'échantillonnage des espèces du genre *Helichrysum*

2- Méthodes expérimentales

2-1- Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* étudiées a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Figure 19). L'hydrodistillation se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles.

L'opération consiste à introduire 300 g de matériel végétal (tiges, feuilles, fleurs bourgeons), coupés en petits morceaux dans un ballon en verre contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles passent à travers le tube vertical, puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. En raison de la différence de densité, l'huile essentielle surnage à la surface de l'eau.

L'extraction a été réalisée au laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles (VRBN) de l'Université de SETIF 1. Les huiles essentielles récupérées sont conservées dans des tubes bien fermés, en verre ombré, à l'abri de la lumière et stockée à 4°C jusqu'à l'utilisation.



Figure 19: Dispositif d'extraction des huiles essentielles, type Clevenger

2-1-1- Calcule du rendement en huile essentielle

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

$$R\% = \frac{MHE}{MVS} \times 100$$

R% : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

MHE: Masse d'huile essentielle.

MVS : Masse de la matière végétale.

2-2- Analyse chimique des huiles essentielles

L'analyse chromatographique des huiles essentielles étudiées est réalisée dans le laboratoire de chimie des huiles essentielles à l'Université Blaise Pascal de Clermont- Ferrand (France).

La séparation et l'identification des constituants volatiles des huiles essentielles des espèces de genre *Helichrysum* ont été réalisée au moyen de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (GC/SM). La détermination quantitative a été faite sur un appareil équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (CG/FID).

Chromatographe Hewlett-Packard HP 7890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG/FID). Les conditions opératoires utilisés se trouvent ci-dessous :

Conditions opératoires

- Colonne: Apolaire : DB5 MS: 40 m x 0,18 mm 0,18 µm
- Gaz vecteur : Hélium: 1 ml/min
- Température de l'injecteur: 280 °C avec diviseur 1/100
- Température du détecteur: 280°C
- Programmation du four: 50°C pendant 5min, 5°C/min, °C jusqu'à 300°C
- Injecteur mode split 1: 60

L'appareil utilisé est un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard HP 5890 couplé avec un spectromètre de masse Hewlett Packard HP 5975-C. Une banque de spectre de masse informatisée est couplée à ce système pour une caractérisation préliminaire des composants de l'huile essentielle. Les conditions opératoires utilisés se trouvent ci-dessous :

Conditions opératoires

- Colonne: Apolaire : DB5 MS: 40 m x 0,18 mm 0,18 µm
- Gaz vecteur: Hélium: 1 ml/min
- Energie d'ionisation: 70^e V
- Température de l'injecteur: 280 °C avec diviseur 1/100
- Température du détecteur: 280°C
- Programmation du four: 50°C pendant 5 min, 5° C/min, °C jusqu'à 300°C
- Injecteur mode split 1: 100

En effet, dans les conditions de programmation de température constantes au CPG, le temps de rétention d'un composé reste également constant. Mais, en pratique, les conditions d'analyse varient beaucoup et, pour cette raison, le temps de rétention seul ne serait fiable. Avec l'introduction du système des indices de Kovats (IK), l'identification des différents composés des huiles essentielles est devenue plus pratique. Le calcul des indices de Kovats (IK) se fait en utilisant les temps de rétention corrigés des deux alcanes qui encadrent le composé inconnu (Maarse et Belz, 1981). Ces indices expriment la rétention d'un produit comparé à son homologue hydrocarbure linéaire, examiné dans les mêmes conditions de température.

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs IK avec ceux des bases de données Adams et celle établie par le laboratoire d'accueil. Les résultats d'analyse sont traités par des techniques numériques d'analyse des données

2-3- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

2-3-1- Préparation des milieux de culture

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, la gélose Mueller Hinton a été utilisée. En effet il s'agit d'un milieu non sélectif et qui comporte des ions favorisant une bonne diffusion des antibiotiques. La gélose de Muller Hinton stérile a été coulée dans des boites de pétrier stériles de 90 mm de diamètre, l'épaisseur de la gélose doit être de 2 mm, répartie puis séchées pendant 30 min à une température ambiante avant leur emploi. Avant solidification de la gélose, les boites ont été disposées sur une surface plane afin d'assurer une bonne uniformisation de la surface de la gélose.

2-3-2- Test de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelée méthode d'aromatogramme. Bien que la technique de l'aromatogramme soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs.

Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur un tapis

bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'huile essentielle. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé (Figure 20). La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

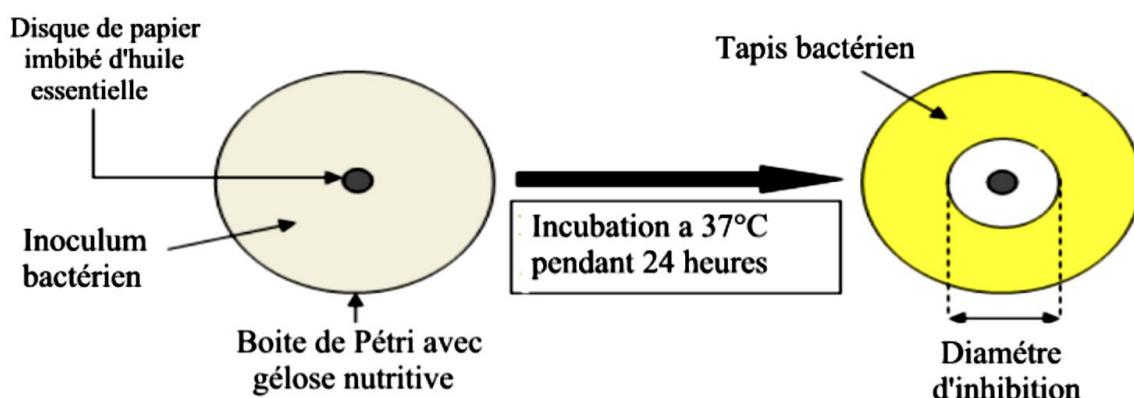


Figure 20: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme

L'étude de l'aromatogramme a été réalisée sur cinq souches fréquentes en pathologie humaine, qui sont fournies par le CHU Saâdna Abdenour de Sétif. Une Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592), quatre gram négative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Shigella sp*) et une levure (*Candida albicans*).

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné. Leur croissance est réalisée à 37°C en milieu nutritive sur gélose Müller-Hinton. Les antibiotiques ; Gentamicine (GENT), Cefotaxime (CTX) et Colistin sulfate (CS) ont été utilisés comme un témoin positif.

2-3-3- Préparation de l'inoculum

Les bactéries à tester ont été ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant des milieux sélectifs appropriés aux souches bactériennes utilisées puis incubées à 37°C

pendant 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées. Après ce temps d'incubation, des colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis émulsionnées dans un tube contenant 2 ml d'eau physiologique en agitant au vortex. La densité de l'inoculum est ajustée à 0,5 Mc Farland grâce à un Densimat.

2-3-4- Ensemencement

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension bactérienne puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boite à environ 60°C, après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. L'ensemencement effectué de telle sorte assure une distribution homogène des bactéries. Il faut charger l'écouvillon à chaque fois pour chaque boite.

2-3-5- Préparation des disques

Des disques vierges de 6 mm de diamètre (stérile) sont déposés à la surface du gélose ensemencée après avoir été chargé de 10 µl d'huile essentielle de chaque espèces, des dilutions au DMSO (dimethylsulfoxide) à 1/2, 1/5 et 1/10 (v/v) ont été faites et disposés sur les autres disques. D'autres disques, chargés de 10 µl de DMSO sont utilisés comme témoins négatifs.

Des antibiogrammes (témoins positifs) sont effectués en parallèle avec les aromatogrammes. Le test est répété trois fois pour avoir des résultats fiables.

2-3-6- Incubation et lecture

Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques.

Pour savoir si l'effet des huiles est bactéricide ou bactériostatique, un prélèvement à partir de la zone d'inhibition est transféré dans un tube contenant du bouillon nutritif. Ce dernier est incubé dans une étuve à 37°C pendant 24 h, puis

examiné à l'œil nu. Un milieu trouble indique un effet bactériostatique, tandis qu'un milieu clair indique un effet bactéricide de l'huile testée.

2-4- Evaluation de l'activité cytotoxique des huiles essentielles *in vitro*

Le test de cytotoxicité des huiles des espèces du genre *Helichrysum* a été réalisé au Laboratoire de Sciences Végétales et Fungique à l'université Paul-Sabatier de Clermont Ferrand sous la direction du professeur Florence Caldefie-Chezet.

L'évaluation de la cytotoxicité des huiles essentielles des espèces de genre *Helichrysum* est réalisée par une technique en utilisant la résazurine. Cette technique utilisée repose sur l'estimation de la viabilité cellulaire par spectrophotométrie.

Cette expérience a été effectuée sur la lignée de cellules cancéreuses mammaires appelé MCF-7 (acronyme de Michigan Cancer Fondation 7). Ce sont des cellules épithéliales dérivant d'un adénocarcinome de sien. Cette lignée est la plus utilisée dans les laboratoires spécialisés dans la cancérologie du sein.

2-4-1- Le test à la résazurine

La résazurine est un composé non-fluorescent et de coloration bleue, non toxique, perméable aux membranes cellulaires, commercialisé sous le nom de « bleu alamar ». Elle fonctionne comme un indicateur de la viabilité des cellules en mesurant le pouvoir de réduction de celles-ci. Ce test est fondé sur la réduction de la résazurine (bleue non fluorescente) en résorufine (rose fluorescente) par des cellules métaboliquement active et dont l'intensité de fluorescence ou de coloration rose obtenue est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (Figure 21).

La fluorescence est ensuite mesurée grâce à un lecteur de plaque (Fluoroskan Ascent FL) à 590 nm.

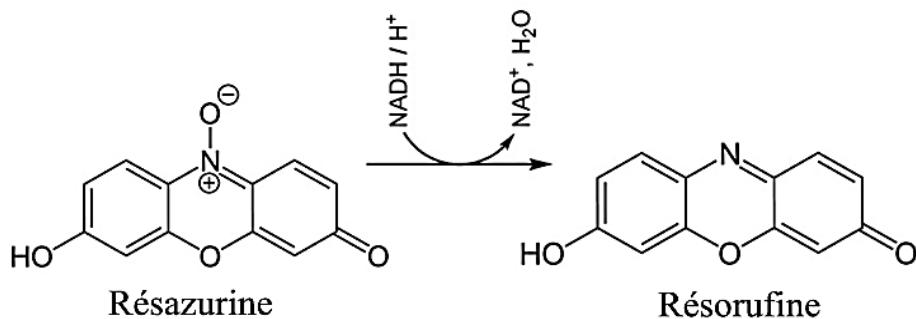


Figure 21 : La réduction de la résazurine en résorufine.

2-4-2- Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence obtenue après lecture au Fluoroskan Ascent FL est convertie en pourcentage de viabilités cellulaires par rapport à la prolifération des cellules témoins DMSO, il est établi que le DMSO n'a aucune influence sur la prolifération des cellules. Les effets cytotoxiques des huiles essentielles ont été évalués en pourcentage de viabilité cellulaire.

Pour chaque huile essentielle, la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) est mesurée à 50 % de viabilité cellulaires. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm ESM (Ecart Standard a la Moyenne).

2-4-3- Mode opératoire

1^{ère} étape : criblage

Cette étape consiste à évaluer l'effet cytotoxique de quatre concentrations d'HE sur la viabilité des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. Sur une plaque de 96 puits, il y a la possibilité de tester une seule huile essentielle (HE) à quatre concentrations différentes, séparées par des colonnes d'eau +1 colonne témoin (DMSO).

Jour 1 : Ensemencement des cellules

La première étape consiste à préparer le milieu de culture RPMI additionnée d'insuline humaine (RPMI Ins+), de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1 % de Glutamine. La deuxième étape consiste à préparer la suspension cellulaires.

Avant le début du test, les cellules sont comptées sur une lame de Malassez (plaqué de microscope quadrillée). Pour cela la suspension cellulaire est mélangée avec de bleu de trypan, avant d'être déposée, après homogénéisation, sur une lame de Malassez. Cette étape se fait en double par un double contage

A partir du double comptage, la suspension cellulaire de MCF-7 est préparée à la concertation souhaitée avec le milieu de culture complet préparée au préalable.

La suspension est ensuite ensemencée dans des plaques de 96 puits (plaqué test et plaque T₀), dans un volume de 200 µl par puits et de 100 µl d'eau sur les puits en périphérie, pour éviter les effets de bords. Les plaques sont ensuite mises dans l'incubateur (24 h à 37°C, air humidifié, 5 % CO₂).

- Plaque test (Huile): Ensemencement de 10 000 cellules/puits dans 5 colonnes de 6 puits d'une plaque de 96-puits
- Plaque T₀ (Témoin): Ensemencement de 10 000 cellules/puits dans 2 colonnes de 6 puits d'une plaque de 96-puits.

Jour 2 : Lecture du T₀ et traitement des cellules

Cette étape consiste à mesurer la prolifération des cellules MCF-7 dans la plaque T₀ à l'aide de la solution de résazurine diluée au 1/50 dans du PBS-10 % SVF par lecture au Fluoroskan Ascent FL, après 24 h à fin vérifier leur bonne prolifération.

Préparation des dilutions d'huiles

Pour chaque huile une solution mère à 1% dans du PBS doit être préparée (50 µl d'HE 100 % + 50 µl DMSO+ 490 µl PBS). A partir de celle-ci les concertations d'huiles essentielles testées sont préparées par dilutions dans un milieu RPIM complet. La concentration de témoin (DMSO) correspond à la plus forte concentration HE testé (Figure 22).

Il faut repartir 200 µl de chaque concentration d'HE par puits et 200 µl de témoin dans la colonne du contrôle, ensuite distribuer 100 µl d'eau dans les puits en périphérie et entre les colonnes d'HE. Puis les plaques sont mises à incuber pendant 72h à 37°C.

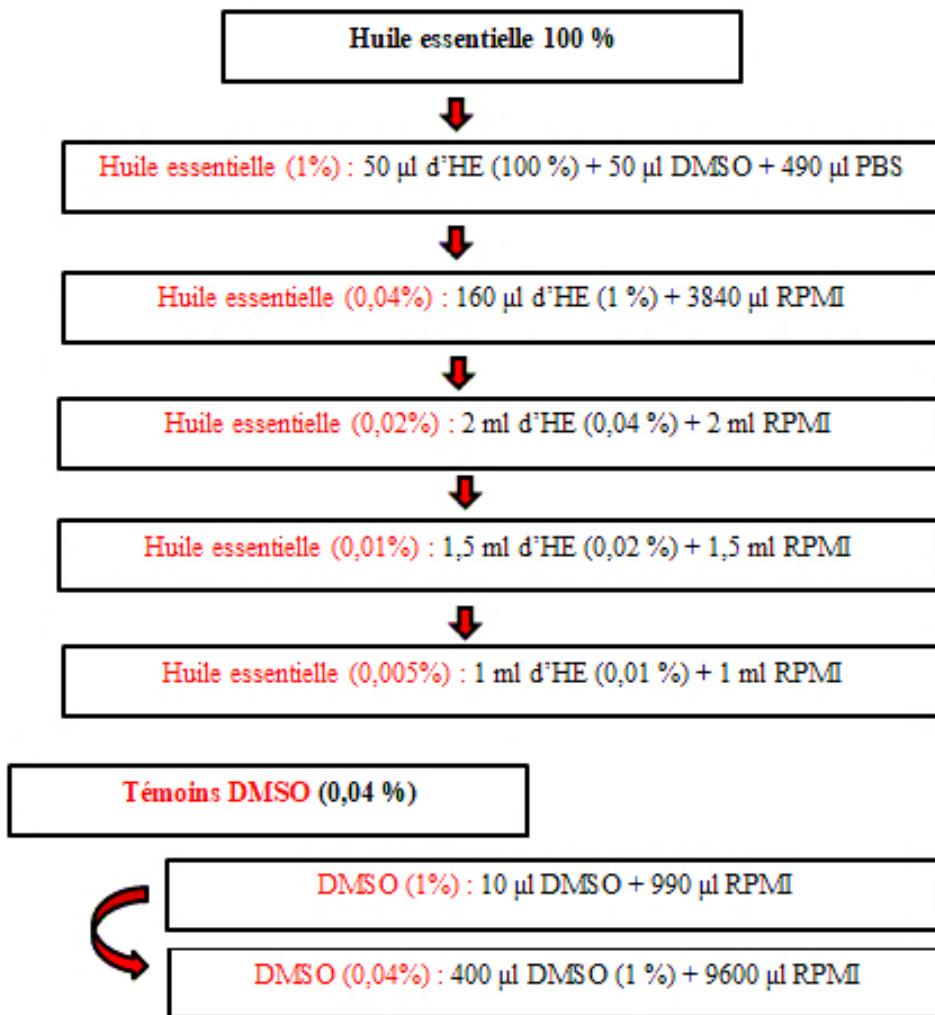


Figure 22: Schémas de la gamme de criblage des huiles essentielles

Jour 5 : lecture de la viabilité des cellules

Après 72 h de culture, la prolifération des cellules est mesurée à l'aide de la solution la résazurine. 200 µl de résazurine, diluée au 1/50 dans du PBS- 10 % SVF, sont à distribuer dans chaque puits + 1 colonne sans cellule (fluo de base). Les plaques sont mises ensuite à incuber pendant 2 heures à 37 °C. La Lecture des plaques a été effectuée avec un fluoroskan à 590 nm.

2^{eme} étape : Amélioration des concentrations ciblées pour criblage

Si lors de la 1^{ère} étape de criblage aucune modification de la viabilité n'est observée, l'étude de l'extrait est abandonnée. Si au contraire, un effet cytotoxique est observé, un second criblage sera réalisé en affinant les concentrations testées.

3^{eme} étape : Evaluation de l'effet cytotoxique

Lorsque les bonnes concentrations de criblage auront été déterminées, 3 essais indépendants seront réalisés dans les mêmes conditions, afin de valider les résultats obtenus.

2-5- Technique caryologie

L'étude caryologique est réalisée sur les méristèmes racinaires prélevés sur des graines germées, des quatre espèces (*H. stoechas* ssp. *scandens*, *H. stoechas* ssp. *rupestris*, *H. italicum* et *H. lacteum*), dont l'analyse cellulaire révélerait le plus grand nombre de mitoses possibles. Cette technique d'écrasement ou squash passe par plusieurs étapes.

2-5-1- Prétraitement

Le but des cultures est de permettre le prélèvement des pointes de racine dont l'analyse cellulaire révèlerait le plus grand nombre de mitose possibles. Les semences sont mises à germer sur du papier filtre saturé d'eau distillée dans des boites de pétri, à une température de 4°C. Après germination des graines, les racines sont prélevées quand elles auront 1cm de long ou dès l'apparition des poils absorbants.

Le prétraitement consiste à prélever des pointes de racines avec les zones méristimatiques et les mettre dans une solution antimitotique saturée. La solution antimitotique choisie est la colchicine à une concentration de 0,05%. La colchicine est de loin la substance qui présente le moins de danger, parmi d'autres substances antimitotiques. Cette solution inhibe la formation du fuseau achromatique et retardent la division du centromère, ce qui entraînera l'éparpillement des chromosomes dans les cellules. Les pointes de racines sont immergées dans la colchicine à 0,05% pendant 1h 30 mn, à température ambiante et à l'obscurité.

2-5-2- Fixation

Le but de fixation est d'empêcher toute activité cellulaire ultérieure en tuant les cellules sans les altérer. De plus, la fixation améliore le contraste entre les chromosomes et le fond cytoplasmique (Jahier *et al.*, 1992).

Dans notre étude nous avons utilisé le fixateur de Farmer et Moore (1905), c'est un mélange d'éthanol pure et d'acide acétique glacial (3v : 1v). Le fixateur assure en même temps la fixation des chromosomes et un mordançage de la préparation. La fixation peut être suivie d'un traitement de maturation approprié. Les racines sont maintenues dans le fixateur au moins 24 h à une température de -4°C. Si les préparations ne sont pas utilisées au bout de 48 h, elles doivent être conservées en augmentant le volume d'alcool jusqu'à (9v : 1v).

2-5-3- Maturation

La maturation facilite l'écrasement des pièces et la répartition de la préparation en couches unicellulaires lors des colorations par écrasement (Squash). Pour les racines destinées à être colorées par l'orcéine acétique, la maturation se fait dans l'acide acétique à 45 % pendant 10 à 15 minutes et à température ambiante.

2-5-4- Coloration et Technique d'écrasement (Squash)

Le colorant utilisé est l'orcéine acétique, qui a l'avantage de ne pas colorer les nucléoles, ni les membranes nucléaires, ni le cytoplasme; seuls les chromosomes en mitose prennent la coloration et ils n'ont pas tendance à se "sur-colorer".

2-5-4-1- Préparation de l'orcéine acétique (Jahier et al., 1992)

Dissoudre 2,2 g d'orcéine dans 100 ml d'acide acétique pur cristallisable à chaud; faire bouillir doucement pendant 5 minutes, laisser refroidir et filtrer (Solution I). Conserver à l'abri de la lumière. Au moment de l'emploi, on prend 4,5 ml d'orcéine acétique (solution I), on y ajoute 5,5 ml d'eau distillée (Solution II). Pour la coloration on prend 9 ml de la solution II et on ajoute 1ml d'HCL normal (Solution III), le montage se fait dans la solution II.

2-5-4-2- Coloration et écrasement des racines

La coloration des chromosomes améliore leur visibilité et facilite la séparation des cellules. La coloration est réalisée en plaçant les pointes des racines dans des

verres de montre en pyrex contenant de l'orcéine acétique (solution III préparée au moment de l'emploi).

On chauffe sur bec bunsen jusqu'à émission de vapeurs blanches, puis on isole le méristème racinaire sous la loupe et on le place sur une lame. Le montage se fait dans une goutte d'orcéine acétique (solution II), puis on recouvre la préparation avec une lamelle.

L'écrasement est fait par pression des méristèmes racinaires avec le pouce (squash) perpendiculairement à la lamelle et en faisant attention de ne pas déplacer la lamelle latéralement. Les préparations sont lutées avec de la dissolution pour vélo et conservées au réfrigérateur jusqu'au moment de l'observation.

2-5-5- Observation et photographie

Les observations sont faites à l'aide d'un microscope de recherche Axioscope 40, avec objectifs 10 X, 40 X et 100 X HI. Le comptage des chromosomes est fait sur les plaques métaphasiques les mieux étalées puis photographiées à l'aide d'une caméra Kappa X 10 reliée au microscope.

2-5-6- Montage et conservation des préparations

Monter un objet en préparation microscopique, consiste à enfermer cet objet, entre lame et lamelle, dans un liquide réfringent spécial appelé Euparal qui sert à la fois de milieu d'observation et de conservation. Ce milieu doit posséder des qualités optiques et chimiques qui assurent à la fois la visibilité parfaite de tous les détails et la conservation indéfinie de l'objet (Conger and Fairchild, 1953).

Pour éliminer l'eau et l'acide acétique qui se trouvent dans la préparation, nous enlevons la dissolution pour vélo du pourtour de la lamelle. La préparation est placée en position horizontale, la lamelle vers le bas, dans une toupine dont l'atmosphère est saturée d'acide acétique à 45 % et on attend le décollement de la lamelle.

Après le décollement de la lamelle, les deux faces de la lame sont déshydratées à l'alcool 80° puis à l'alcool 100° et enfin à l'alcool butylique. Entre chaque opération on égoutte bien sur du papier filtre et on met une goutte d'Euparal sur la lame.

La lamelle est déshydratée de la même façon, puis placée sur la lame. La préparation est essorée doucement entre deux feuilles de papier Joseph. La coloration demeure vive et le milieu reste limpide dans la mesure où l'acide et l'eau sont complètement éliminés.

2-6- Techniques numériques d'analyse des données

2-6-1- Analyse en Composantes Principales (A.C.P.)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode statistique d'analyse des données (initialement de statistique descriptive) qui consiste à rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre les variables aléatoires. Donc le but est de comprendre et de visualiser comment les effets de phénomènes a priori isolés se combinent. Lorsqu'on veut compresser un ensemble de N variables aléatoires, les N premiers axes de l'ACP est un meilleur choix, du point de vue de l'inertie expliquée. Si on décide de ne retenir que les deux premiers axes de l'ACP, on pourra alors projeter notre nuage sur un plan, et le visualiser. Même si l'ACP est majoritairement utilisée pour visualiser des données, il ne faut pas oublier que c'est aussi un moyen de décorrélérer les données, les axes qui ne sont utilisés c'est de l'information perdues c'est une classification des données en amas (clusters) corrélés.

2-6-2- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)

L'UPGMA est le nom d'un algorithme destiné à la construction d'un arbre phylogénétique. Cette méthode permet la transformation d'une matrice de distances (entre différents organismes, populations, ou séquences de nucléotides) en un arbre enraciné. C'est la méthode la plus simple de construction d'arbre. A l'origine elle a été développée pour construire les phénogrammes taxonomiques (arbres qui reflètent les similitudes phénotypiques entre unités taxonomiques), mais elle est employée aussi pour construire les arbres phylogénétiques si les taux d'évolution sont approximativement constants parmi les différentes lignées. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel **STISTICA 10**.

CHAPITRE III

RESULTATS ET

DISCUSSION

1- Résultats chimiques

1-1- Le rendement

L'extraction des huiles essentielles, d'*H. italicum* var. *numidicum*, *H. lactuem* var. *typicum* et *H. stoechas* avec deux sous-espèces, *scandens* et *rupestris*, a été réalisée jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante d'huile. L'extraction par hydro distillation des parties aériennes des échantillons, d'une durée de 3 heures, a donné un liquide visqueux avec une couleur jaune pâle.

Les rendements en huiles essentielles des espèces étudiées, du genre *Helichrysum*, sont très faibles avec une moyenne de 0,025%. Les rendements d'*H. italicum* var. *numidicum*, *H. lactuem* var. *typicum* et *H. stoechas* ssp. *scandens* sont les plus élevés avec une moyenne de 0,03%, tandis que le rendement d'*H. stoechas* ssp. *rupstre* est le plus faible avec une valeur de 0,02%. Nos résultats obtenus sont similaires au rendement de l'espèce *H. italicum* ssp. *Italicum* (0,02%) de la région d'Italie (Mancini *et al.*, 2011; Nebojsa *et al.*, 2015), et à ceux de l'espèce *H. Stoechas* (0,04%) de France (Vernin and Poite, 1998).

Ces rendements peuvent être considérés comme faibles comparés à d'autres espèces du genre, en particulier chez *H. italicum* (0,12%) (Mastelic *et al.*, 2005), *H. italicum* (0,2%) (Mastelić *et al.*, 2005, 2008; Morone-Fortunato *et al.*, 2010; Ivanovic *et al.*, 2011), *H. stoechas* (0,3%) (Ascensao *et al.*, 2001). Le rendement d'*H. italicum* ssp. *italicum* est de 0,42% (Cristofari *et al.*, 2012; Bouzid *et al.*, 2017). Tandis que Bianchini *et al.*, (2001) sur la même sous-espèce ont trouvés un rendement de 0,46%. Le rendement d'*H. italicum* ssp. *microphyllum* est de 0,41% (Bianchini *et al.*, 2003), alors que la même sous-espèce possède un rendement de 0,5% (Perrini *et al.*, 2009). *H. stoechas* avec 0,8% représente le rendement le plus élevé dans le genre (Ascensao *et al.*, 2001 ; Sobhy and El-feky, 2007).

Ces variations de rendement en huile essentielle peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, dont l'origine géographiques, l'espèce, l'altitude et la période de récolte ainsi au temps de séchage et aux techniques d'extraction des huiles essentielles (Curado *et al.*, 2006).

1-2- Analyse des huiles essentielles

L'analyse chimique des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) (Figure 23-26).

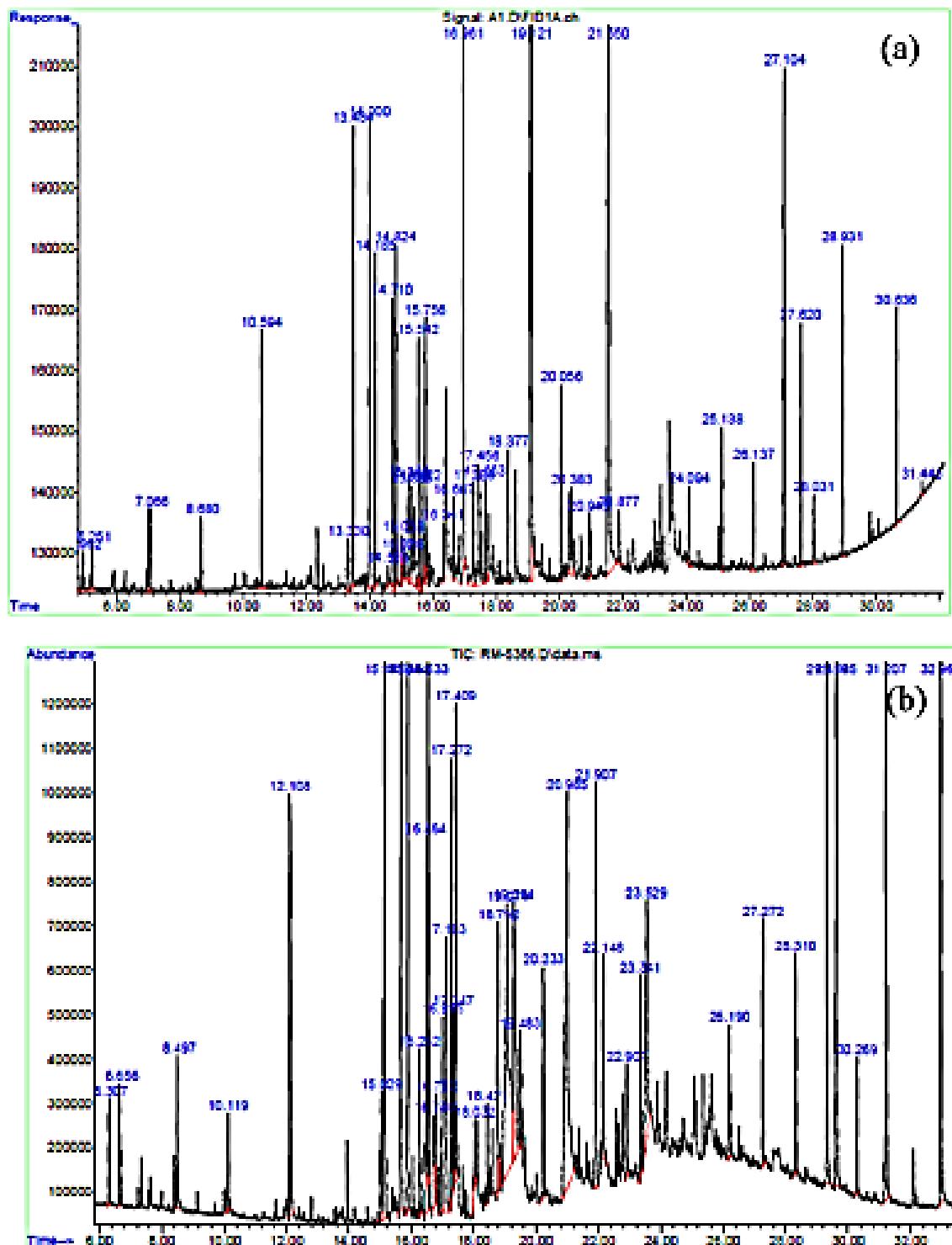
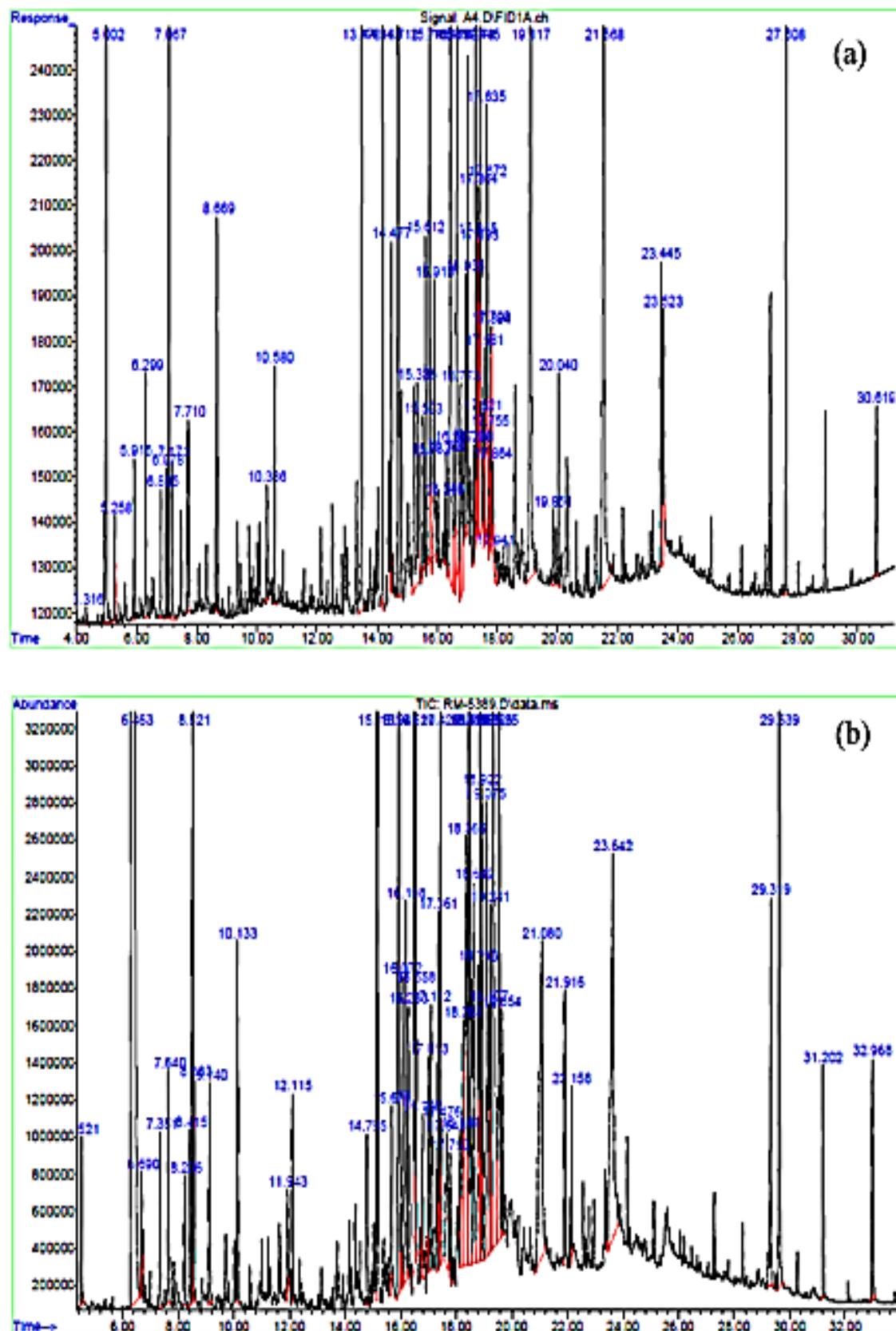


Figure 23: GC/MS profile d'*H. stoechas* ssp. *rupestre* (**a** : GC/Fid – **b** : GC/Mas)

Figure 24: GC/MS profile d'*H. stoechas* ssp. *scandens* (**a** : GC/Fid – **b** : GC/Mas)

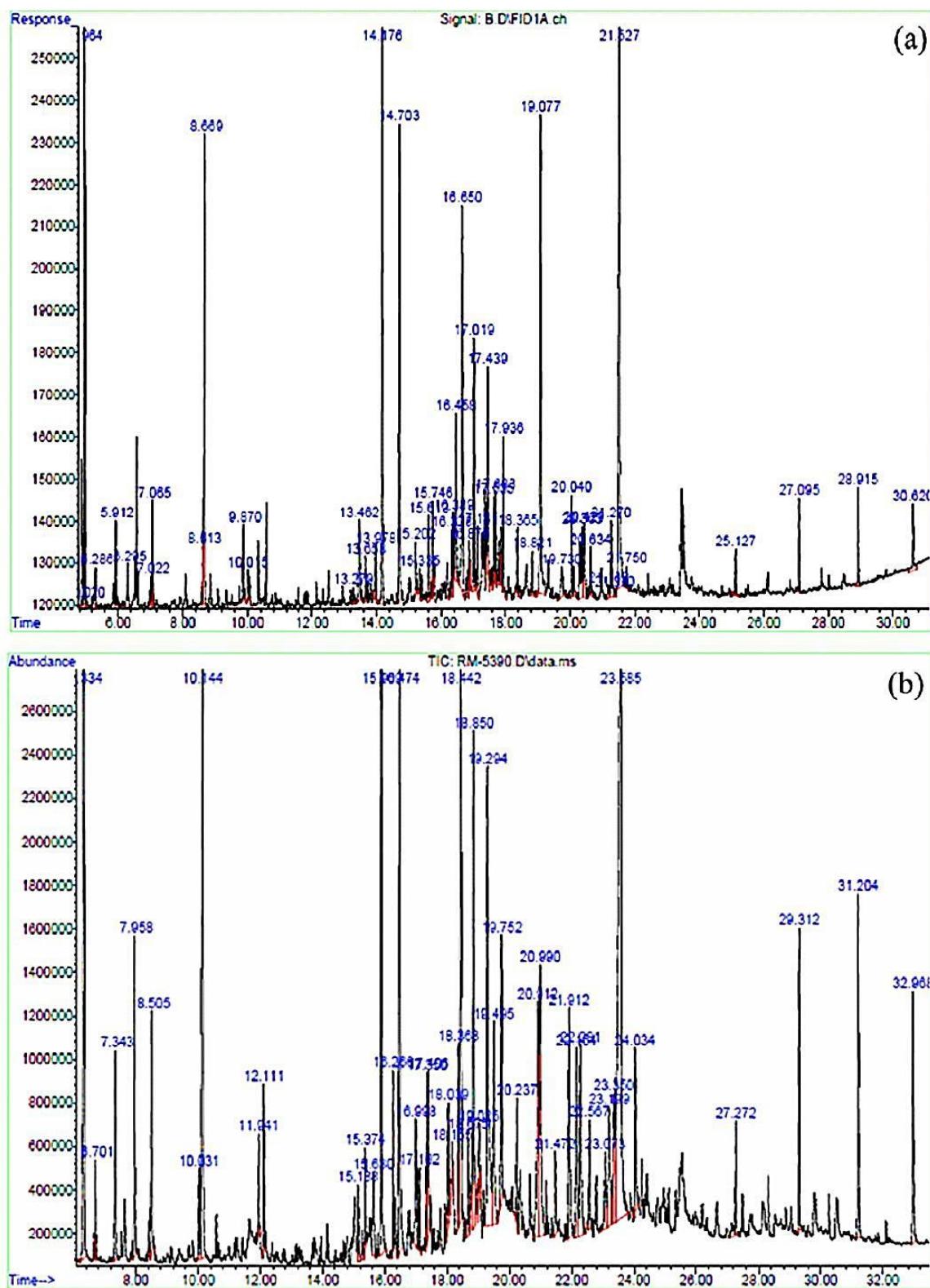


Figure 25: GC/MS profile d'*H. lacteum* var. *typicum* **(a : GC/Fid - b : GC/Mas)**

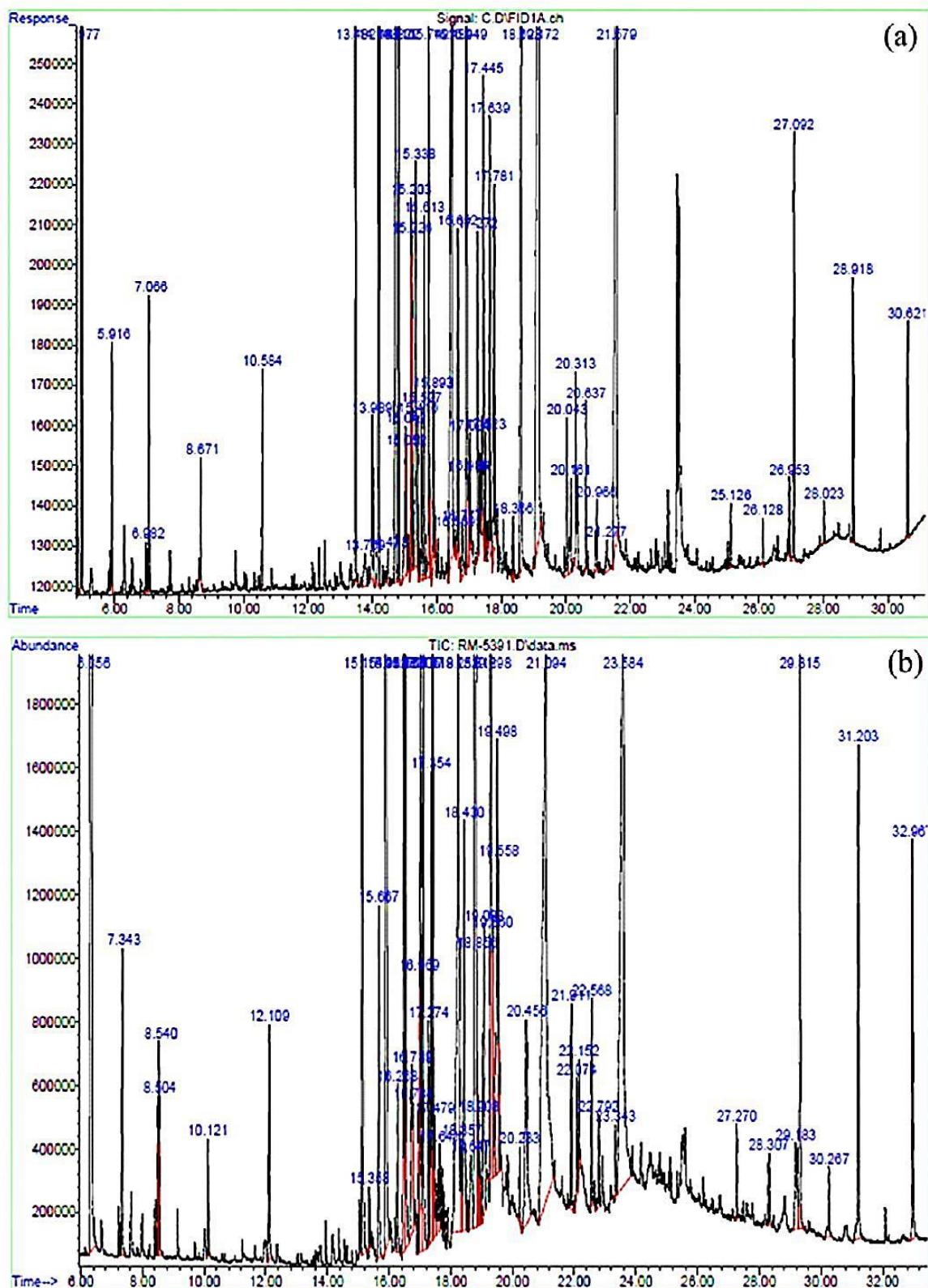


Figure 26 : GC/MS profile d'*H. italicum* var. *numidicum* (**a** : GC/Fid – **b** : GC/Mas)

L'identification des composants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque spectrale de masse (Masada, 1976; NIST, 2002) et ceux décrit par Adams ainsi que sur la comparaison de leurs indices de rétention soit avec ceux de composés authentiques ou avec des valeurs de la littérature (Adams, 2001). Les composées identifiées dans ces huiles ainsi que leurs abondances relatives sont représentés par ordre de leurs apparitions (Tableau 4).

Tableau 4: Composition chimique d'huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum*

Espèces du genre <i>Helichrysum</i>		<i>H. stoechas</i>		<i>H. lacteum</i>	<i>H. italicum</i>
		ssp. <i>rupetsre</i>	ssp. <i>scandens</i>		
Total (%) Nombre des composées Rendement (%)	KI	83,03	95,39	96,00	93,02
		37	45	43	43
		0,02	0,03	0,03	0,03
1	3-methyl-pentanol	860	—	0,04	—
2	α-pinène	941	7,79	38,58	7,99
3	α-fenchène	957	15,01	0,18	—
4	camphène	957	—	—	0,45
5	β-pinène	985	—	0,32	0,85
6	2-pentyl furan	997	—	0,52	—
7	n-octanal	1005	—	—	2,14
8	δ-3-carène	1024	—	0,26	—
9	β-phellandrène	1025	—	—	0,8
10	ortho-cymène	1033	1,16	0,29	—
11	limonène	1038	6,01	1,38	1,06
12	1,8-Cineole	1040	—	0,33	—
13	γ-terpinène	1066	0,57	0,43	—
14	terpinolène	1092	0,34	—	—
15	linalool	1108	—	—	0,68
16	n-nonanal	1113	0,42	0,71	5,30
17	α-terpineol	1207	0,40	0,21	0,73
18	n-decanal	1216	0,61	0,46	1,01
19	cyclosativene	1383	0,716	—	—
20	β-elemène	1389	—	—	0,28
21	α-copaène	1391	6,59	6,83	1,25
22	α-isocomène	1392	—	—	0,39
23	caryophyllène (Z)	1409	—	—	0,75
24	α-gurjunène	1422	1,11	0,68	—
25	caryophyllène (E)	1435	0,62	6,30	10,58
26	β-Gurjunène	1447	—	1,48	—

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

27	neryl acétone	1459	0,28	0,38	0,30	0,16
28	aromadendrène	1460	—	0,59	—	—
29	9-epi-(E)-caryophyllène	1464	—	—	—	3,57
30	α-humulène	1472	1,57	1,33	5,88	4,28
31	allo-aromadendrène	1477	3,31	0,19	—	—
32	γ-muurolène	1490	0,65	—	—	0,62
33	(E)-β-ionone	1492	1,03	1,05	—	0,26
34	α-selinène	1498	—	—	—	1,3
35	valencène	1502	—	—	0,28	—
36	β-selinène	1506	0,73	—	0,81	0,65
37	viridiflorène	1507	—	0,11	—	—
38	tridecanal	1509	—	—	—	0,43
39	cis-β-guaiène	1513	—	0,26	—	—
40	α-muurolène	1513	1,24	—	—	—
41	γ-cadinène	1530	3,19	4,18	0,83	0,58
42	δ-cadinène	1534	0,27	0,51	0,71	1,01
43	cis-calamenène	1538	—	2,94	—	2,18
44	trans-cadina-1,4-diène	1549	—	0,72	—	0,84
45	β-calacorène	1559	—	0,63	—	—
46	palustrol	1567	—	—	—	5,55
47	(E)-nerolidol	1575	—	—	0,64	—
48	dodecanoic acid	1582	—	2,36	1,22	—
49	caryolan-8-ol	1583	—	—	2,82	—
50	α-thujopsan-2- ol	1586	—	—	—	0,08
51	gleenol	1586	—	—	—	0,36
52	caryophyllene oxide	1601	0,81	0,79	6,01	1,14
53	viridiflorol	1605	—	—	0,56	—
54	globulol	1608	—	0,59	—	—
55	guaiol	1617	—	1,83	—	—
56	1,10-di-épi-cubenol	1618	—	—	—	0,27
57	ledol	1625	9,55	0,21	—	9,11
58	humulène epoxide II	1632	—	0,39	2,99	0,18
59	jungenol	1633	0,49	—	—	—
60	α-muurolol	1644	—	—	—	0,35
61	muurola-4,10 (14)-dien-1β-ol	1647	—	0,73	0,78	—
62	1-épi-cubenol	1647	1,97	—	—	0,99
63	γ-eudesmol	1654	—	0,26	—	—
64	selin-11-en-4α-ol	1658	—	—	—	1,59
65	α-cadinol	1661	—	—	0,98	1,45
66	α-épi-cadinol	1662	3,65	0,5	2,67	1,83
67	citronellyl tiglate	1666	—	—	—	0,2
68	α-épi-muurolol	1676	0,74	0,2	—	—
69	γ-dodecalactone	1679	—	—	2,49	—

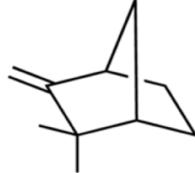
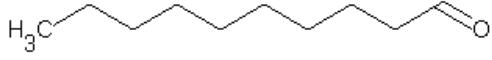
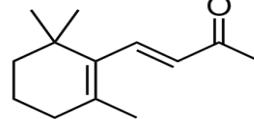
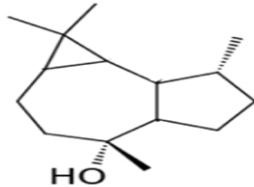
70	bulnesol	1687	—	0,19	—	—
71	n-tetradecanal	1730	0,42	—	—	—
72	(Z)- α -santalol	1779	1,58	—	—	—
73	amorpha-4,7 (11)-diene	1780	—	—	0,81	—
74	isotorquatone demethyl	1822	—	—	0,61	—
75	isopropyl tetradecanoate	1828	—	—	—	12,1
76	2-pentadecanone	1856	0,52	4,47	0,99	—
77	farnesyl acetate-(2E, 6E)	1857	—	—	1,30	—
78	farnesyl acetone-(5Z,9E)	1870	—	—	8,25	—
79	β -bisabolenol	1908	0,57	—	1,60	—
80	n-nonadecane	1908	—	—	0,90	—
81	cyclo-hexadecanolide	1928	—	—	1,04	—
82	farnesyl acetone-(5E,9E)	1949	—	—	0,62	—
83	hexadecanoic acid	1995	—	6,83	12,62	9,96
84	13-epi-manool oxide	2021	3,98	—	—	—
85	geranyl linalool (E, E)	2028	—	—	0,80	—
86	torulosol	2068	4,26	—	—	—
87	tetracosane	2418	0,18	0,79	—	0,15
88	pentacosane	2520	—	—	1,09	1,39
89	tricosane	2520	—	0,85	0,49	0,19
90	héptacosane	2700	—	—	—	0,82
91	hèxacosane	2722	0,28	—	1,06	0,13
92	nonacosane	2900	—	—	—	0,69
93	octacosane	2925	0,39	—	0,67	—
94	triacontane	2925	—	2,51	—	—
Familles chimiques						
Monoterpène hydrocarbonés			30,81	41,44	10,35	13,69
Monoterpènes oxygénés			1,72	1,97	1,71	0,42
Sesquiterpènes hydrocarbonés			20,03	26,75	24,30	29,00
Sesquiterpènes oxygénés			19,39	5,69	17,53	22,90
Diterpenes oxygénés			8,25	0,00	0,80	0,00
Alcanes			0,87	4,15	4,21	3,37
Acides			0,00	9,19	13,84	9,96
Esters			0,00	0,00	3,53	12,30
Acétones			0,52	4,47	11,28	0,00
Aldéhydes			1,45	1,17	8,45	1,38
Autres			0,00	0,56	0,00	0,00

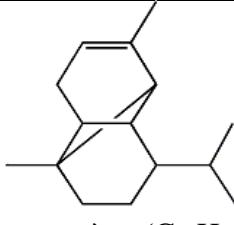
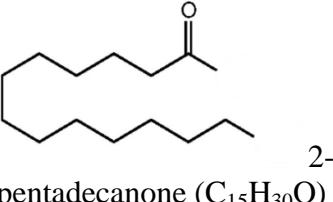
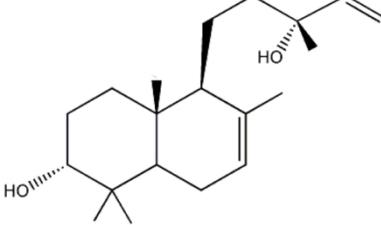
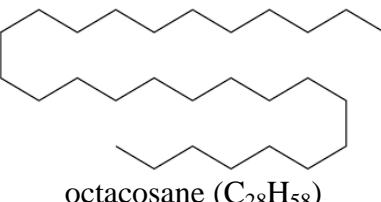
1-2-1- Composition chimique de l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *rupesre*

L'analyse chromatographique par (CG/SM) nous a permis d'identifier trente-sept composés terpéniques dans l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *rupesre*, représentant 83,03% du total de l'huile. Les principaux composants de cette huile sont l' α -fenchène (15,02%), le ledol (9,55%), l' α -pinène (7,76%), l' α -copaène (6,59%), le limonène (6,01%), le torulosol (4,27%), le 13-epi-manool oxide (3,98%), l' α -epi-cadinol (3,66%), l'allo-aromadendrène (3,32%), le γ -cadinène (3,19%), le 1-epi-cubènol (1,97%), le (Z)- α -santalol (1,58%) et l' α -humulène (1,57%).

L'huile essentielle de la sous-espèce *rupesre* est riche en monoterpènes hydrocarbonés qui représentent 30,81% du totale de l'huile (Tableau 5). Sur les six monoterpènes hydrocarbonés, l' α -fenchène, l' α -pinène et le limonène sont les principaux composés dominants de cette classe, alors que le reste des composés, l'ortho-cymène, le γ -terpinène et le terpinolène, sont représentés avec des taux faibles.

Tableau 5: Classes chimiques et Composés majoritaires d'*H. stoechas* ssp. *rupesre*

Familles chimiques	Pourcentage (%)	Composé majoritaire
Monoterpènes hydrocarbonés (6 composés)	30,81	 α -fenchène ($C_{10}H_{16}$)
Aldehyde (2 composés)	1,03	 n-décanal ($C_{10}H_{20}O$)
Monoterpènes oxygénés (3 composés)	1,71	 (E)- β -ionone ($C_{13}H_{20}O$)
Sesquiterpènes oxygénés (8 composés)	19,38	 ledol ($C_{15}H_{26}O$)

Sesquiterpènes hydrocarbonés (11 composés)	20,02	 α -copaène ($C_{15}H_{24}$)
Acétone (1 composé)	0,52	 2-pentadecanone ($C_{15}H_{30}O$)
Diterpenes oxygénés (2 composés)	8,24	 torulosol ($C_{20}H_{34}O_2$)
Alcane (3 composés)	0,87	 octacosane ($C_{28}H_{58}$)

Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent la deuxième classe la plus importante, avec un pourcentage élevé (20,03%) (Figure 27), l' α -copaène, l'allo-aromadendrène, le γ -cadinène et l' α -humulène sont les produits les plus abondants, alors que le cyclosativène, l' α -gurjunène, le caryophyllène (E), le γ -muurolène, le β -selinène, l' α -muurolène et le δ -cadinène sont faiblement représentés.

Les sesquiterpènes oxygénés avec huit composants, sont très abondants avec un taux de 19,39%. Le ledol, l' α -epi-cadinol, le 1-epi-cubènol et le (Z)- α -santalol sont représentés avec des taux élevés. Les autres composés ont un taux très faible variant entre 0,81% et 0,49%. Contrairement aux sesquiterpènes oxygénés, les diterpènes oxygénés représentent 8,25% de l'huile essentielle avec seulement deux composées dominantes, le torulosol et le 13-epi-manool oxide.

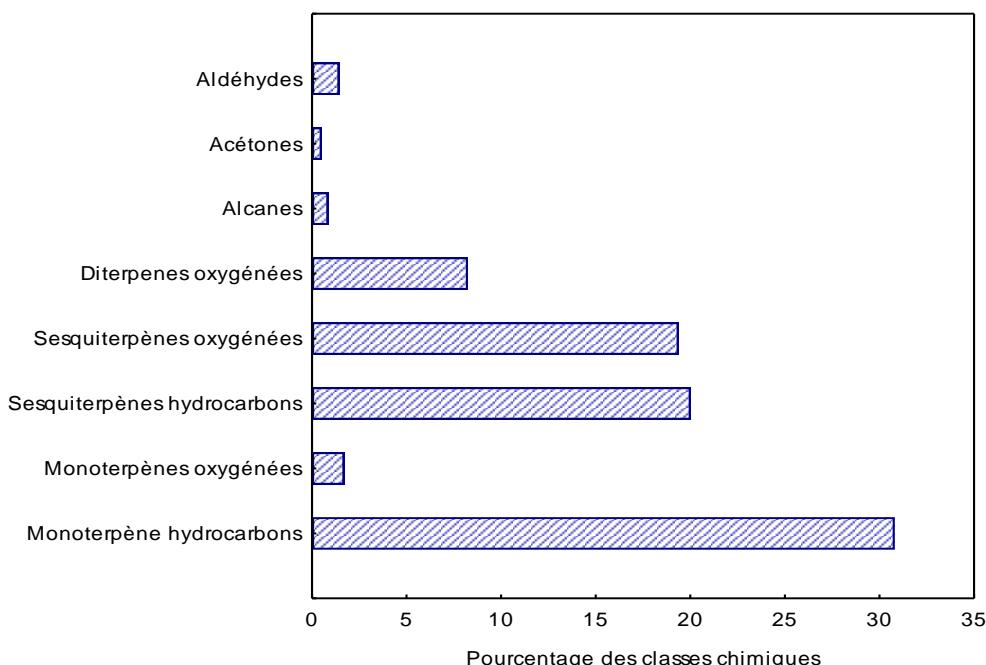


Figure 27: Classes chimiques de l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *rupetsre*

Les monoterpènes oxygénés représentent 1,72% du total de l'huile, avec l'abondance du (E)- β -ionone (1,03%). Les deux composées aldéhydes, le n-décanal et le n-nonanal représentent un taux faible de 1,04%. Les alcanes et les acétones représentent un taux très faible de 0,87% et 0,52% respectivement.

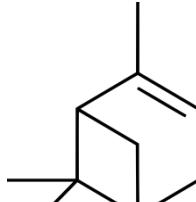
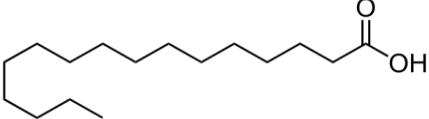
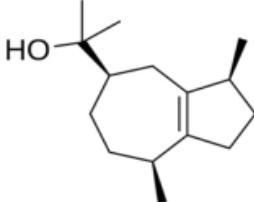
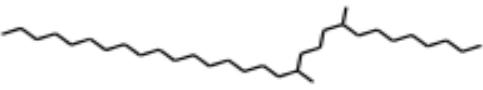
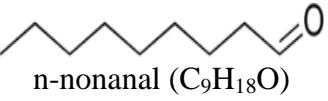
1-2-2- Composition chimique de l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *scandens*

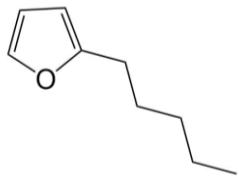
Dans l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *scandens*, quarante-cinq composants ont été caractérisés, représentant 95,7% du totale de huile. L' α -pinène avec un taux de 38,58%, l' α -cpaène (6,83%), l'hexadecanoic acid (6,83%), le caryophyllène (E) (6,30%), le 2-pentadecanone (4,47%), le γ -cadinène (4,18%), le δ -cadinène (2,94%), le triacontane (2,51%), le dodecanoic acid (2,36%), le guaiol (1,83%) et le β -gurjunène (1,48%) sont identifiés comme les principaux constituants dans cette huile.

La classe des monoterpènes hydrocarbonés est prédominante dans l'huile essentielle de la sous-espèce *scandens* avec un taux de 41,44% du totale (Tableau 6). L' α -pinène est le seul composé qui est représenté avec un taux très élevé dans cette classe, les composés, le limonène, le γ -terpinène, le β -pinène, l'ortho-cymène, le δ -3-

carène et l' α -fenchène, sont faiblement représentés avec des taux faibles (1,38% à 0,18%).

Tableau 6 : Classes chimiques et composés majoritaires d'*H. stoechas* ssp. *scandens*

Familles chimiques	Pourcentage (%)	Composé majoritaire
Monoterpènes hydrocarbonés (7 composés)	41,44	 α -pinène ($C_{10}H_{16}$)
Sesquiterpènes hydrocarbonés (14 composés)	26,75	α -copaène ($C_{15}H_{24}$)
Acides (2 composés)	9,19	 hexadecanoic acid ($C_{16}H_{32}O_2$)
Sesquiterpènes oxygénés (10 composés)	5,69	 guaiol ($C_{15}H_{26}O$)
Acétone (1 composé)	4,47	2-pentadecanone ($C_{15}H_{30}O$)
Alcane (3 composés)	4,15	 triacontane ($C_{30}H_{62}$)
Monoterpènes oxygénés (4 composés)	1,97	(E)- β -ionone ($C_{13}H_{20}O$)
Aldehyde (2 composés)	1,17	 n-nonanal ($C_9H_{18}O$)

Autres (2 composés)	0,56	 2-pentyl furan (C ₉ H ₁₄ O)
------------------------	------	--

Les sesquiterpènes hydrocarbonés, avec quatorze composants, montrent un pourcentage de 26,75% (Figure 28). Les composées les plus représentatifs dans cette classe sont, le caryophyllène (E), l'α-copaène, le γ-cadinène, le cis-calamenène et le β-gurjunène. Les autres sesquiterpènes hydrocarbonés sont représentés avec des taux faibles variant entre 1,33% et 0,11%, l'α-humulène, l'α-gurjunène, l'aromadendrène, l'allo-aromadendrène, le viridiflorène, le cis-β-guaiène, le δ-cadinène, le trans-cadina-1,4-diène et le β-calacorène.

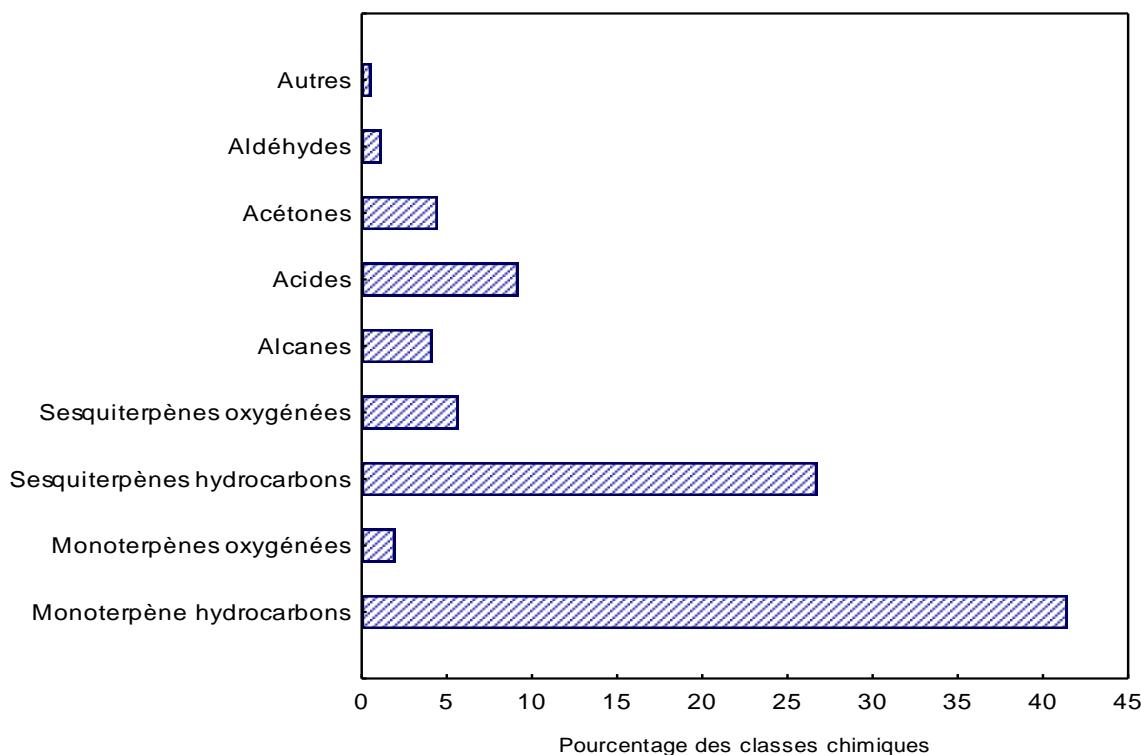


Figure 28: Classes chimiques dans l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *scandens*

Les acides sont représentés dans cette huile par deux principaux composants, l'hexadecanoic acid et le dodecanoic acid avec un pourcentage de 9,19%. Les 5,69 % que représentent les sesquiterpènes oxygénées sont formés par dix composées avec l'abondance du guaiol. Le reste des composées sont représentés avec des taux faibles

(0,79% et 0,19%), le caryophyllène oxide, le muurola-4,10-(14)-dien-1 β -ol, le globulol, l' α -epi-cadinol, l'humulène epoxide II, le γ -eudesmol, le ledol, l' α -epi-muurolol et le bulnesol.

Les alcanes représentent 4,15% avec trois composées, triacontane, le tricosane et le tetracosane avec l'abondance du triacontane, les deux autres alcanes sont faiblement représentés, Contrairement aux alcanes les acétones sont représentés avec un seul composée le 2-pentadecanone avec 4,74% du totale de l'huile.

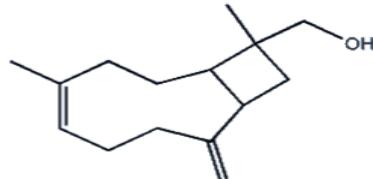
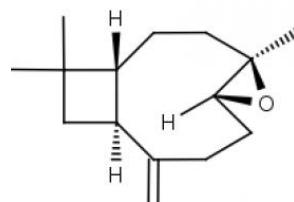
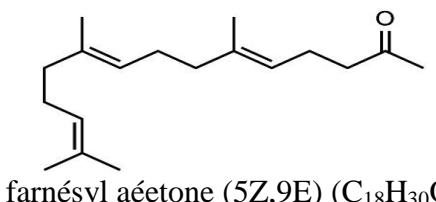
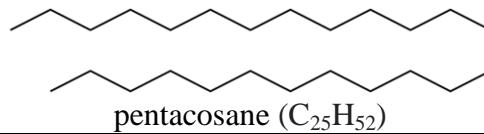
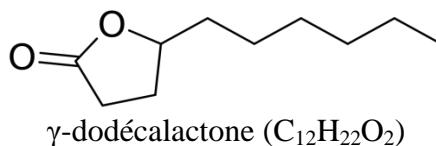
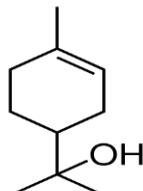
Les monoterpènes oxygénées sont représentées par quatre composants avec un pourcentage de 1,97%, le 1,8-cinéole, le (E)- β -ionone, le neryl acétone et l' α -terpinéol. Les aldéhydes sont peu représentés avec deux composées, le n-décanal et le n-nonanal avec un taux de 1,17%. Les autres classes sont faiblement présentes avec un pourcentage de 0,56% du totale de l'huile essentielle de cette espèces.

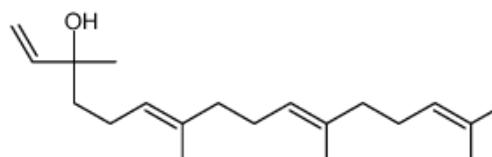
1-2-3- Composition chimique de l'huile essentielle d'*H. lacteum* var. *typicum*

Quarante-trois composées terpéniques sont identifiées dans l'huile essentielle d'*H. lacteum*, représentant 96% du total du l'huile. Les composées majoritaires de cette huile sont, l'hexadecanoic acid (12,62%), le caryophyllène (E) (10,58%), le farnésyl acétone (5Z, 9E) (8,25%), l' α -pinène (7,99%), le caryophyllène oxide (6,01%), l' α -humulène (5,88%), le n-nonanal (5,30%), l'humulène epoxide II (2,99%), le caryolan-8-ol (2,82%), l' α -epi-cadinol (2,67%), le γ -dodècalactone (2,49%), le n-octanal (2,14%), le β -bisabolénol (1,60%).

Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent le pourcentage le plus élevé dans cette espèce avec 24,30% (Tableau 7). Les composées les plus abondants dans cette classe sont, le caryophyllène (E), l' α -humulène et le caryolan-8-ol. Les autres produits, l' α -copaène, le γ -cadinène, le β -selinène, le caryophyllène (Z), le δ -cadinène, l' α -isocomène et le valencène, sont représentés avec des faibles pourcentages variant entre 1,25% et 0,28%.

Tableau 7 : Classes chimiques et Composés majoritaires d'*H. lacteum* var. *typicum*

Familles chimiques	Pourcentage (%)	Composé majoritaire
Sesquiterpènes hydrocarbonés (10 composés)	24,30	 <p>caryophyllène ($C_{15}H_{24}$)</p>
Sesquiterpènes oxygénés (8composés)	16,23	 <p>caryophyllène oxide ($C_{15}H_{24}O$)</p>
Acides	13,84	hexadecanoic acid ($C_{16}H_{32}O_2$)
Acétone (5 composés)	11,28	 <p>farnésyl acétone (5Z,9E) ($C_{18}H_{30}O$)</p>
Monoterpènes hydrocarbonés (4 composés)	10,35	α -pinène ($C_{10}H_{16}$)
Aldéhyde (3 composés)	8,45	n-nonanal ($C_9H_{18}O$)
Alcane (5 composés)	4,21	 <p>pentacosane ($C_{25}H_{52}$)</p>
Esters (2 composés)	3,53	 <p>γ-dodecalactone ($C_{12}H_{22}O_2$)</p>
Monoterpènes oxygénés (3 composés)	1,71	 <p>α-terpineol ($C_{10}H_{18}O$)</p>

Diterpènes oxygénés (1 composé)	0,80	 <p>geranyl linalool (E, E) ($C_{20}H_{34}O$)</p>
------------------------------------	------	--

Les sesquiterpènes oxygénées représentent le deuxième pourcentage le plus élevé dans l'huile essentielle d'*H. lacteum* avec 16,23%. Les produits les plus abondants sont, le caryophyllène oxide, l'humulène époxide II, l' α -epi-cadinol et le β -bisabolénol. Le (E)-nerolidol, le viridiflorol, le muurola-4,10-(14)-dien-1 β -ol et l' α -cadinol sont faiblement représentés dans cette huile.

Les acides sont représentés avec un pourcentage de 13,84% (Figure 29). L'acide héxadécanoïque est le composé majoritaire de cette classe alors que l'acide dodécanoïque est faiblement présent dans cette huile.

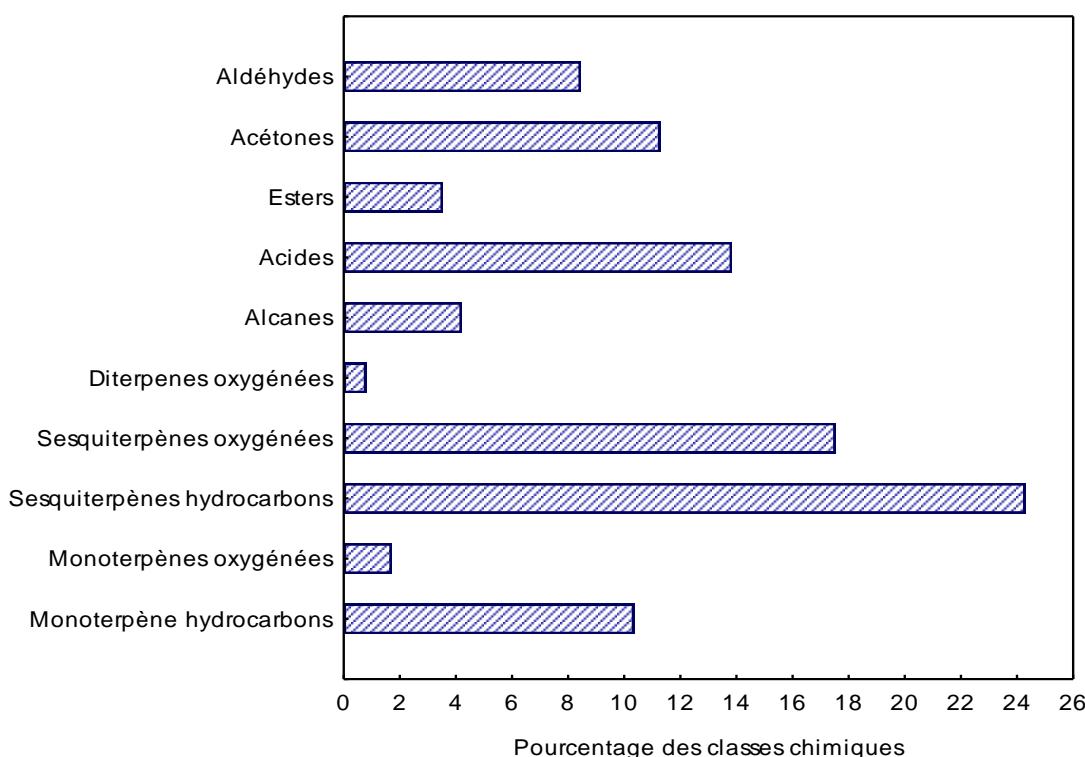


Figure 29: Classes chimiques de l'huile essentielle d'*H. lacteum* var. *typicum*

Le farnésyl acétone (5Z, 9E) est le composé majoritaire des acétones, qui est représenté avec a taux élevé (11,28%). Les autres acétones, le 2-pentadécanone

l'amorpha-4,7 (11)-diene et l'isotorquatone deméthyl se trouvent avec des taux très faible dans l'huile d'*H. lacteum*.

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent un taux de 10,35%, avec quatre composants. L' α -pinène est le produit dominant, les trois autres composées, le limonène, le β -pinène et le camphène, sont présent avec des taux très faibles.

Les aldéhydes représentent un taux de 8,45% avec, le n-nonanal, le n-octanal comme composés dominats alors que le n-décanal se trouve avec un taux faible 1,01%. Les alcanes et les esters sont représentés dans cette huile avec un pourcentage de 4,21% et 3,53% respectivement.

Les monoterpènes oxygénés avec un taux de 1,71% et les diterpènes oxygénés avec un taux de 0,80% sont les moins représentées dans l'huile essentielle d'*H. lacteum*.

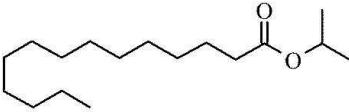
1-2-4- Composition de l'huile essentielle d'*H. italicum* var. *numidicum*

L'analyse de l'huile essentielle d'*H. italicum* fait apparaître quarante-trois composés avec un taux de 93,02% du totale de l'huile. Les principaux composés majoritaires présents dans l'huile sont, l'isopropyl tetradecanoate (12,10%), l' α -pinène (12,02%), l'hexadecanoic acid (9,96%), le caryophyllène (E) (9,22%), le léadol (9,11%), le palustrol (5,55%), l' α -humulène (4,28%), l' α -copaène (3,72%), le 9-epi-(E)-caryophyllène (3,57%), le cis-calamenène (2,18%), l' α -epi-cadinol (1,83%), l' α -sélin-11-en-4-ol (1,59%) et l' α -cadinol (1,45%).

Dans cette huile on constate l'abondance des sesquiterpènes hydrocarbonés avec un taux de 29% (Tableau 8). Les produits majoritaires sont le caryophyllène (E), l' α -humulène, le 9-epi-(E)-caryophyllène, l' α -copaène et le cis-calamenène.

Les autres produits, l' α -sélinène, le δ -cadinène, le trans-cadina-1,4-diène, l' α -gurjunène, le β -selinène, le γ -muurolène, le γ -cadinène et le β -élémène, sont faiblement représentés (1,39% - 0,28%).

Tableau 8 : Classes chimiques et Composés majoritaires d'*H. italicum* var. *numidicum*

Familles chimiques	Pourcentage (%)	Composé majoritaire
Sesquiterpènes hydrocarbonés (13 composés)	29	caryophyllène (E) ($C_{15}H_{24}$)
Sesquiterpènes oxygénés (12 composés)	22,90	ledol ($C_{15}H_{26}O$)
Monoterpènes hydrocarbonés (4 composés)	13,69	α -pinène ($C_{10}H_{16}$)
Esters (2 composés)	12,30	 isopropyl tétradécanoate ($C_{17}H_{34}O_2$)
Acides (1 composés)	9,96	hexadecanoic acid ($C_{16}H_{32}O_2$)
Alcanes (6 composés)	3,37	pentacosane ($C_{25}H_{52}$)
Aldéhydes (2 composés)	0,95	n-décanal ($C_{10}H_{20}O$)
Monoterpènes oxygénés (2 composés)	0,42	(E)- β -ionone ($C_{13}H_{20}O$)

Les sesquiterpènes oxygénées forment la deuxième classe chimique la plus importante dans l'huile essentielle d'*H. italicum* avec un taux de 22,90% (Figure 30). Les produits les plus abondants sont le ledol, le palustrol, l' α -epi-cadinol, l' α -sélin-11-en-4-ol et l' α -cadinol.

Le caryophyllène oxide, le 1-epi-cubenol, le gléenol, l' α -muurolol, le 1,10-di-épi-cubenol, le humulène époxide II et l' α -thujopsane-2-ol se trouvent avec des faibles pourcentages.

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent 13,69% du totale de l'huile essentielle, avec l' α -pinène comme le produit le plus abondant. Les autres composés, le β -phellandrène, le β -pinène et le limonène, leurs taux varient entre 0,80 % et 0,20%.

Les esters, l'isopropyl tétradécanoate et le citronélyl tiglate représentent 12,30%, avec l'abondance de l'isopropyl tétradécanoate, produit majoritaire dans l'huile d'*H. italicum*. L'hexadécanoic acid (Acide palmitique), représente le seul acide dans l'huile essentielle d'*H. italicum* avec un taux de 9,96%.

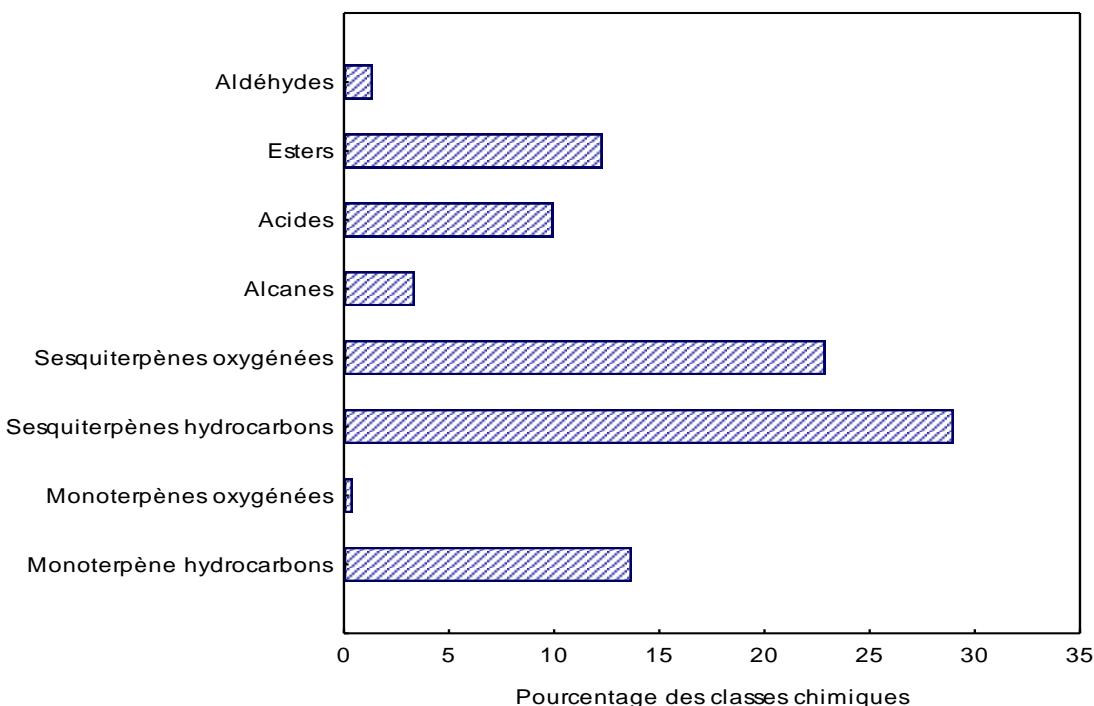


Figure 30: Classes chimiques de l'huile essentielle d'*H. italicum* var. *numidicum*

Les alcanes, avec six composants, sont abondants avec un taux de 3,37%. L'alcane le plus représenté est le pentacosane avec 1,39%. Les autres alcanes, l'héptacosane, le nonacosane, le tricosane, le tétracosane et l'héxacosane sont représentés avec des taux variant entre 0,82% et 0,13%. Les aldéhydes et les monoterpènes oxygénés sont très peu abondants dans cette huile avec un taux de 0,95% et 0,42% respectivement.

1-3- Analyse en composantes principales (ACP)

1-3-1- Etude des variables

1-3-1-1- Matrice de corrélation

L'examen de la matrice fait apparaître des corrélations significatives (41,99% des variables sont significativement corrélées). Les valeurs propres représentant la variance des composants de l'huile sur les axes sont élevées, 40,12% pour le premier axe, 33,30% pour l'axe deux et 26,58% pour l'axe trois, donnant ainsi une bonne contribution à la variance totale. L'ensemble de l'information expliquée par les trois premiers axes issus de l'ACP est de 100%.

L'analyse statistique (Box whisker) montre que les composés majoritaires des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* présentent une importante variabilité interspécifique (Figure 31). L' α -pinène (2) est le composant qui présente le plus de variation au sein des espèces, suivi par l'hexadecanoic acid (83), le caryophyllène (E) (25) et l' α -copaène (21). Les autres composants présentent peu de variabilité.

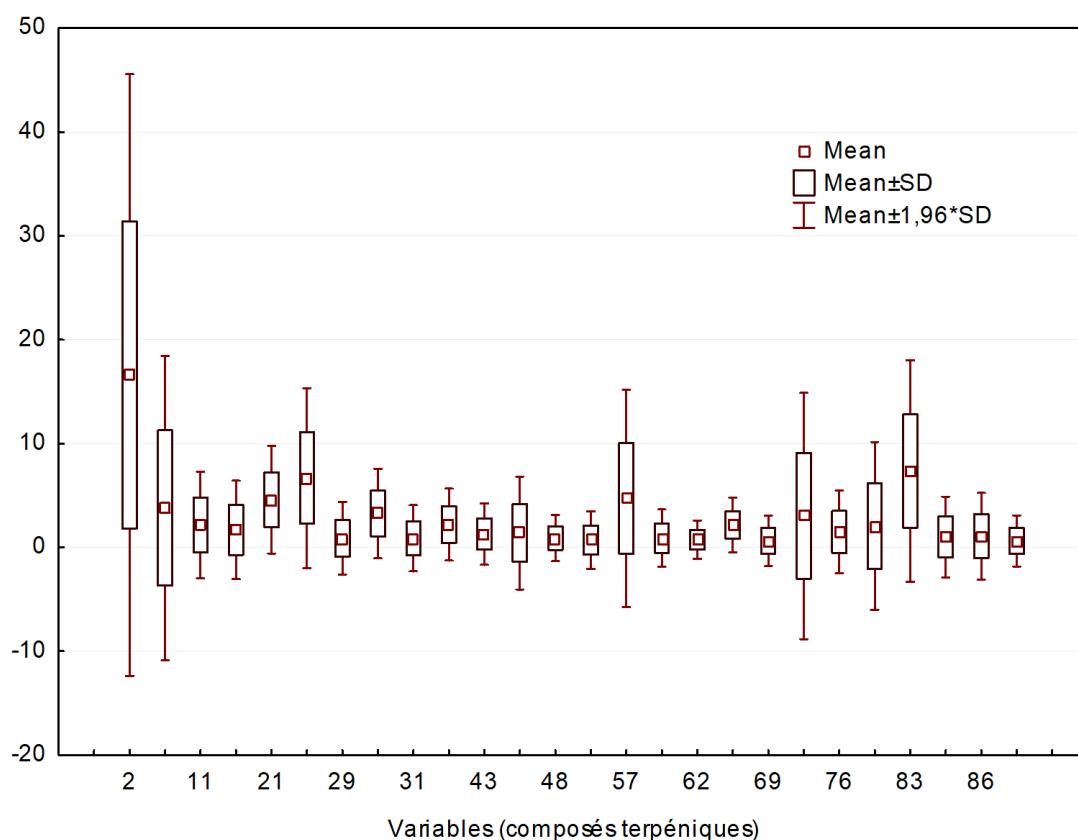


Figure 31: Variation de la concentration des composés majoritaires

1-3-1-2- Cercle des corrélations

La représentation du plan formé par les deux premiers axes principaux plan 1x2 (Figure 32) montre que l'ensemble des composants d'huiles essentielles contribuent fortement à la formation des axes.

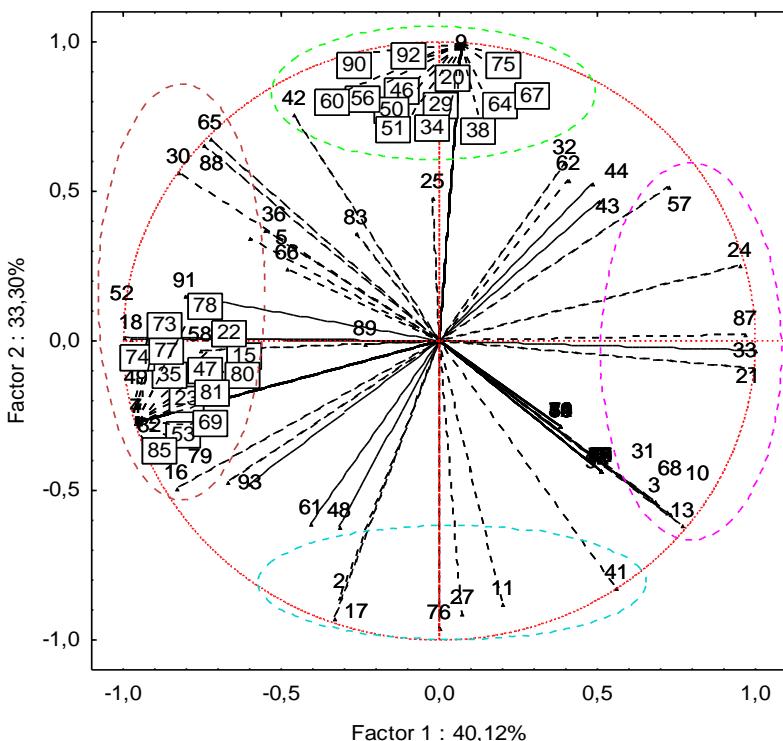


Figure 32: Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x2)

La partie positive de l'axe 1 est expliquée par le groupe des variables: (3) α -fenchène, (10) ortho-cymène, (13) γ -terpinène, (21) α -copaène, (24) α -gurjunène, (31) allo-aromadendrène, (33) (E)- β -ionone, (57) ledol, (68) α -epi-muurolol, (87) tétracosane, par contre la partie négative de l'axe 1 est expliquée par le groupe des variable: (4) camphène, (7) n-octanal, (15) linalool, (16) n-nonanal, (18) n-décanal, (22) α -isocomène, (23) caryophyllène (Z), (30) α -humulène, (35) valencène, (47) (E)-nerolidol, (49) caryolan-8-ol, (52) caryophyllène oxide, (53) viridiflorol, (58) humulène époxide II, (65) α -cadinol, (69) γ -dodécalactone, (73) amorpha-4,7(11)-diene (74) isotorquatone diméthyl, (77) farnésyl acétate (2E, 6E), (78) farnésyl acétone (5Z,9E), (79) β -bisabolénol, (80) n-nonadécane, (81) cyclo-hexadécanolide, (82) farnésyl acétone (5E,9E), (85) géranyl linalool (E, E), (88) pentacosane, (91) héxacosane.

L'axe 2 dans sa partie positive est caractérisé par le groupe des variables : (9) β -phellandrine, (20) β -élémène, (29) 9-epi-(E)-caryophyllène, (34) α -sélinène, (38) tridécanal, (42) δ -cadinène, (46) palustrol, (50) α -thujopsan-2-ol, (51) glénol, (56) 1,10-di-épi-cubenol, (60) α -muurolol, (64) sélin-11-en-4- α -ol, (67) citronélyl tiglate, (75) isopropyl tétradécanoate, (90) héptacosane, (92) nonacosane, par contre sa partie négative est expliquée par le groupe des variables: (2) α -pinène, (11) limonène, (17) α -terpinéol, (27) neryl acétone, (41) γ -cadinène, (76) 2-pentadécanone.

La partie positive de l'axe 3 est expliquée par le groupe des variables : (1) 3-méthyl-pentanol, (5) β -pinène, (6) 2-pentyl furan, (8) δ -3-carène, (12) 1,8-cinéole, (25) caryophyllène (E), (26) β -gurjunène, (28) aromadendrène, (37) viridiflorène, (39) cis- β -guaiène, (43) cis-calamenène, (44) trans-cadina-1,4-diène, (45) β -calacorène, (48) dodécanoic acid, (54) globulol, (55) guaiol, (61) muurola-4,10 (14)-dien-1 β -ol, (63) γ -eudesmol, (70) bulnésol, (83) héxadecanoic acid, (89) tricosane, (94) triacontane.

Par contre sa partie négative est expliquée par le groupe des variables: (14) terpinolène, (19) cyclosativène, (32) γ -muurolène, (36) β -sélinène, (40) α -muurolène, (59) junénol, (62) 1-épi-cubenol, (66) l' α -épi-cadinol, (71) n-tétradécanal, (72) (Z)- α -santalol, (84) 13-épi-manool oxide, (86) torulosol, (93) octacosane (Figure 33).

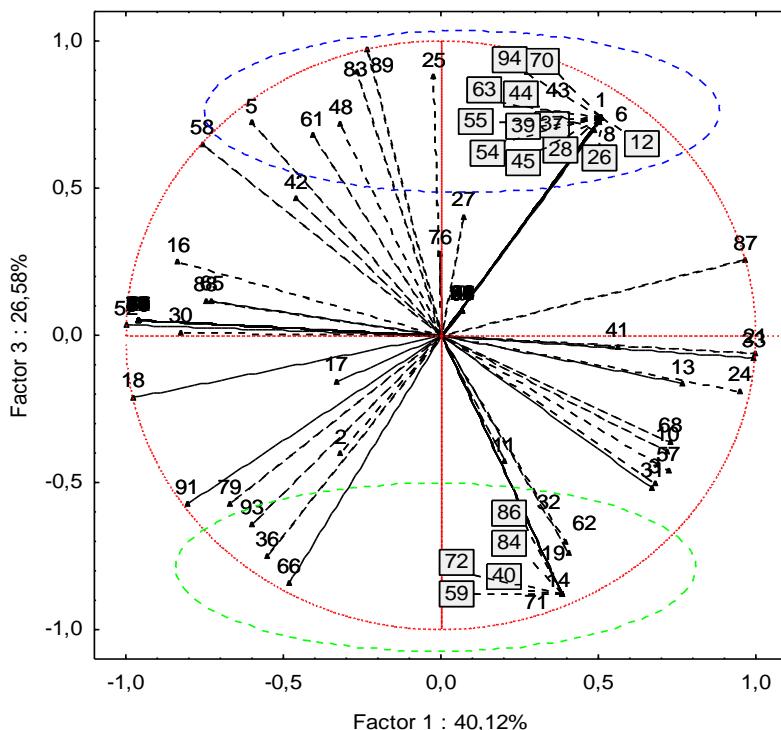


Figure 33: Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x3)

1-3-2- Etude des individus (espèces) du genre *Helichrysum*

La superposition du plan 1x2 des variables au plan 1x2 des espèces (Figure 34) montre que nos espèces se sont réparties sur les trois axes issus de l'ACP.

L'*Helichrysum lacteum* localisée sur la partie négative de l'axe 1 est caractérisée par le camphène, le n-octanal, le linalool, le n-nonanal, l'α-humulène, le caryolan-8-ol, le caryophyllène oxide, le viridiflorol, le farnésyl acétone (5Z, 9E), le β-bisabolénol, le cyclo-hexadécanolide, le pentacosane et le hénacosane (Figure 26).

Dans la partie positive de l'axe 2, on retrouve l'espèce *H. italicum*, qui se caractérise par, le palustrol et l'isopropyl tétradécanoate.

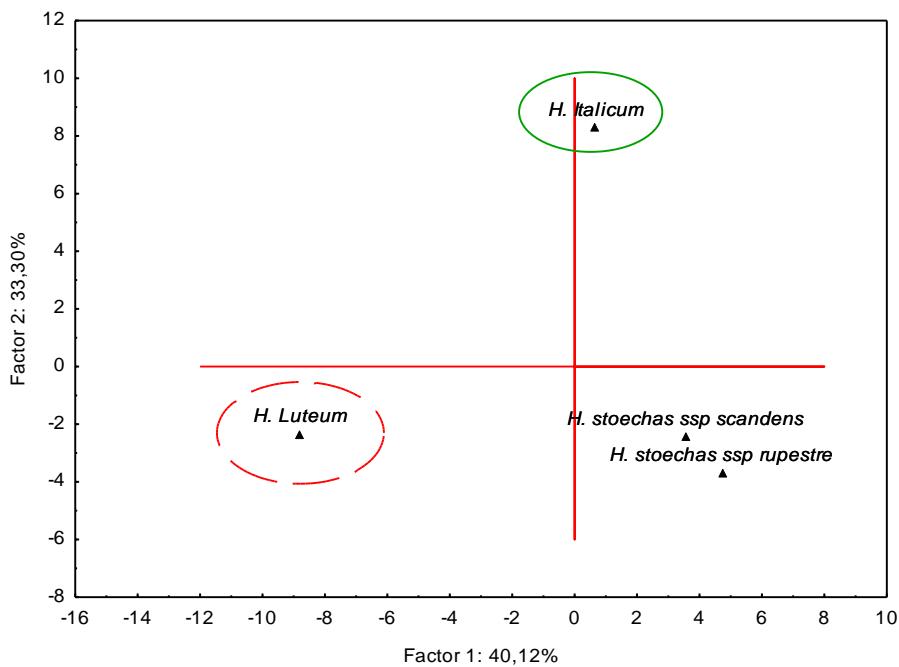


Figure 34: Projection des espèces du genre *Helichrysum* Algérien sur le plan (1x2)

La superposition du plan 1x3 des variables au plan 1x3 des espèces (Figure 35), montre que l'*H. stoechas* ssp. *scandens* est située dans la partie positive de l'axe 3, cette sous-espèce est caractérisée par le caryophyllène (E), le cis-calaménène, le dodécanoic acid, l'héxadécanoic acid, le triacontane. L'*H. stoechas* ssp. *rupestris* s'oppose à la première sous-espèce sur la partie négative de l'axe 3, elle est caractérisée par le 1-epi-cubenol, l'α-epi-cadinol, l'(Z)-α-santalol, le 13-epi-manool oxide et le torulosol.

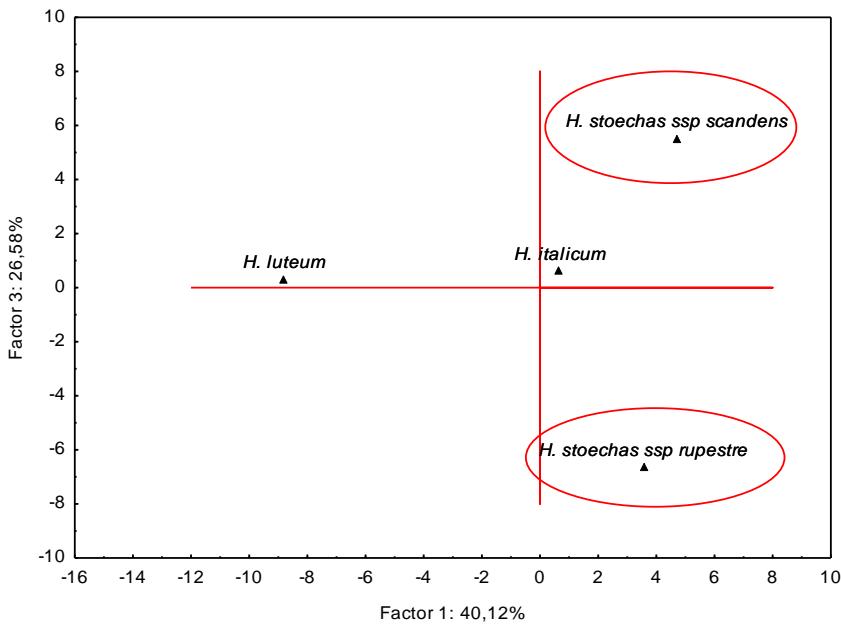


Figure 35 : Projection des espèces du genre *Helichrysum* Algérien sur le plan (1x3)

La projection spatiale tridimensionnelle des espèces étudiées basée sur les trois axes principaux (Figure 36), montre que l'*H. italicum*, *H. lacteum*, *H. stoechas* ssp. *rupestris* et *H. stoechas* ssp. *scandens* sont nettement séparées, les deux dernières sous-espèces sont plus proches l'une de l'autre.

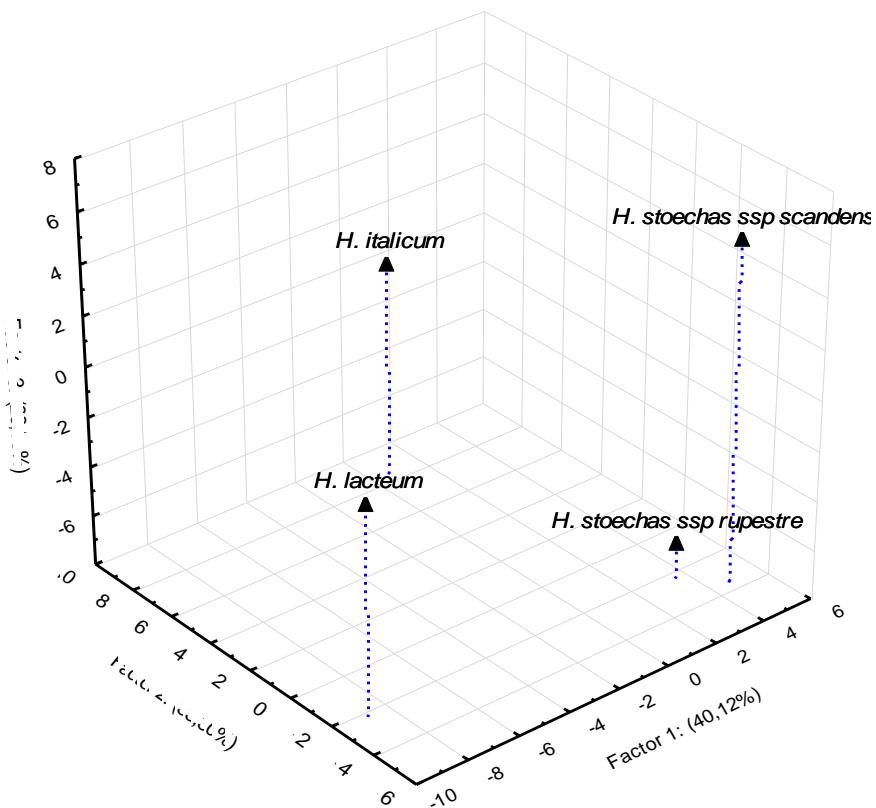


Figure 36: Projection spatiale des espèces du genre *Helichrysum* Algérien

1-4- Analyse UPGMA

L'analyse des clusters UPGMA confirme la séparation des espèces étudiées du genre *Helichrysum* (Figure 37). Cette séparation est basée sur la distance du linkage qui indique la présence de variabilité chimique entre les espèces étudiées. L'analyse a séparé nos espèces en deux clades distincts.

La première clustération sépare l'espèce *H. lacteum*, qui est représentée par la variété *typicum*, endémique algérienne. Cette espèce est morphologiquement et écologiquement bien distincte des autres espèces du genre *Helichrysum*. La séparation de cette espèce est due principalement à la présence des composés à des taux élevés, l'hexadecanoic acid, le caryophyllène (E), le farnésyl acétone (5Z, 9E), le caryophyllène oxide, l' α -humulène et le n-nonanal.

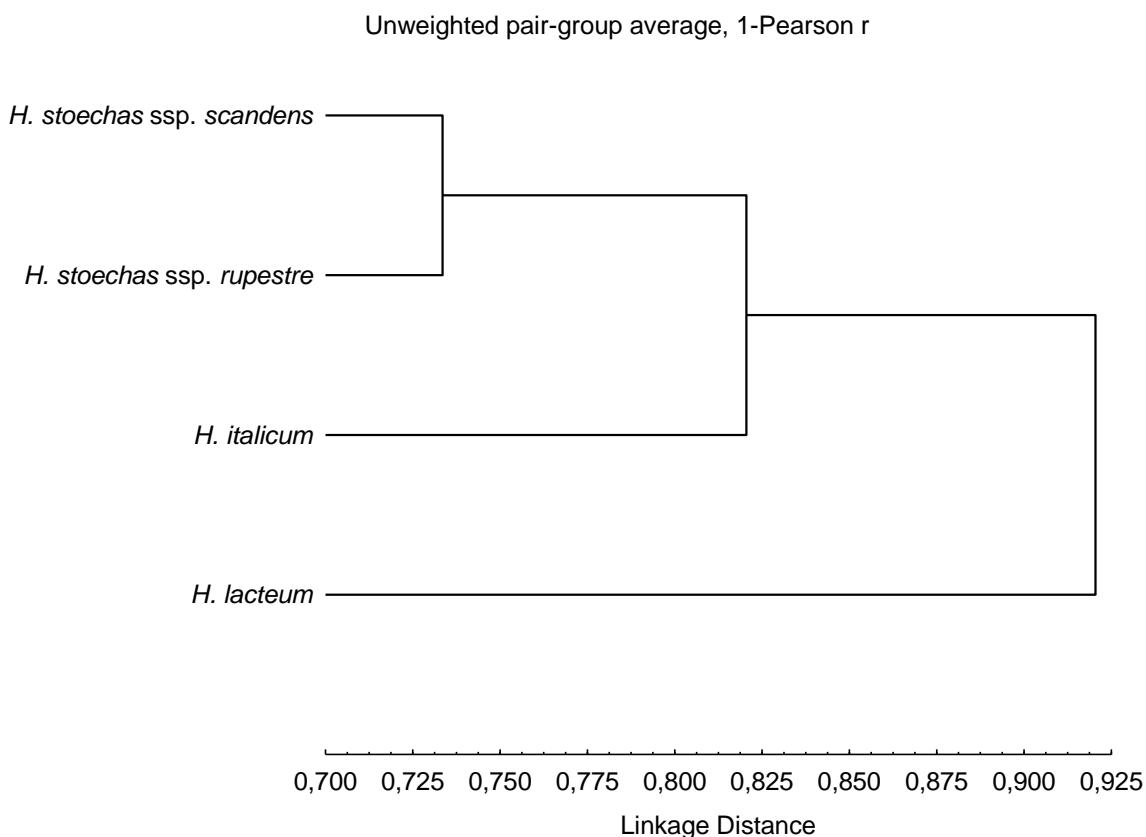


Figure 37: UPGMA cluster des espèces du genre *Helichrysum* Algérien

La deuxième clustération est subdivisée en deux sous-clades, le premier sous-clade est représenté par l'espèce *H. italicum* variété *numidicum*, endémique algérienne. Du point de vue chimique cette espèce se diffère des autres espèces par la présence des

composés, l'isopropyl tétradécanoate, l' α -pinène, l'hexadecanoic acid, le caryophyllène (E), le lédol, le palustrol, l' α -humulène, l' α -copaène, le 9-epi-(E)-caryophyllène, le cis-calamenène.

Le deuxième sous-clade correspondant aux deux sous-espèces *rupestrer* et *scandens*. Ces deux sous-espèces sont écologiquement et morphologiquement très proches, mais elles sont chimiquement bien différenciées. La sous-espèce *rupestrer* est caractérisée par la présence de l' α -fenchène, le lédol, le limonène, le torulosol, le 13-epi-manool oxide, l' α -epi-cadinol, allo-aromadendrène, alors que l'autre sous-espèce se caractérise par l' α -pinène, l'hexadecanoic acid, le caryophyllène (E), le 2-pentadécanone, le γ -cadinene, le triacontane, le dodécanoic acid.

1-5- Chimiotypes des espèces du genre

La région Méditerranéenne est peuplée de différentes espèces et de sous-espèces du genre *Helichrysum*. Pour comparer la composition chimique des huiles essentielles de nos populations du genre *Helichrysum* avec celles du monde, une UPGMA est réalisée.

- **Chimiotypes d'*H. stoechas***

L'analyse UPGMA montre que les populations d'*H. stoechas* sont séparées en deux clades (Figure 38). Le premier clade regroupe les populations de la Crète, de la Grèce et de l'Algérie. La ssp. *rupestrer* algérienne se trouve nettement séparer des sous-espèces de ce groupe.

La séparation des sous-espèces de l'espèce *H. stoechas* nous indique la présence de variabilité chimique importante. Cette variabilité chimique a favorisé la formation de plusieurs chimiotypes.

La ssp. *rupestrer* se caractérise par la présence du chiomiotype (α -humulène- α -fenchène-ledol). La ssp. *barrelieri* de la Grèce est représentée par le chiomiotype (α -humulène-caryophyllène-(E)- β -elémène), alors que les deux populations de la sous-espèce *barrelieri* (Crète 1-2), se caractérisent par le chiomiotype (α -humulène-caryophyllène (E)- α -copaène).

Le deuxième clade regroupe un ensemble de populations du (Portugal, France, Espagne et Algérie). La sous-espèce *scandens* se trouve plus proche de la ssp. *stoechas* d'Espagne. Elle se caractérise par la présence du chiomiotype (α -pinène- γ -cadinène- α -copaène), alors que la ssp. *stoechas* d'Espagne est représentée par le chimiotype (α -pinène- γ -cadinène- α -epi-bisabolol). Les autres populations du Portugal, de France et d'Espagne se définissent par le chiomiotype (α -pinène-limonène).

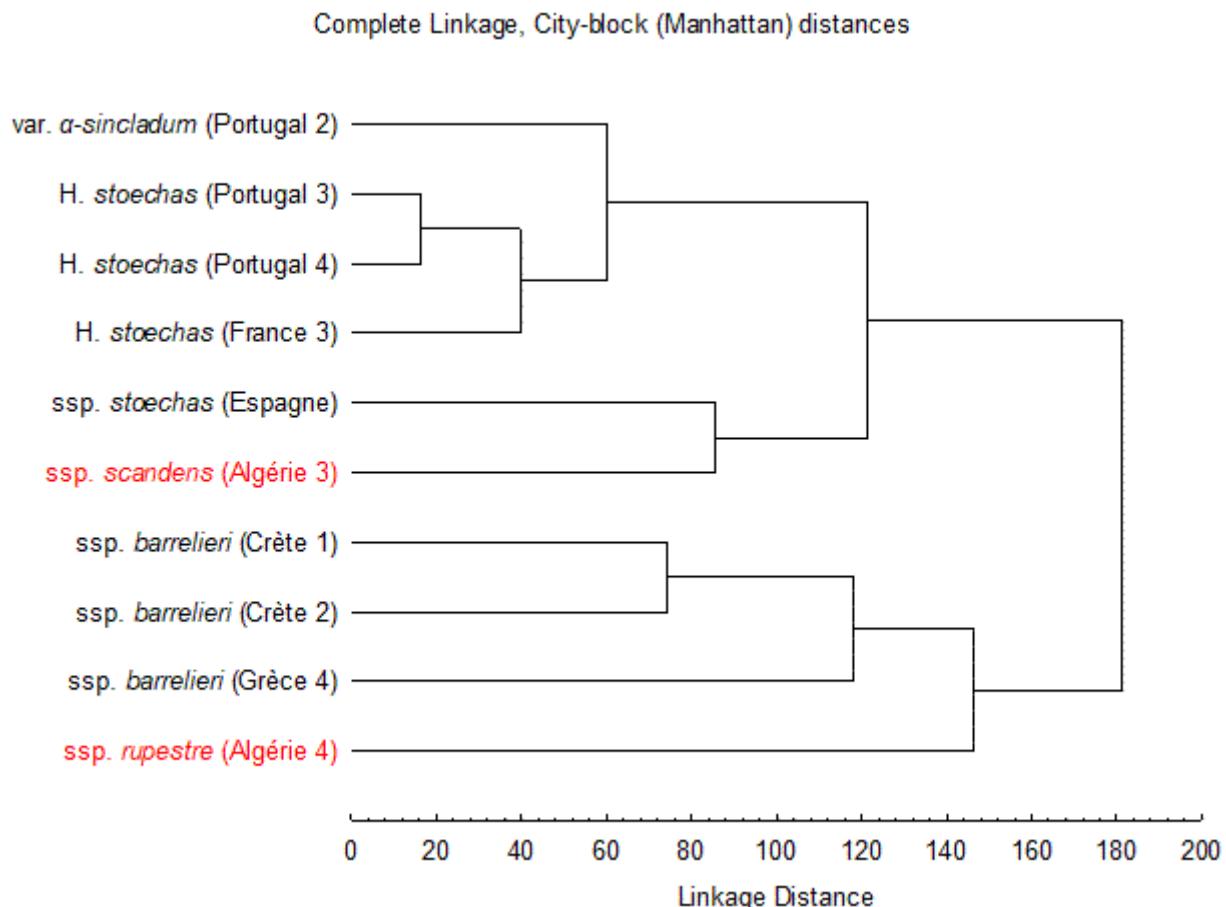


Figure 38: UPGMA cluster des espèces *H. stoechas* du genre *Helichrysum*

La comparaison des composants chimiques des huiles essentielles de la sous-espèce *rupestris* avec ceux des populations d'*H. stoechas* du monde, a montré que la sous-espèce est séparé des autres population par la présence des composées majoritaire; l' α -fenchène, le ledol, alors que les sous-espèces *barrelieri* de la Grèce (Chinou *et al.*, 1997) et la Crète (Roussis *et al.*, 2002), sont caractérisées par la présence de composé majoritaire le caryophyllene (E).

Les résultats d'analyse de la sous-espèce *scandens* confirme que cette sous-espèce est caractérisée par l' α -pinène comme composé majoritaire, tandis que la sous-espèce *stoechas* d'Espagne (Tsoukatou *et al.*, 1999) qui est accès proche d'elle, se caractérise par la présence des composées l' α -pinène et l' α -epi-Bisabolol.

Les autres auteurs population du portugale (Proença da Cunha et Cardoso do Vale 1974 ; Ascensao *et al.*, 2001) et de France (Vernin et Poite 1998), se trouve proche par la présence de composée majoritaire l' α -pinène.

- **Chimiotypes d'*H italicum***

L'analyse UPGMA nous a permis de la comparaison de la composition chimique d'huile essentielle de la population d'*H. italicum* avec l'*H. italicum* du monde. La variété *numidicum* d'Algérie est caractérisée par la présence de chiomiotype isopropyl tetradecanote-hexadecanoic acid. Ce qui la sépare du reste des populations du monde (Figure 39).

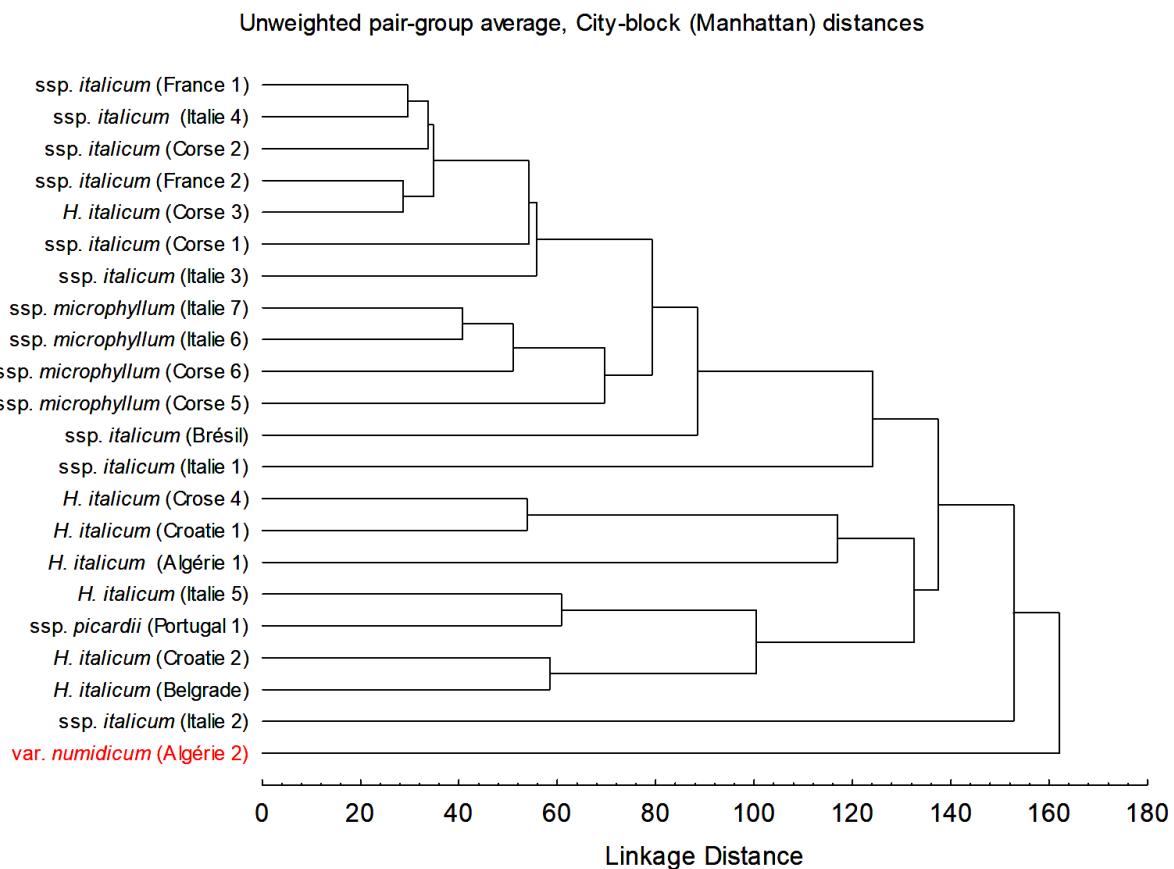


Figure 39: UPGMA cluster des espèces d'*H. italicum*

L’isopropyl tetradecanote et l’ α -pinène caractérise la variété numidicum, ce qui confirme la séparation de cette variété par rapport aux autres populations d’*H. italicum* du monde. Bouzid *et al.*, (2017) identifient l’ α -cedrène et l’ α -curcumène comme composants majoritaires pour l’espèce *H. italicum* d’Algérie (de la région Ouest). La sous-espèce *italicum* du brésil se caractérise qui par le γ -curcumène et le neryl acétate (Nebojsa *et al.*, 2015). La sous-espèce d’Italie 6 contient du neryl acétate (Melito *et al.*, 2016).

- **Chimiotypes d’*H. lacteum***

La variété *typicum* endémique algérienne de l’espèce *H. lacteum* est comparée avec les espèces du genre *Helichrysum*. Les résultats d’analyses montrent que les espèces du genre *Helichrysum* sont divisées en deux clades (Figure 40).

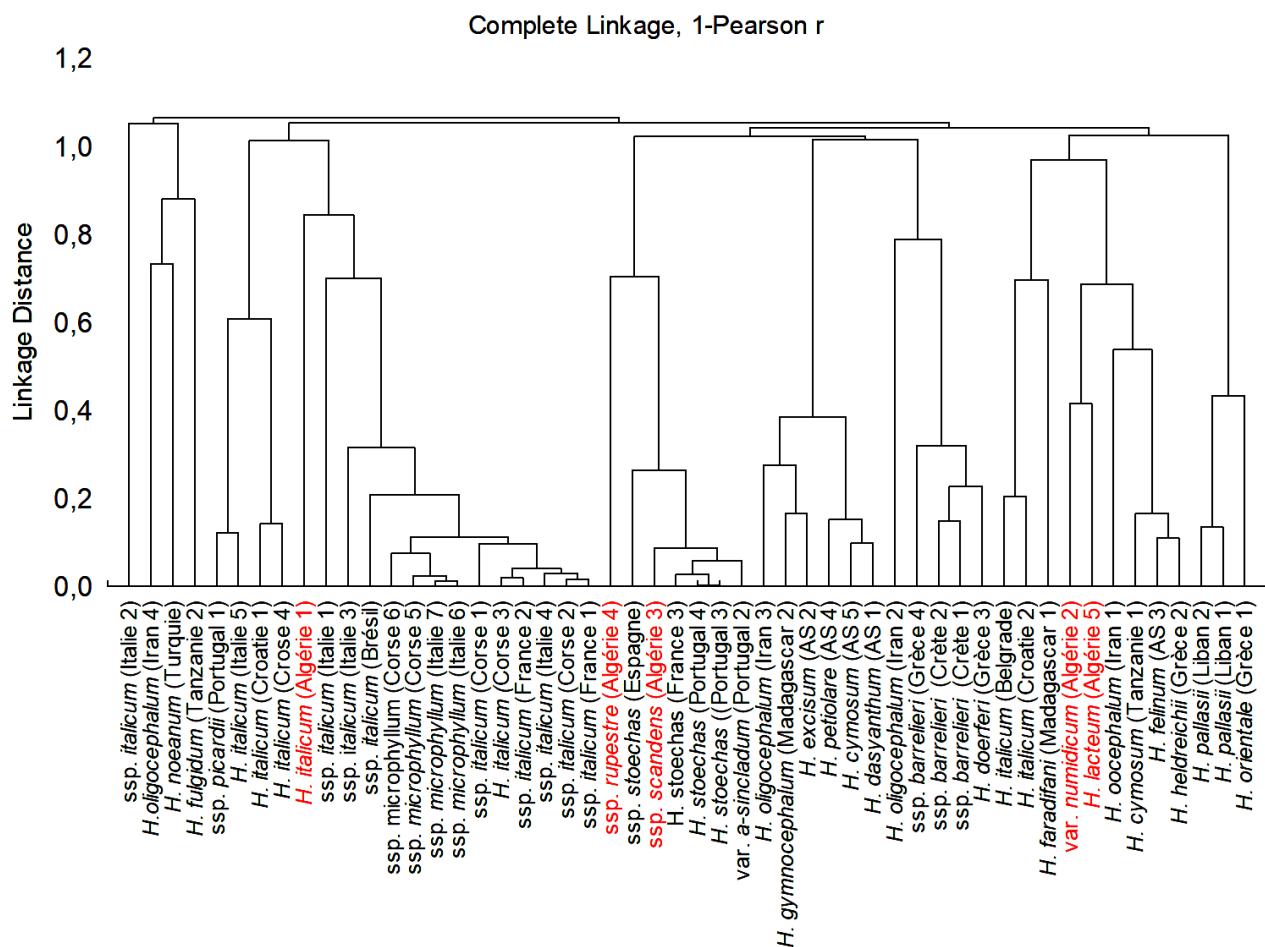


Figure 40: UPGMA cluster des espèces du genre *Helichrysum*

Le premier clade regroupe la sous-espèce *italicum* (Italie 2), l'espèce *H. oligocephalum* (Iran 4) et l'espèce *H. noeicum* de la Turquie

Le deuxième clade se divise en deux groupes, le premier groupe rassemble l'espèce *H. italicum* (Algérie 1) avec la majorité des populations *H. italicum* du monde. Le deuxième groupe est subdivisé en deux branches, la première branche regroupe nos deux sous-espèces, *scandens* et *rupestris* d' *stoechas* avec la plupart des populations d' *H. stoechas*. Alors que la deuxième branche rassemble l'espèce endémique *H. lacteum*, la variété *numidicum* avec les autres espèces du genre *Helichrysum*. Cette espèce endémique est chimiquement bien proche de l'espèce *H. italicum*, qui est riche en α -pinène, caryophyllène (E), hexadecanoic acid, caryophyllène oxide et farnesyl acetone (5Z, 9E).

Cette séparation des espèces du genre *Helichrysum*, prouve que le genre *Helichrysum* possède des variations chimiques intraspécifique et interspécifique importantes.

2- Résultats microbiologiques

Les tests de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* ont été réalisés par la méthode de l'aromatogramme. Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des bactéries par les huiles essentielles. L'activité des huiles est estimée par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier filtre imprégné d'HE à la surface du milieu gélosé Mueller-Hinton, dans des boites de pétri, préalablement ensemencées par 10⁶ unité formant une colonie (UFC)/ml.

Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre D des halos d'inhibition en mm, après 24h d'incubation à l'étuve à 37°C, suivant trois niveaux d'activités : Résistant (D = 6mm), Intermédiaire (13mm ≥ D > 6mm), Sensible (D > 13mm) (Billerberck *et al.*, 2007).

Les résultats d'activité antimicrobienne obtenus pour l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *rupestris* montrent que l'huile essentielle et ses différentes dilutions présentent une activité inhibitrice sensible contre toutes les bactéries testées avec des diamètres d'inhibition variant entre 8 et 13,5 mm, en comparaison avec les diamètres générés par les antibiotiques (Tableau 9).

Tableau 9 : Activité antimicrobiennes d'*H. stoechas* ssp. *rupestris*

Bactéries	Antibiotiques			<i>H. stoechas</i> ssp. <i>rupestris</i>			
	CTX	CS	GEN	EO	1/2	1/5	1/10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33,5	15	25	13	9	9	8,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	18	0	9,5	10,5	9	9,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	19	13	17	11	9	8	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18,5	15	22,5	13,5	9	9	8
<i>Shigella</i> sp	14	15	30	10,5	9	9	9
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0

CTX : Cefotaxime ; CS : Colistin sulfate ; GEN : Gentamicine

La bactérie *Staphylococcus aureus* est sensible à l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *rupestris* et aux dilutions. La levure *candida albicans* présente une résistance à l'huile de cette sous-espèce (Figure 41).

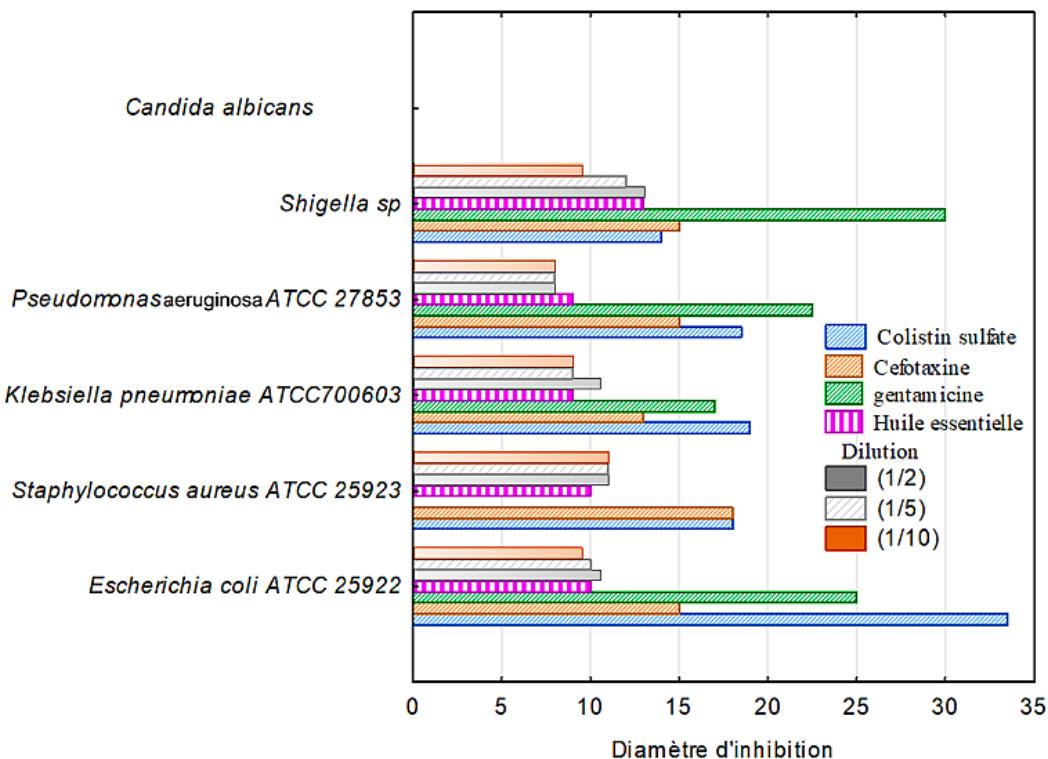


Figure 41 : Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d' *H. stoechas* ssp. *rupestre*

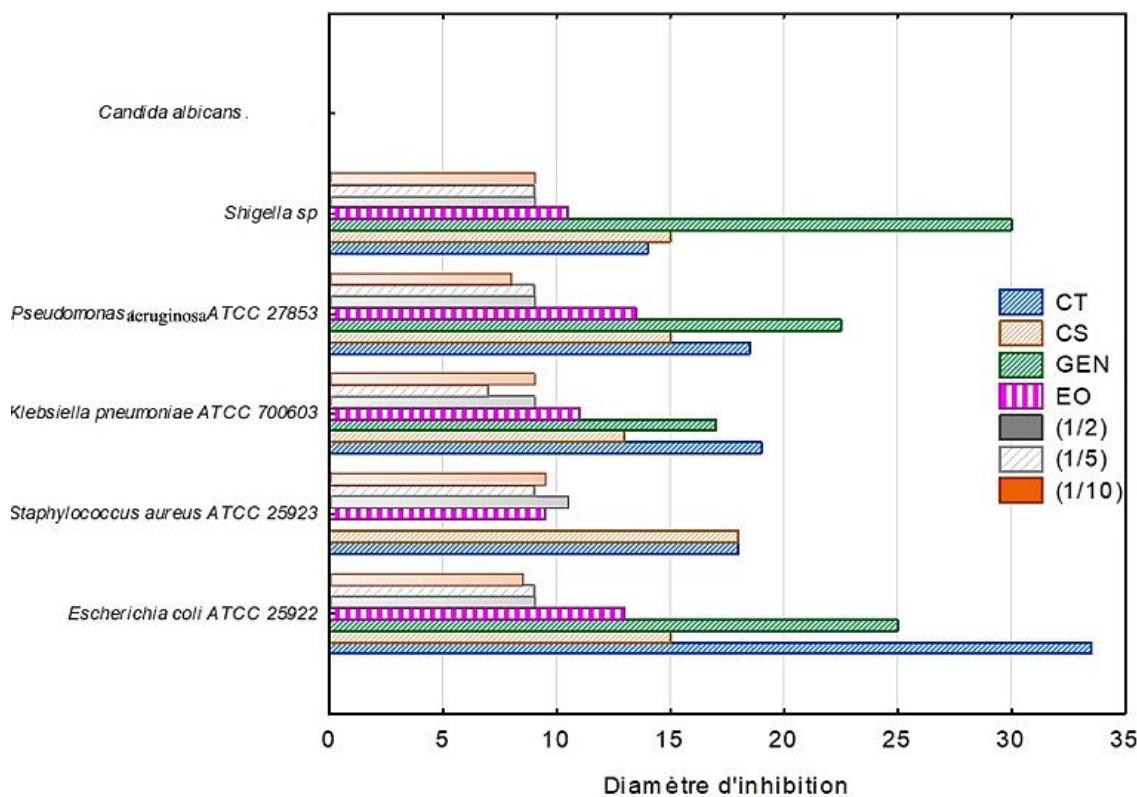
L'huile essentielle et les dilutions d'*H. stoechas* ssp. *scandens* génère des diamètres de zones d'inhibition de 8,5 à 14 mm, sur toutes les souches bactériennes, à l'exception de la levure *Candida albicans* qui présente une résistance à l'huile de cette sous-espèce et ses dilutions (Tableau 10).

L'huile essentielle de cette sous-espèce possède une activité antibactérienne moyennement active en comparaison avec les diamètres générés par les antibiotiques, contre toutes les bactéries testées, sauf *Klebsiella pneumoniae* qui est résistante, alors que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est résistante aux dilutions (1/2), (1/5) et (1/10). Les deux bactéries, *Staphylococcus aureus* et *Shigella sp* sont sensibles à l'huile avec des diamètres d'inhibition supérieure à 13 mm (Figure 42).

Tableau 10 : Activité antimicrobiennes d'*H. stoechas* ssp. *scandens*

Bactéries	Antibiotiques			<i>H. stoechas</i> ssp. <i>scandens</i>			
	CTX	CS	GEN	EO	1/2	1/5	1/10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33,5	15	25	12	11	8,5	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	18	0	14	12	9,5	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	19	13	17	0	10	9,5	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18,5	15	22,5	10	0	0	0
<i>Shigella</i> sp	14	15	30	14	10	9	8,5
<i>Candida albicans</i> 1	-	-	-	0	0	0	0

CTX : Cefotaxime ; CS : Colistin sulfate ; GEN : Gentamicine

Figure 42 : Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *scandens*

L'huile essentielle pure d' *H. italicum* var. *numidicum* montre une activité moyenne à éléver, contre toutes les bactéries, en produisant un diamètre d'inhibition de 11,5 à 14 mm. Une activité importante est remarquée contre *Staphylococcus aureus* par rapport à la gentamicine. Les dilutions (1/2) et (1/5) ont un effet modéré contre toutes les bactéries testées, sauf *Pseudomonas aeruginosa* qui résiste à toutes les

dilutions. Contrairement aux dilutions (1/10), qui affectent seulement la bactérie *Shigella sp* (Tableau 11).

Tableau 11 : Activité antimicrobiennes d' *H. italicum* var. *numidicum*

Bactéries	Antibiotiques			<i>H. italicum</i> var. <i>numidicum</i>			
	CTX	CS	GEN	EO	1/2	1/5	1/10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33,5	15	25	14	9	9	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	18	0	14	9	9	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	19	13	17	13	7	7	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18,5	15	22,5	14	0	0	0
<i>Shigella sp</i>	14	15	30	11,5	10	11,5	9
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	0	0	0	0

CTX : Cefotaxime ; CS : Colistin sulfate ; GEN : Gentamicine

Toutes les bactéries testées sont sensibles aux antibiotiques sauf la bactérie *Staphylococcus aureus* qui est résistante à la gentamicine. Le champignon *Candida albicans* est résistant à l'huile essentielle et ces différentes dilutions (Figure 43).

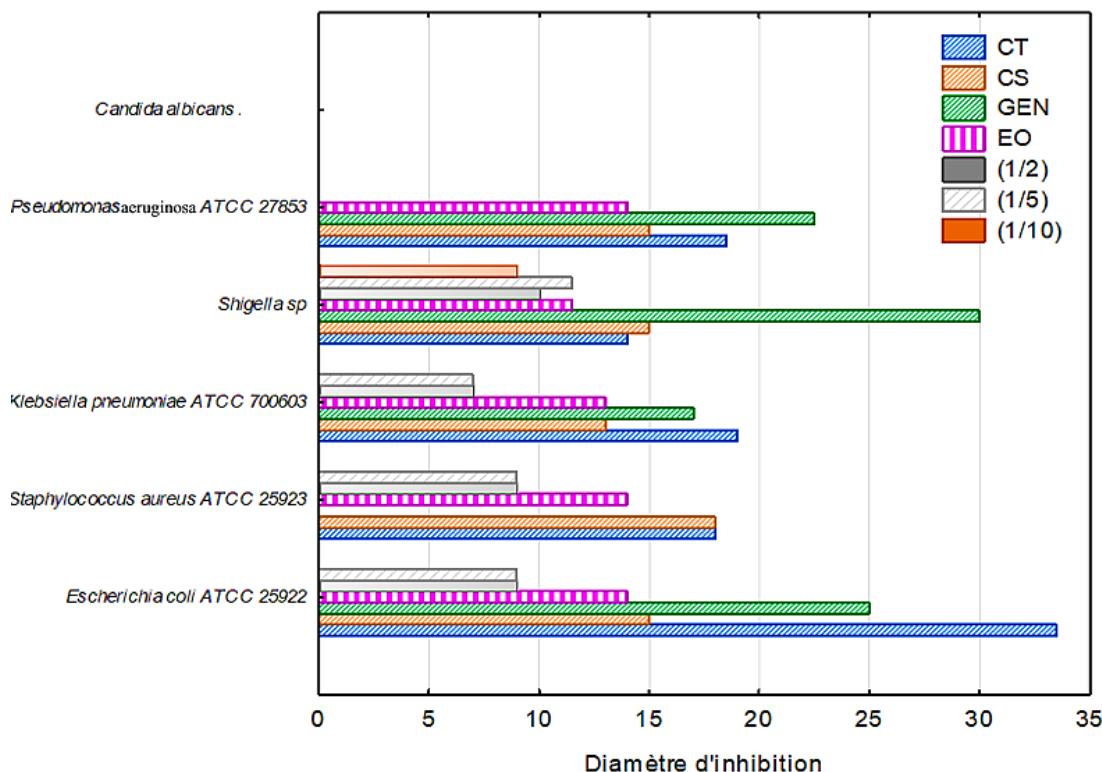


Figure 43 : Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d' *H. italicum* var. *numidicum*

Les résultats obtenus, pour l'espèce *H. lacteum* var. *typicum*, montrent que l'huile et ses dilutions ont une activité modérée contre toutes les bactéries testées, avec un diamètre d'inhibition de 8 à 13mm, alors que son activité est importante contre la bactérie *Staphylococcus aureus* par rapport à la gentamicine (Tableau 12).

Toutes les bactéries testées sont sensibles aux antibiotiques sauf *Staphylococcus aureus* qui est résistant à la gentamicine (Figure 44). Le germe *Candida albicans* présente une résistance à l'huile et les dilutions de cette sous-espèce.

Ces résultats obtenus montrent que, toutes les huiles essentielles pures, des espèces du genre *Helichrysum* étudiées, ont une activité inhibitrice intermédiaire sur toutes les bactéries testés, alors qu'elle est nulle pour la levure *Candida albicans*.

Tableau 12: Activité antimicrobiennes d' *H. lacteum* var. *typicum*

Bactéries	Antibiotiques			<i>H. lacteum</i> var. <i>typicum</i>			
	CTX	CS	GEN	EO	1/2	1/5	1/10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33,5	15	25	10	10,5	10	9,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	18	0	10	11	11	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	19	13	17	9	10,5	9	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	18,5	15	22,5	9	8	8	8
<i>Shigella sp</i>	14	15	30	13	13	12	9,5
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	0	0	0	0

CTX : Cefotaxime ; CS : Colistin sulfate ; GEN : Gentamicine

Les résultats d'évaluation d'effets bactéricides et bactériostatiques des huiles essentielles des espèces étudiées du genre *Helichrysum* vis-à-vis des souches bactériennes testées, révèlent qu'ils ont un effet bactériostatique sur toutes les bactéries testées.

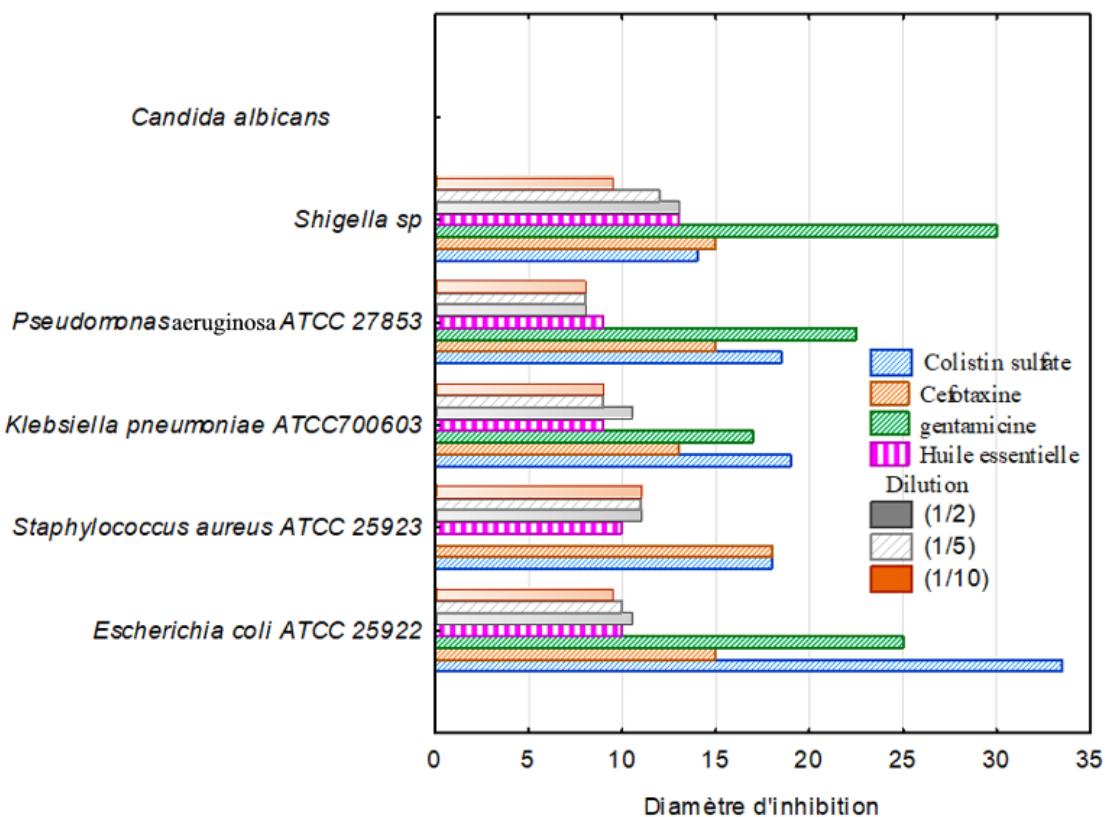


Figure 44: Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle d'*H. lacteum* var. *typicum*

Plusieurs précédentes études ont été consacrées à la détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et de certains extraits d'espèces *Helichrysum*. L'étude réalisée par Sobhy et El-feky, (2007) en Libye a montré que l'huile essentielle de *H. stoechas* a une forte activité inhibitrice sur la *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, tandis qu'elle a une activité antifongique modérée contre *Candida albicans*. Haddouchi *et al.*, (2016) signale que les extraits méthanoliques et hexaniques d'*H. stoechas* ssp. *rupestris* en Algérie ont une activité antibactérienne modérée contre les bactéries, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*. Des études ont montré que certaines bactéries testées sont sensibles aux extraits éthanoliques d'*H. stoechas*, telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* et *Klebsiella pneumoniae*, comparable à celle des antibiotiques testés, par contre d'autres bactéries sont résistantes comme *Escherichia coli* (Boubakeur *et al.*, 2017).

Les résultats bactériologiques obtenus dans notre travail, pour l'espèce *H. italicum* var. *numidicum* sont similaires à ceux trouvés dans la littérature, L'huile essentielle d'*H. italicum* est active contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Mastelić *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que les extraits d'*H. italicum* ont la capacité d'inhiber la croissance de *Staphylococcus sp* (Cosar *et al.*, 1990; Roussis *et al.*, 2002). Les résultats trouvés par Bouzid *et al.*, (2017) ont montré que toutes les dilutions d'huile essentielle d'*H. italicum* n'ont aucun effet sur les bactéries *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella pneumonia*, par contre sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*, l'huile essentielle de cette espèces présentent une forte activité inhibitrice.

Récemment, des études plus approfondies ont été sujet d'investigation sur l'identification des substances naturelles capables d'inhiber la croissance des bactéries et des champignons pathogènes. Les acides gras libres possèdent une forte activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et sur *Pseudomonas aeruginosa* (Sirot *et al.*, 1983 ; Saurat et Thomas, 2009). Bouhdid, (2009) signale que les huiles essentielles dont les composants majoritaires sont des phénols ou des aldéhydes expriment la plus grande activité antibactérienne. La présence d'acide palmitique et des aldéhydes à faible concentration dans la composition chimique de nos huiles essentielles explique probablement la faible activité bactériologique de nos espèces.

Les huiles essentielles riches en géraniol, carvacrol et thymol présentent une excellente activité antifongique contre *candida albicans* (Dalleau *et al.*, 2008; Kordali *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2011; Marcos-Arias *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2015; Boonruang *et al.*, 2017; Miladi *et al.*, 2017). Des recherches ont montré que les extraits naturels contenant des acides phénoliques ont une activité antifongique contre les espèces du genre *Candida* (Manayi *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2014; Teodoro *et al.*, 2015). L'absence des acides phénoliques et des composés terpéniques comme le géraniol, le carvacrol et le thymol dans la composition des huiles essentielles, des espèces étudiées du genre *Helichrysum* peut expliquer les résultats obtenus pour *candida albicans*.

3- Résultats de l'activité cytotoxique

Le test de cytotoxicité permet la recherche d'un effet toxique sur un type cellulaire par l'évaluation d'un paramètre donné (croissance cellulaire, intégrité cellulaire, activité fonctionnelle cellulaire...).

L'évaluation de l'activité cytotoxique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* a été réalisée pour la première fois sur la lignée des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (acronyme de Michigan Cancer Fondation 7).

La mesure de l'effet cytotoxique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 est effectuée par la technique de fluorescence en utilisant la résazurine.

Après 72h de culture, l'intensité de fluorescence obtenue après lecture en Fluoroskan Ascent Fl à 590 nm, est convertie en pourcentage d'inhibition de la prolifération par rapport à la prolifération des cellules témoin (DMSO).

Les résultats obtenus sont exprimée en pourcentage de viabilités en fonction de différente concentration d'huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* (Figure 45).

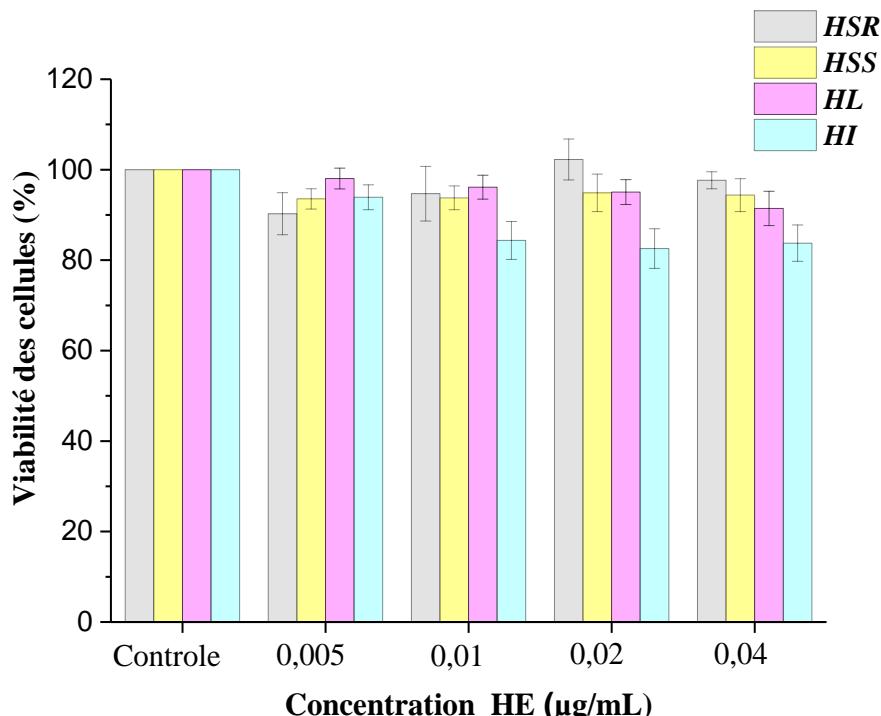


Figure 45 : Cytotoxicité des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* (**HSR** : *H. Stoechas* ssp. *rupestris*, **HSS** : *H. Stoechas* ssp. *scandens*, **HL** : *H. Lacteum* et **HI** : *H. Italicum*)

Les résultats, de l'activité cytotoxique obtenus, montrent que les huiles essentielles des espèces étudiées n'avaient pratiquement aucune activité sur la prolifération cellulaire globale des lignées cellulaires MCF-7, comparées aux cellules témoin (DMSO). Pour les quatre huiles des espèces *d'Helichrysum*, une croissance supérieure à 80% a été observée pour les lignées cellulaires MCF-7 avec les différentes concentrations des huiles, cette croissance indique que les huiles essentielles n'ont aucune une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses.

L'effet inhibiteur des huiles essentielles des espèces *Helichrysum* sur la viabilité cellulaire est inférieure à 50%, donc la concentration inhibitrice (IC50) qui est la concentration qui inhibe de moitié la prolifération cellulaire globale n'est pas calculable.

A notre connaissance, jusqu'à ce jour, aucune étude n'avait été réalisée sur l'activité cytotoxique des huiles essentielles de nos espèces étudiées du genre *Helichrysum*. Cependant dans la littérature quelque études sur la cytotoxicité des huiles essentielles des autres espèces du genre *Helichrysum*, ont été réalisées sur les cellules MCF-7 et d'autres lignées cellulaires.

La cytotoxicité des extraits des espèces *Helichrysum* d'Afrique de sud a été évaluée *in vitro*, contre les lignées cellulaires d'épithélium rénal humain transformé (Graham) et adénocarcinome du sein (MCF-7), une croissance inférieure à 25% a été observée pour ces deux lignées cellulaires à la concentration 0,1 mg/ml (Lourens *et al.*, 2011). D'autre part l'huile essentielle de *H. gymnocephalum* a montré une forte activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses mammaires humaines (MCF-7), avec IC50 de 16 ± 2 mg / L (Afoulous *et al.*, 2011).

La cytotoxicité des extraits isolés *d'H. zivojinii* endémique de la Macédoine a été testée contre différentes lignées cellulaires cancéreuses (cellules adénocarcinome du col de l'utérus humain (HeLa), mélanome humain (Fem-x), humain leucémie myéloïde (K562) et adénocarcinome mammaire humain (MDA-MB-361), les résultats obtenus indiquent une activité cytotoxique significative (Matić *et al.*, 2013).

D'autre part l'huile essentielle *d'H. microphyllum* ssp. *tyrrhenicum* de la Sardaigne a montré une cytotoxicité significative contre trois lignées cellulaires tumorales humaines (MDA-MB 231, HCT116 et A375) testés, notamment sur des

cellules de mélanome A 375, qui présente une forte activité inhibitrice de valeur (IC50 à 16 µg / ml) (Ornano *et al.*, 2015).

Au cours des dernières années, une attention considérable a été accordée à l'identification de substances naturelles capables d'inhiber, de retarder ou d'inverser le processus de la cancérogenèse à plusieurs étapes. Comme exemple le δ-cadinène a été signalé comme substance à activité cytotoxique élevée sur les lignée cellulaire de carcinome du sein humain BT-20 et épithélium humain lignée cellulaire d'adénocarcinome HeLa (Kubo and Morimitsu, 1995). Afoulous *et al.*, (2011) dans une étude sur les propriétés anticancéreuses d'*H. gymnocephalum*, ont établies des corrélations entre les composés identifiés et leurs activités biologiques anticancéreux sur les MCF-7. Cette corrélation suggère que la présence à forte concentration des composés tels que l'α-terpinolène, l'aromadendrène et le β-sélinène, pourrait avoir un effet positif sur l'activité anticancéreuse. La présence de ces composées chimiques à faible concentration, dans les huiles essentielles des espèces étudiées du genre *Helichrysum*, peuvent expliquer l'absence d'effet cytotoxique sur les lignées cellulaires MCF-7.

4- Résultats Caryologique

Le dénombrement chromosomique a été réalisé sur les méristèmes racinaires des graines des espèces du genre *Helichrysum* en appliquant la technique du squash.

L'observation microscopique des plaques métaphasiques d'*H. italicum* var. *numidicum* de la localité des Bibans (Bourdj Bou Arreridj) et de la variété *typicum* de l'espèce *H. lacteum* de la localité de Megres (Sétif), ont montré un nombre chromosomique tétraploïde ($2n = 4x = 28$) avec un nombre de base à $x = 7$ (Figure 46).

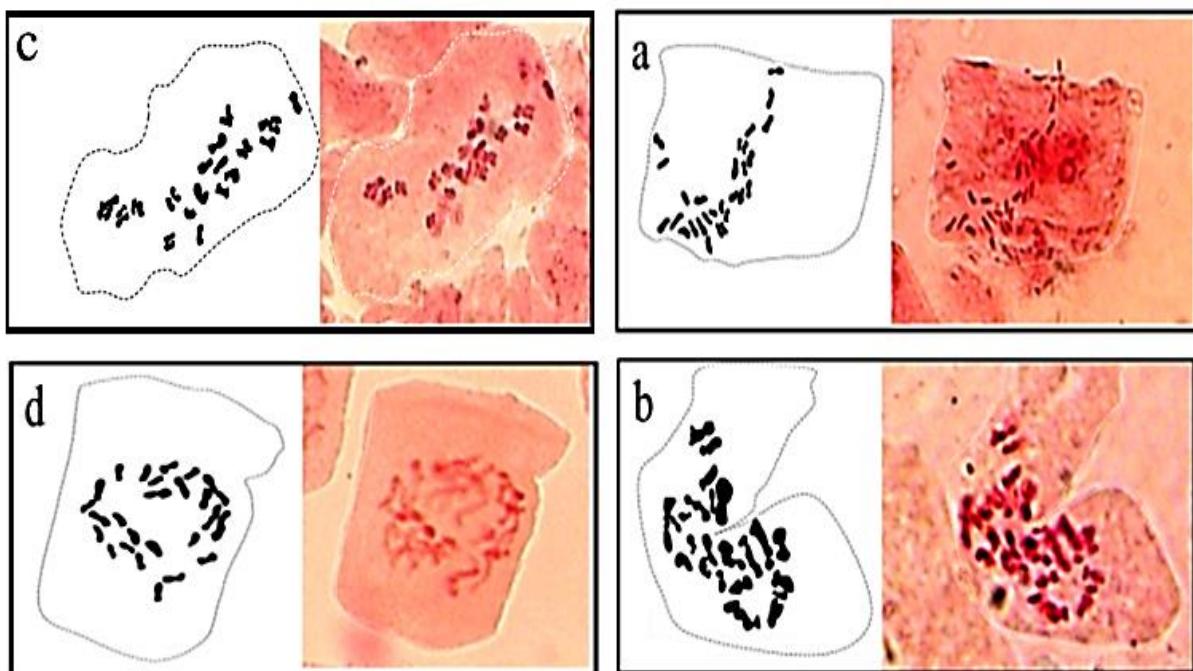


Figure 46: Plaque métaphasique des cellules méristimatiques racinaires des espèces du genre *Helichrysum* : a) *H. italicum* à $2n = 4x = 28$; b) *H. italicum* à $2n = 4x = 28$; c) *H. stoechas* ssp. *rupestris* à $2n = 4x = 28$; d) *H. stoechas* ssp. *scandens* à $2n = 4x = 28$

Les mêmes résultats caryologique à nombre chromosomique tétraploïde ($2n = 4x = 28$) avec un nombre de base à $x = 7$ ont été obtenus en réalisant le dénombrement chromosomique des deux sous-espèces méditerranéennes, *H. stoechas* ssp. *rupestris* et *H. stoechas* ssp. *scandens*, des localités de Derguina (Bejaia) et de Boutaleb (Setif).

Le résultat de $2n = 28$, obtenu pour l'espèce *H. italicum* var. *numidicum*, est semblable avec ceux de la littérature. Les résultats des deux sous-espèces *siculum* et *microphyllum* d'*H. italicum* d'Espagne et d'Italie, montrent le même nombre chromosomique tétraploïdes ($2n = 4x = 28$) (Galbany-Cassal et Romo, 2008). Le même résultat chromosomique est obtenu pour la variété *ericoideum* d'Italie (D'Amato, 1971).

Le dénombrement chromosomique des deux sous-espèces *rupestris* et *scandens* d'*H. stoechas*, révèle la présence d'un tétraploïde à $2n = 28$. Le même nombre chromosomique est trouvé en Espagne pour l'espèce *H. stoechas* (Galbany-Cassal et Romo, 2008), en crête (Namur et Verlaque, 1976) et en Italie (Kamari *et al.*, 1999).

Le nombre chromosomique $2n = 4x = 28$ ainsi le nombre de base $x = 7$ est identifiée pour la première fois pour la variété endémique algérienne *H. lacteum* var *typicum*.

Nos résultats obtenus pour le nombre chromosomique des espèces étudiées de genre *Helichrysum* algériennes qui sont des espèces tétraploïdes $2n = 4x = 28$ avec $x = 7$, ont confirmés les suggestions bibliographiques que les espèces de genre *Helichrysum* tétraploïdes avec le nombre chromosomique de base $x = 7$ sont en général des espèces méditerranéennes, macaronésien, asiatique et africaine (Namur et Verlaque, 1976 ; Galbany-Casals *et al.*, 2008, 2009 ; Azizi *et al.*, 2014). Cependant la découverte de nombre de base $x = 7$ dans les espèces étudiées de genre *Helichrysum* algériennes apportent un soutien supplémentaire à la polyploidie en tant que principale tendance évolutive du nombre de chromosomes chez *Helichrysum*.

CONCLUSION

CONCLUSION

Conclusion

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'étude phytochimique, caryologique et les activités biologiques du genre *Helichrysum* Auct. Plur. de l'Est Algérien.

Les huiles essentielles extraites de quatre espèces du genre *Helichrysum* par l'hydrodistillation, ont données un rendement faible de 0,025%. Cette variabilité en rendement peut-être due principalement à plusieurs facteurs, dont l'origine géographiques, l'espèce, l'altitude et la période de récolte ainsi au temps de séchage et aux techniques d'extraction des huiles essentielles.

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* a été réalisée par GC/SM. Trente-sept composés terpéniques sont identifiés dans l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *rupetsre*. Les principaux composants de cette huile essentielle sont l'α-fenchène, le ledol, l'α-pinène, l'α-copaène, le limonène, le torulosol, le 13-epi-manool oxide, l'α-epi-cadinol, l'allo-aromadendrène et le γ-cadinène.

Dans l'huile essentielle d'*H. stoechas* ssp. *scandens*, quarante-six composants ont été caractérisés. L'α-pinène, l'α-copaène, l'hexadecanoic acid, le caryophyllene (E), le pentadecanone, le γ-cadinene, le δ-cadinène, le triacontane, le dodecanoic acid, sont identifiés comme les principaux constituants dans cette huile.

Quarante-quatre composées terpéniques sont identifiées dans l'huile essentielle d'*H. lacteum*. Les composées majoritaires qui représentent les taux les plus élevées de cette huile sont, l'hexadecanoic acid, le caryophyllène (E), le farnésyl acétone (5Z, 9E), l'α-pinene, le caryophyllène oxide, l'α-humulène, le n-nonanal, l'humulène epoxide II, le caryolan-8-ol, l'α-cadinol-épi, le γ-dodècalactone.

L'analyse de l'huile essentielle d'*H. italicum* fait apparaître quarante-trois composés. Les principaux composés majoritaires présents dans l'huile sont, l'isopropyl tetradecanoate, l'α-pinène, l'hexadécanoic acid, le caryophyllène (E), le léadol, le palustrol, l'α-humulène, l'α-copaène, le 9-epi-(E)-caryophyllène, le cis-calaménène, l'α-épi-cadinol.

En matière d'activité antimicrobienne, les huiles essentielles du genre *Helichrysum* ont montré un effet modeste vis-à-vis toutes les souches bactériennes

CONCLUSION

testées, alors qu’elles ne présentent aucune activité antifongique significative contre *Candida albicans*, ceci est dû principalement à la nature de la composition chimique de ces huiles essentielles.

L’évaluation de l’activité cytotoxique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* a été établie sur les lignées des cellules cancéreuses mammaire MCF-7. Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles des espèces ne présentent aucun effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses MCF-7 à la concentration testée.

Le dénombrement chromosomique porté sur les espèces du genre *Helichrysum* Algérien nous a permis de déterminer un nombre chromosomique tétraploïde à $2n = 4x = 28$ avec un nombre chromosomique de base $x = 7$.

Nous espérons que notre travail contribue à faire progresser les connaissances sur la flore Algérienne, car chaque espèce peut être considérée comme un réservoir important de gène et une source pour la recherche des produits à intérêt pharmacologiques. Comme perspective dans la continuité de ce travail, il serait intéressant de faire des investigations chimique sur les différents extraits de ces espèces du genre *Helichrysum*, ainsi établir des études sur d’autres activités biologiques et d’évaluer l’activité cytotoxique de ces extraits sur d’autres lignées cellulaires avec différentes concentrations.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- «Pharmacopée française, 2014. Liste A et B des Plantes médicinales.
[http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise
Substances -d'origine- végétale.](http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise/Substances -d'origine- végétale)
- Aazza, S., Lyoussi, B and Miguel, M.G., 2011. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. *Molecules*, 16 (9): 7672-7690.
- Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A and Maachi, R., 2016. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 94: 197-205.
- Abdoul, D.S., 2002. Compostions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone du burkina soudanienne du burkina faso : valorisation. Thèse de Doctorat Science Physique. Présentée à l'Université de Ouagadougou, p 162.
- Abolaji, A.O., Ojo, M., Afolabi, T.T., Arowoogun, M.D., Nwawolor, D and Farombi, O.E., 2017. Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from *Zingiber officinale* (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 270 : 15-23.
- Abramson, C.I., Wanderley, P.A., Wanderley, M.J.A., Silva, J.C.R and Michaluk, L.M., 2007. The Effect of essential oils of sweet fennel and pignut on mortality and learning in africanized Honeybees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology*, 36 (6) : 828-835.
- Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruzc, M.T., Zulfiqar, A., Khan, I.A., Efferth, T and Salgueiro, L., 2016. Chemical Composition and Biologica Activities of *Artemisia judaica* Essential Oil from Southern Desert of Jordan. *Journal of Ethnopharmacolog*, 191 (15):161-168.
- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gaz chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing. Carol Stream.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adrar, N., Oukil, N and Bedjou, F., 2016. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88: 112-119.
- AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ième} édition, Paris.
- Afolayan, A.J and Meyer, J.M., 1997. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*, *Journal of Ethnopharmacology*, 57: 177-181.
- Afoulous, S., Ferhout, H., Raoelison, E.G., Valentin, A., Moukarzel, B., Couderc, F and Bouajila, J., 2011. *Helichrysum gymnocephalum* essential oil: chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations. *Molecules*, 16 (10): 8273-8291.
- Ahmad, A., Khan, F., Akhtar, S., Yousuf, I., Xess, L.A and Khan, N., 2011. ManzoorFungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida European*. *Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30 (1): 41–50.
- Ahmad, H., Tijerina, M.T and Tobola, A.S., 1997. Preferential overexpression of a class MU glutathione S-transferase subunit in mouse liver by myristicin. *Biochemistry Biophysics Research Communucation*, 236: 825-828.
- Ait Mbarek, L.A., Mouse, H.A., Elabbadi N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., Kamal, M., Dalal, A and Zyad A., 2007. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. 40: 839-847.
- Al Jahid, J., Elamrani, A., Lahlou, F.A., Hmimid, F., Bourhim, B and Blaghen, M., 2017. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from the Seeds of Moroccan *Artemisia campestris* L. *TEOP*, 20 (2): 375-384.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O and Hamzaoglu, E., 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, 119 (1): 114-122.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Gendy, A.A., Moharram, F.A and Zarka, M.A., 2017. Chemical composition, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore flower essential oil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6 (2): 312-319.
- Ali, N.A.A., Chhetri, B.K., Dosoky, NS., Shari, K., Al-Fahad, A.J.A., Wessjohann, L and Setzer, W.N., 2017. Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Ocimum forskolei* and *Teucrium yemens* (Lamiaceae) Essential Oils. *Medicines* 4 (2): 17.
- Aliberti, L., Caputo, L., De Feo, V., De Martino, L., Nazzaro, F and Souza, L.F., 2016. Chemical Composition and in Vitro Antimicrobial, Cytotoxic, and Central Nervous System Activities of the Essential Oils of *Citrus medica* L. cv. 'Liscia' and *C. medica* cv. 'Rugosa' Cultivated in Southern Italy. *Molecules*, 21 (9): 1244.
- Alves, C.T., Ferreira, I.C., Barros, L., Silva, S., Azeredo, J and Henrique, M., 2014. Antifungal Activity of Phenolic Compounds Identified in Flowers from North Eastern Portugal against *Candida* Species. *Future Microbiology*, 9 (2): 139–46.
- Amara, N., Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kaibouche, N., Laissaoui, O and Boufridi, A., 2017 Applications potentielles de l'huile essentielle de lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) comme conservateur alimentaire naturel. *Phytothérapie*, pp : 1–9.
- 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.
- Amorati, R., Foti, M.C and Valgimigli, L., 2013. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (46): 10835–10847.
- Anderberg, A.A and S.E. Freire., 1991. A cladistic and biogeographical analysis of Lucilia group (Asteraceae–Gnaphalieae). *Botanical Journal of Linnean Society*, 106: 173-198.
- Anderberg, A.A., 1989: Phylogeny and reclassification of the tribe *Inuleae* (Asteraceae). *Canad. J. Bot*, 67: 2277-2296.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderberg, A.A., 1991. Taxonomy and phylogeny of the tribe *Gnaphalieae* (Asteraceae). *Opera Bot*, 104: 1-195.
- Angioni, A., Barra, A., Arlorio, M., Coisson, J.D., Russo, M.T., Pirisi, F.M., Satta, M and Cabras P., 2003. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1030-1034.
- Anton, R et Lobstein, A., 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. *Tec and Doc*. Paris, p 522.
- Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, B.L and Munoz, E., 2007. Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. *Journal of Natural Products*, 70: 608-612.
- Aprotoisoaie, A.C., Spac, A.D., Hancianu, M., Miron, A., Tanasescu, V.F., Dorneanu, V and Stanescu, U., 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacia*, 58 (1): 46-54.
- Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, p 720
- Arranz, E., Jaime, L., López de las Hazas, M.C., Reglero, G and Santoyo, S., 2015 Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. *Industrial Crops and Products*, 67: 121-129.
- Ascensao, L., Jaime, A.T., DA, S., José, G., Barroso, A., Figueiredo, C and Luis, G., 2001. Glandular trichomes and essential oils of *Helichrysum stoechas*. *Journal of Plant Sciences*, 49: 115-122.
- Aslan, M., Orhan, D.D., Orhan, N., Sezik, E and Yesilada, E., 2007. A study of antidiabetic and antioxidant effects of *Helichrysum graveolens* capitulums in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*, 10: 396-400.
- Aslan, M., Özçelik, O.B., Orhan, I., Karaoglu, T and Sezik, E., 2006. Screening of antibacterial, antifungal and antiviral properties of the selected Turkish *Helichrysum* species. *Planta Med*, 72: 997-997.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Asprea, M., Leto, I., Bergonzi, C.M and Bilia, A.R., 2017. Thyme essential oil loaded in nanocochleates: Encapsulation efficiency, *in vitro* release study and antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*, 7: 497-502.
- Audigie, C.L., Dupon, G. et Zonggain, F., 1995. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, p 44.
- Averett, J.E., 1980. Polyploidy in plant taxa: summary. In: *Polyploidy, Biological Relevance* (ed. Lewis WH), Plenum Press, New York. pp: 269-273.
- Ayvaz, A., Sagdic, O and Ozturk, I., 2010. Insecticidal Activity of the Essential Oils from Different Plants Against Three Stored-Product Insects. *Journal of Insect Science*: 10 : 21.
- Azizi, N., Masoud, S., Valiollah, M and Nourmohammadi, Z., 2014. Karyotype and genome size analyses in species of *Helichrysum* (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 28 (3): 367-375.
- Bahramian, S., Bigdeli, M.R., Rasoulian, R and Farimani, M.M., 2017. Antitumor and Antiangiogenic Effects of the Crude Oil of *Nigella sativa* L. in Tumor Tissues in BALB/c Mice. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 18 (5): 6667.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem Toxicol*, 46 (2): 446-75.
- Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele E.S and Bollinger, W.H., 1985. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science*, 228: 1154-1159.
- Ballero, M., Poli, F., Sacchetti, G and Loi, M.C., 2001. Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore (south-western Sardinia). *Fitoterapia*, 72: 788-801.
- Baranauskaite, J., Kubiliene, A., Marks, M., Petrikaite, V., Vitkevičius, K., Baranauskas, A and Bernatoniene, J., 2017. The Influence of Different Oregano Species on the Antioxidant Activity Determined Using HPLC Postcolumn DPPH Method and Anticancer Activity of Carvacrol and Rosmarinic Acid. *BioMed Research International*, p 7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barber, A., Rendero, S., Corbi, M., Alba, B., Molina, D and Barber, J.X., 2005. Aproximación al conocimiento etnobiológico y etnoecológico de Ibi (Foia de Castalla-L'Alcoià, Alicante). Identia Institute, Spain.
- Barclay, L.R.C., Xi, F and Norris, J.Q., 2006. Antioxidant Properties of Phenolic Lignin Model Compounds. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 17 (1-2): 73-90.
- Bardeau, F., 2009. Les Huiles Essentielles: Découvrir les Bienfaits et les Vertus d'une Médecine Ancestrale, Editeur, Fernand Lanore, p 315.
- Barroso, M.R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I.P., Barreiro, M.F and Ferreira, I.C.F.R., 2014. Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Ind. Crops Prod*, 53 : 330-336.
- Barry, N., 2001. Art d'extraire les huiles essentielles. De parfum à faire soi-même, p :125-128.
- Baschieri, A., Ajvazi, M.D., Laure, J., Tonfack, F., Valgimigli, L and Amorati, R., 2017. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chemistry*, 232: 656-663.
- 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, p 994.
- Bayer, R. J and Starr., J.R., 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and *trnL/trnF* intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85: 242-256.
- Bayer, R.J., Breitwieser, I., Ward, J.M and Puttock, C.F., 2007. Tibe *Gnaphalieae*. In: Kadereit, JW., Jeffrey, C.(Eds.). The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Eudicots. Asterales. Springer-Verlag Press: Berlin and Heidelberg, 8: 246-284.
- Bego, P., 2001. Connaitre l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, p : 2-3.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A and Mohebbi, M., 2017 .Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11 (2): 847-863.
- Bel Hadj, S.F., Hassayoun, K., Cheraif, F., Khanb, I., Ben Jannet, S., Hammami, H., Aouni, M and Harzallah-Skhiri, F., 2017. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24 (4): 875-882.
- Belaïche, P., 1979. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome 1: l'aromatogramme .éd. Maloine, Paris.
- Belyagoubi, L., 2006. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid, p 110.
- Ben Marzoug, H.N., Romdhane, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Abderraba, M., Khouja, M.L and Bouajila, J., 2011. *Eucalyptus oleosa* Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). *Molecules*, 16 (2): 1695-1709.
- Benabed, H.K., Gourine, N., Quinten, M., Bombarda, I and Yousfi, M., 2017. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Three Algerian *Lamiaceae* Species. *Nutrition and Food Science*, 13 (2): 97-109.
- Benayad, N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed Agdal. Rabat, p 63.
- Benbelaid, F ., Bendahou, M., Khadir, A., Abdoune, M.A., Bellahsene, C., Zenati, F., Bouali, W and Abdelouahid, D.E., 2012. Antimicrobial activity of essential oil of *Lavandula multifida* L.. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (2): 244–247.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bendif, H., Boudjeniba, M., Miara, M.D. Biqiku, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Quassinti, L., Vitali, L.A and Maggi, F., 2017. Essential Oil of *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria: Chemotypification and *in vitro* Biological Activities. *chemistry and biodiversity*, 14 (3).
- Bendif, H., Miara, M.D., Kalboussi, Z., Grauzdytė, D., Povilaitis, D., Venskutonis, R and Maggi, F., 2017. Supercritical CO₂ extraction of *Rosmarinus eriocalyx* growing in Algeria: Chemical composition and antioxidant activity of extracts and their solid plant materials. *Industrial Crops and Products*, 111: 768-774.
- Benelli, G., Pavela, R., Rakotosaona, R., Randrianarivo, E., Nicoletti, M and Maggi, F., 2017. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil from *Helichrysum faradifani* endemic to Madagascar. *Natural Product Research*, 3: 1-9.
- Benini, C., 2007. Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. *Mémoire d'ingénierat*. Université Gembloux, p 109.
- Benitez, G., Gonzalez-Tejero, M.R and Molero-Mesa, J., 2010. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 129: 87-105.
- 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. p : 17-59.
- Bentham, G and Hooker, J.D., 1873. *Compositae*. In *Genera Plantarum*, London: Reeve and Co, 2 (1): 163–533.
- Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, p.289.
- Bessah, R et Benyoussef, E., 2015. La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables*, 18 (3) : 513-528.
- Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J and Bernardini, A.F., 2001. Composition of *Helichrysum italicum* G. Don fil. subsp. *Italicum* essential oils from Corsica

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (France). *J Flav. Fragr*, 16: 30-34.
- Bianchini, A., Tomi, P., Morelli, I., Costa, J., Bernardini, A.F., Flaminii, G., Cioni, L., Usaï, M. and Marchetti, M., 2003. A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy), *J Flavour Fragr*, 18: 487-491.
- Billerbeck, V.G., 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux ATB. *Phytotherapie*, 5 :249-25.
- Bohlmann, F and Ates, N., 1984. Three prenylated flavanoids from *Helichrysum athrixiifolium*. *Phytochemistry*, 23 (6): 1338-1339.
- Bohlmann, F and Misra, L.N., 1984. New prenylflavanones and chalcones from *Helichrysum rugulosum*. *Planta Medica*, 50 (3): 271-272.
- Bohlmann, F and Zdero, C., 1980. Naturally occurring coumarins. 18. New obliquin derivatives from *Helichrysum serpyllifolium*. *Phytochemistry*, 19 (2): 331-332.
- Bohlmann, F and Zdero, C., 1983. Flavanones from *Helichrysum thapsus*. *Phytochemistry*, 22 (12): 2877-2878.
- Bohlmann, F. and Abraham, W.R., 1979. New prenylated flavanones from *Helichrysum hypocephalum*. *Phytochemistry*, 18 (11): 1851-1853.
- Bohlmann, F., Zdero, C and Ziesche, J., 1979. New flavones and phloroglucinol derivatives from *Helichrysum herbaceum* and *Helichrysum chrysargyrum*. *Phytochemistry*, 18 (8): 1375-1378.
- Boonruang, K., Kerddonfag, N., Chinsirikul, W., Mitcham, E.J and Chonhenchob, V., 2017. Antifungal effect of poly (lactic acid) films containing thymol and R-(-)-carvone against anthracnose pathogens isolated from Avocado and Citrus. *Food Control*, 78: 85-93.
- Boubakeur, H., Rebbas, K and Belhattab, R., 2017. Activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench. Pharmacognosie. *Phytothérapie*. pp: 1-11.
- Bouchachia, C., Benkaci-Ali, F., Eppe, G and Scholl, G., 2017. Effect of different parameters on composition of volatile components of *Myristica fragrans* seeds

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- extracted by hydrodistillation assisted by microwave and head-space solid-phase micro-extraction. *Journal of Essential Oil Research*, 29 (6): 481-493
- Bougatsosa, C., Ngassapab, O., Runyorob, D.K.B and Chinoua, I., 2004. Chemical Composition and in vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Helichrysum* Species from Tanzania. *Z Naturforsch*, 59 (5-6): 368-72.
- Bouguerra, N., Tine Djebbar, F and Soltani., N., 2017. Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. *IJMR*, pp : 37-42.
- Bouhdid, S., 2009. Activités antimicrobienne et antioxydant des huiles essentielles Application biotechnologique pour l'amélioration de la qualité des boyaux naturels, Doctorat National, Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences, Tétouan, Maroc.
- Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N and Chemat, F., 2010. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24 : 72-79.
- Bouyahya, A., Dakka, N., Talbaoui, A., Et-Touys, A., El-Boury, H., Abrini, J and Bakri, Y., 2017. Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). *Industrial Crops and Products*, 108 : 729-737.
- Bouzid, D., Nouioua, W., Soltani, E., De Haro, JP., Angeles, E.M and Zerroug, M., 2017. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25 (5): 780-787.
- Boz, I., Burzo, I., Zamfirache, M.M., Toma, C and Padurariu, C., 2009. Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, p : 36-39.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bremer, K., 1994. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland, Or: Timber Press, Incorporated.
- Bremnera, P., Riverab, D., Calzadoc, M.A., Obón, C., Inocencio, C., Beckwitha, C., Fiebiche, B.L., Munozc, E and Heinricha, M., 2009. Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *Journal of Ethnopharmacology*, 124 : 295–305.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec and Doc. Lavoisier* 3ème édition, Paris.
- Bruni, A., Ballero, M and Poli, F., 1997. Quantitative ethnopharmacological study of the Campidano Valley and Urzulei district, Sardinia, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 57: 97-124.
- Buchanan, B.B., Gruisse, W and Jones, R.L., 2000. Biochemistry & Molecular Biology of plants. *American Society of plant Physiologists*: Rockville, MA, p 1367.
- Burt, S., 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods— A Review, *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Carette, A.S., 2000. La lavande et son huile essentielle. In Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, p 289.
- Carini, M., Aldini, G., Furlanetto, S., Stefani, R and Facino, R.M., 2001. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 517-526.
- Carr, G.D., King, R.M., King, A., Powell, M and Robinson, H., 1999. Chromosome numbers in *Compositae* XVIII. *American Journal of Botany*, 86 (7): 1003-1013.
- Carrio, E and Valles, J., 2012. Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 1021-1040.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Carvalho, A.M., 2010. Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. Biblioteca de Ciencias 35. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Casiglia, S., Riccobono, L., Brunoa, M., Senatore, F and Senatore, F., 2015. Chemical composition of the essential oil from *Pulicaria vulgaris* var. *graeca* (Sch.-Bip.) Fiori (*Asteraceae*) growing wild in Sicily and its antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 30 (3): 259-67.
- Cassini, H., 1822. Inulées. In: Cuvier, F. (Ed.). Dictionnaire des Sciences Naturelles, ed. 2, vol. XXIII. Paris: Le Normant, pp : 559.
- Castillo, R.H., Stashenko, E and Close, J.E.D., 2017. Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33 (1): 25-35.
- Caude, M. et Jardy, A., 1996. Méthodes chromatographiques. Base documentaire : Techniques d'analyse, p 1445.
- Cavalli, J.F., Tomi, F., Bernardin, A.P and Casanova, J., 2006. Chemical variability of the essential oil of *Helichrysum faradifani* Sc. Ell. from Madagascar. *J Flavour Fragr*, 21: 111-114.
- Cavero, S., García-Risco, M., Marín, F., Jaime, L., Santoyo, S., Señorans, F., Reglero, G and Ibanez, E., 2006. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano Chemical and functional characterization via LC–MS and *in vitro* assays. *Journal of Supercritical Fluids*, 38: 62-69.
- Chao, S., Young, G., Oberg, C and Nakaoka, K., 2008. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23 : 444-449.
- Chaouche, T.M., Haddouchi, F., Zerhouni, K et Sidi-Yekhelef, A., 2016. Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits *d'Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre*. *Afrique. Science*, 12 (3):144-150.
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, N.S., Abert Vian, M., Allaf, T and Vorobiev, E., 2015 Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Analytical Chemistry*, 71: 157-168.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chenni, M., 2016. Thèse de Doctorat sur : Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic "*Ocimum basilicum L.*" extraite par hydro-distillation et par micro-ondes. These de Doctorat Université d'Oran 1 Ahmed BenBella. p 165.
- Chinou, I.B., Roussis, V., Perdetzoglou, D and Loukis, A., 1997 a. Chemical and biological studies on four *Helichrysum* species of Greek origin. In: Franz, Ch., Máthé, Á., Buchbauer, G., eds. Essential oils: basic and applied research. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, pp. 45-48.
- Chinou, I.B., Roussis, V., Perdetzoglou, D., Tzakou, O and Loukis, A., 1997 b. Chemical and antibacterial studies of two *Helichrysum* species of Greek origin. *Planta Med*, 63: 181-183.
- Chinou, I.B., Roussis, V., Perdetzolou, D. and Loukis A., 1996. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. *Planta Med*, 62: 339-377.
- Chowdhury, J.U., Mobarok, H., Bhuiyan, N.I and Nandi, N.C., 2009. Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*, 38 (2): 181-183.
- Chrysargyris, A., Panayiota, X., Botsaris, G and Tzortzakis, N., 2017. Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata L.*) affected by the potassium levels. *Industrial Crops and Products*, 103 : 202-212
- Chunyang, Z., Yang, C., Zeng, Y., Yang, Y., Chen, C., Yuan, B and Xuelan, O., 2017. GC-MS analysis and pharmacological activity study of the essential oil from *Allium cepa* L'ail *Allium sativum*. *Biochemical Pharmacology*, 139: 134.
- Conger, A.D and Fairchild, L., 1953. A quick-freeze method for making smears slides permanent., *Stain Technology*, 28 (6): 281-283.
- Constantin, E., 1996. Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec and Doc, Paris, p 279.
- Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S and Mariotti, M.G., 2009. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 125: 16-30.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Costa, A.A., Naspi, C.V., Lucia, A and Masuh, H.M., 2017. Repellent and Larvicidal Activity of the Essential Oil From *Eucalyptus nitens* Against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 3 (54): 670–676.
- Costa, P., Miguel Loureiro, J., Teixeira, M.A and Rodrigues, A.E., 2015. Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO₂ from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal, *Industrial Crops and Products*, 77: 680-683.
- Coste, H., 1937. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes. Ed. Albert Blanchard, Paris, pp. 317-9.
- Coté, E., Boucher, M.A., Pichette, A and Legault, J., 2017. Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines*, 4 (2): 34.
- Couic-Marinier, F et Lobstein, A., 2013. Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actual pharm*, 52 (525): 26-30.
- Couplan, F., 2009. Dictionnaire étymologique de botanique: comprendre facilement tous les noms scientifiques. Eds. Delachaux et Niestlé, Lausanne, Paris, p : 103-9.
- Cristofari,G., Znini, M., Majidi, L., Costa,J., Hammouti, B and Paolini, J., 2012. *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* Essential Oil as Environmentally Friendly Inhibitor on the Corrosion of Mil Steel in Hydrochloric Acid, *Int. J. Electrochem. Sci*, 7: 9024-9041.
- Cronquist, A., 1988. The evolution and classification of Flowering Plants (Second Edition). New York Botanical Garden, Bronx, New York. CL.
- Cronquist, A., 2001. Vascular Flora of the Southeastern United States: *Asteraceae*. UNC Press Books.
- Çubukçu B., 1976. Les dérivés flavoniques et coumariniques d'*Helichrysum orientale* (L.) Gaertner, *Plantes médicinales et phytothérapie*, 10 : 44-53.
- Çubukçu, B et Damadyan, B., 1986. Flavonoides d'*Helichrysum graveolens*, *Fitoterapia*, 57: 124-127.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Curado, M.A., Oliveira, C.B.A., Jesus, J.G., Santos, S.C., Seraphin, J.C and Ferri, P.H., 2006. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytotherapy*, 67 : 2363-2369.
- Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V and Tudela, J., 2017. Composition and Antioxidant, Antienzymatic and Antimicrobial Activities of Volatile Molecules from Spanish *Salvia lavandulifolia* (Vahl) Essential Oils. *Molecules*, 22 (8): 1382.
- Czajkowska, A., Gornowicz, A., PawBowska, N., Czarnomysy, R, Nazaruk, J., Szymanowski, W., Bielawska, A., and Krzysztof, B., 2017. Anticancer Effect of a Novel Octahydropyrazino [2,1-a:5,4-a'] diisoquinoline Derivative and Its Synergistic Action with *Nigella sativa* in Human Gastric Cancer Cells. *Bio Med Research International*. 13 p.
- Da Silva, R.R., Rodrigues, A.B., Farias, A.L., Simões, R.C., Pinheiro, M.T., Ferreira, R.M, Costa Barbosa, L.M., Picanço Souto, R.N., Fernandes, J.B., Santos, L.D and de Almeida, S.S., 2017. Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (*Lamiaceae*). *The Scientific World Journal*, 8 p.
- Dahmane, H., Dob, T., Krimat, S., Nouasri, A., Metidji, H and Ksouri, A., 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of medicinal plant *Ammodaucus leucotrichus* from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* 29 (1): 48-55.
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J.M and Imbert, C., 2008. In Vitro Activity of Terpenes against *Candida* Biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31 (6): 572–76.
- Dane, Y., Mouhouche, F., Canela-Garayoa, R and Delpino-Rius, A., 2016. Phytochemical Analysis of Methanolic Extracts of *Artemisia absinthium* L. (*Asteraceae*), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, (*Cupressaceae*) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arab J Sci Eng*, 41: 2147-2158.
- De Hoffmann, E., Charette J and Stroobant V., 1999. *Spectrométrie de Masse*, 2e édition, Librairie Dunod, Paris.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Degrelle, M., 2015. Les hélichryses (ou immortelles) en aromathérapie : zoom sur l'Hélichryse italienne corse. Université de Lorraine, Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, p 122.
- Degryse, A.C., Delpla, I and Voinier, M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87 p.
- Deleu, M., Vaca-Medina, G., Fabre, J.F., Roïz, J., Valentin, R and Moulongui, Z., 2010. Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80 (2): 125-132.
- Demir, A., Taban, B.M., Aslan, M., Yesilada, E. and Aytac, S.A., 2009. Antimicrobial effect of *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum*. *Pharmaceutical Biology*, 47 (4): 289-297.
- Demirbaş, A and Kara, H., 2006. New options for conversion of vegetable oils to alternative fuels. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 2 (7): 619-26.
- Demircia, B., Yusufoglu, H.S., Tabanca, N, Temel, H.E., Bernier, U.R., Agramonte, N.M., Alqasoumi, S.I., Al-Rehaily, A.J., Başer, K.H.C and Demirci, F., 2017. *Rhanterium epapposum* Oliv. essential oil: Chemical composition and antimicrobial, insect-repellent and anticholinesterase activities. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25 (5): 703-708.
- Desjobert, J.M., Bianchini, A., Tommy, P., Costa, J. et 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.
- Dewet, J.M.J., 1980. Origins of polyploids. In: *Polypliody, Biological Relevance* (ed. Lewis WH), Plenum Press, New York. pp: 3-16.
- Dhouiouia, M., Boulilaa, A., Chaabanea, H., Zinac, M.S and Casabianca, H., 2016. Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L.ssp. *paucinervis* Batt. (*Aristolochiaceae*) roots and its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 83: 301-306.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Di Novella, R., Di Novella, N., De Martino, L., Mancini, E and De Feo, V., 2013. Traditional plant use in the National Park of Cilento and Vallo di Diano, Campania, Southern, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 145: 328-342.
- Dib, I., Fauconnier, M.L., Sindic, M., Belmekki, F., Assaidi, A., Berrabah, M., Mekhfi, H., Aziz, M., Legssyer, A., Bnouham, M and Ziyyat, E., 2017. Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17 (1): 82.
- Didry, M., Dubreuil, L and Pinkas, M., 1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 69 (1): 25-28.
- Dif, M.M.F., Benali Toumi, H ., Boukaaza, F., Mokaddem, M and Bouazza, B.S., 2016. Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Artemisa herba-alba*, A Medicinal Plant from Algerian Arid Zone. *Phytothérapie*, pp: 1-5.
- Dou, C., Zhang, B., Han, M., Jin, X., Sun, L and Li, T., 2017. Anti-tumor activity of polysaccharides extracted from *Senecio scandens* Buch, Ham root on hepatocellular Carcinoma. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research January*, 16 (1): 43-49.
- Drewes, S.E., Mudau, K.E., Van Vuuren, S.F. and Viljoen, A.M., 2006. Antimicrobial monomeric and dimeric diterpenes from the leaves of *Helichrysum tenax* var *tenax*. *Phytochemistry*, 67 (7): 716-722.
- Dubravka, J., Stević, T.R., Janković, T.R., Noveski, N.B., Radanović, D.S., Pljevljakušić, D.S and Djurić, Z.R., 2017. Antimicrobial activity of *Helichrysum plicatum* DC. *Hemijnska industrija*, 71 (4): 337-342
- Dzoyem, J.P., Nkuete, A.H.L., Ngameni, B and Eloff, J.N., 2017. Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from *Polygonum* and *Dorstenia* species. *Archives of Pharmacal Research*, 40 (10): 1129–1134.
- Echazú, M.I.A., Olivetti, C.E., Anesini, C., Perez; C.J., Alvarez, G.S and Desimone, MF., 2017. Development and evaluation of thymol-chitosan hydrogels with

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- antimicrobial-antioxidant activity for oral local delivery. *Materials Science and Engineering*, 81: 588-596.
- Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*. 21: 308-323.
- El Ajouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amarti, F and Aberchane, M., 2008. Activité antifongique des huiles essentielles de Thymus bleicherianus Pomel et Thymus capitatus (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12 (4) : 345-351.
- El gadi, A.A., 1994. Usage of some plants in Libyan Folk– medicine, part two. 2nd edition. Dar Al-Hekma for printing, distribution and advertisement, Tripoli-Libya.
- El-Dahmy S.I., 1994. Further benzofuran derivatives and the antiinflammatory activity of *Helichrysum stoechas* (L.) grown in Libya. *J Pharm Sci*, 2: 73-80.
- Elgendi, E.M., Ibrahim, H.S., Elmeherry, H.F., Sedki1, A.G and Mekhemer, F.U., 2017. Chemical and Biological Comparative *in Vitro* Studies of Cinnamon Bark and *Lemon Peel* Essential Oils. *Food and Nutrition Sciences*, 8: 110-125.
- Elkiran, O., Eyup, B and Harun, E., 2013. Composition of the Essential oil of Endemic *Helichrysum noeanium* Boiss. (*Asteraceae*) Growing Wild in Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 25 (14): 7949-7951.
- Endrias, A., 2006. Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à *l'Hibiscus sabdariffa L.* et à *l'Artemisia annua*. Thèse N° 2340, Docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse.
- Engler, A., 1964. Syllabus der Pflanzen familien Gebrüder Borntraeger, Berlin-Nikolassee, Band, 2: 489.
- Esmaeili, A., 2013. Biological activities and chemical composition of the stems and roots of *Helichrysum oligocephalum* DC grown in Iran. *Pak J Sci*, 26 (3): 599-604.
- Ezzat, S.M., .Ezzata, I.M., Okba, M.M., Menze, T.E and Abdel-Naim, A.B., 2017. The hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale*Rosc.) potent *in vivo* and *in*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- vitro* anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 214 (25): 113-123.
- Faozia A. Ibrahim, Ateea Ali Bellail and Abubaker M., 2017. Hamad. Screening of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Native Plants in El-Jabal El-Akhdar Province – Libya. *Ijsrm.Human*, 5 (4): 79-94.
- Farmer, H.J et Moore, J.E.S., 1905. On the meiotic phase in animais and plants.
- Febles R., 1989. Estudios en la flora Macaronésica: algunos números de cromosomas VI. Botánica Macaronésica, 17: 57-71.
- Felhi, S., Chaaibia, M., Bakari, S., Ben Mansour, R., Békir, A., Gharsallah, N and Kadri, A., 2017. Anti-microbial screening and cytotoxic activity of aerial part of *Thymelaea hirsuta* L. essential oil growing in south-west Tunisia. Pak. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30: 087-091.
- Ferhata, M., Erolb, E., Beladjilaa, K.Y., Cetintas, Y., Durua, M.E., Ozturkb, M., Kabouchea, A and Kabouchea, Z., 2016. Antioxidant, anticholinesterase and antibacterial activities of *Stachys guyoniana* and *Mentha aquatica*. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1): 324-329.
- Festy D., 2008. Aromatherapie: Je me soigne avec les huiles essentielles, Pratiques Efficaces et Faciles, Ed Leduc, p : 6-20.
- Firouznia, A., Akbari, M.T., Rustaiyan, A., Masoudi, S., Bigdeli, M., and Tabatabaei Anaraki, M., 2007. Composition of the essential oils of *Artemisia turanica* Krasch., *Helichrysum oocephalum* Boiss. and *Centaurea ispananica* Boiss. three asteraceae herbs growing wild in Iran, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 10 (2): 88-93.
- Fischetti, F.J., 2010. *Flavoring Materials*, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- Formisano, C., Mignola, E., Rigano, D., Senatore, F., Nelly, A., Bruno, M and Rosselli, S., 2009. Constituents of Leaves and Flowers Essential Oils of *Helichrysum pallasii* (Spreng.) Ledeb. Growing Wild in Lebanon. *J Med Food*, 12 (1): 203–207.
- France-Ida, J., 1996. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info essence. 3: 5-6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Franchomme P, Jollois R, Penoel D. *L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques.* 1e éd. Paris : Roger Jollois, 2007. p 490.
- Fraternale, D., Flamini, G and Ricci, D., 2016. Essential oil composition of *Angelica archangelica* L. (Apiaceae) roots and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Plant Biosystems*, 150 (3) : 558-563.
- Funk, V.A., Randall, J.B, Keeley, S.C., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, L.J., Baldwin, B.G., García-Jacas, N., Sussana, A and Jansen, R.K., 2005. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol. Skr.* 55: 343–373.
- Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F and Robinson, H., 2009. Classification of Compositae . Systematics, evolution, and biogeography of *Compositae*, 171-92.
- Gakuubi, M.M., Wagacha, J.M., Dossaji, S.F and Wanzala, W., 2016. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *International Journal of Microbiology* , 9 p.
- Galbany-Casal, M., Garcia-Jacas, N., Sáez, L., Susanna, A and Benedí, C., 2009. Phylogeny, biogeography and character evolution in Mediterranean Asiatic and Macaronesian *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) inferred from nuclear phylogenetic analyses. *International Journal of Plant Science*, 170: 365-380.
- Galbany-Casals, M and Romo, A., 2008. Polyploidy and new chromosome counts in *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae), *Botanical Journal of the Linnean Society*, 158: 511-521.
- Galbany-Casals, M., Unwin, M., Garcia-Jacas, N., Smissen, R.D., Susanna, A and Bayer, R.J.., 2014. Phylogenetic relationships in *Helichrysum* (Compositae: Gnaphalieae) and related genera: Incongruence between nuclear and plastid phylogenies, biogeographic and morphological patterns, and implications for generic delimitation Phylogenetic incongruence in *Helichrysum*, pp: 608-624.
- Ganiyu, O., Ayokunle, O.A., Tolulope, A.O., Tosin, A.O., Adedayo, O.A and Adenike, C.A., 2017. Insecticidal activity of essential oil from orange peels (*Citrus sinensis*) against *Tribolium confusum*, *Callosobruchus maculatus* and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sitophilus oryzae and its inhibitory effects on acetyl cholinesterase and Na⁺/K⁺-ATPase activities. *Phytoparasitica*, 45 (4): 501–508.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A and Fernández-Gutiérrez, A., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15 (12): 8813-26.
- Garnéro J., 1996. Huiles essentielles. *Techniques de l'Ingénieur*, traité Constantes physicochimiques, (39) : 345-351.
- Garnéro, J., 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*, Paris, France, p : 2-20.
- Gaussin, H et Leroy, F., 1982. Précis de botanique (Végétaux supérieurs), 2ème édition, p : 424-426.
- Gershenson, J and Croteau, R., 1993. Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In: Moore TS Jr, editor. *Lipid Metabolism in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, p: 339–388.
- Ghassemi-Dehkordi, N., Sadeghi, M., Kaviani, M.R and Zolfaghari, B., 2015. Analysis of *Helichrysum oligocephalum* DC. essential oil. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2 (1): 47-52.
- Ghuestem, A., Seguin E., Paris, M et Orecchioni, A.M., 2001. Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, -Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
- Giovannini, A., Mascarello, C., Pipino, L and Nostro, A., 2008. Agrobacterium rhizogene-Mediated Transformation in Mediterranean *Helichrysum*. *Transgenic Plant Journal*, 1 (2): 54-56.
- González-Tejero, M.R., 1989. Investigaciones Etnobotánicas en la provincia de Granada. PHD Thesis, University of Granada, Granada. Greek origin. *Planta Med*, 63:181-183.
- Gouveia-Figueira, S.C., Gouveia, C.C., Carvalho, M.J., R.A., Nording, M.L. and Castilho, PC., 2014. Antioxidant capacity, cytotoxicity and antimycobacterial activity of Madeira archipelago endemic *Helichrysum* dietary and medicinal plants. *Antioxidants*, 3 (4): 713-729.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Govindarajan, M., Kadakunnan, S., Alharbi, N.S and Benelli, B., 2016. Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. (*Lamiaceae*) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (22): 23228–23238.
- Grysole, J., 2004. La commercialisation des huiles essentielles. Manuel pratique des huiles essentielles: de la plante à la commercialisation. p : 139-141.
- Guarino, C., De Simone, L and Santoro, S., 2008. Ethnobotanical study of the *Sannio* Area, Campania, Southern Italy. *Ethnobotany Research and Applications*, 6: 255-317.
- Guenane, H., Gherib, A., Boulanouar, B., Carbonell-Barrachina, A.A., Hernández, F and Cano-Lamadrid, M., 2017. Antioxidant capacity, mineral content and essential oil composition from select Algerian medicinal plants. *Scientific Study and Research*, 18 (3): 275-289.
- Guichard, E., 2002. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18: 49-70.
- Guignard, J.L., 1983. *Abrégé de botanique*, Masson, 5 ème édition, Paris, p 259.
- Guignard, J.L., 1994. Abrégé botanique. Ed Masson, Paris, p 276.
- Guignard, J.L., 2000. Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, p : 177-185.
- Guignard, J.L., Cosson, L. et Henry, M., 1985. Abrégé de phytochimie. Ed. Masson Paris, p : 155-174.
- Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., Xiang, H., Deng, X and Yu, L., 2009. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1074–1079
- Haddouchi, F., Chaouche, T.M., Ksouri, R., Medini, F., Sekkal, F.Z and Benmansour, A., 2014. Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*. *Chin. J. Nat. Med.*, 12: 415-422.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Haddouchi, F., Zerhouni, K., Sidi-Yekhelef, A and Chaouche, T.M., 2016. Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85: 152-159.
- Hadian, M., Rajaei, A., Mohsenifar, A and Tabatabaei, M., 2017. Encapsulation of *Rosmarinus officinalis* essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against *Salmonella typhimurium* during refrigerated storage. *LWT Food Science and Technology*, 84 : 394-401.
- Hahlbokck, K and Scheel, S., 1989. Physiology and molecular biology phénylpropanoid metabolism. Annu. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40 : 347-369.
- Hailu, Y.M., Atlabachew, M., Chandravanshi, B.S and Redi-Abshiro, M., 2017. Composition of essential oil and antioxidant activity of Khat (*Catha edulis Forsk*), *Chemistry International*, 3 (1): 25-31.
- Haimoud, S.F., Allem, R and Abdiaziz, M., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory properties of widely consumed date palm (*Phoenix Dactylifera L.*) fruit varieties in Algerian oases. *Journal of Food Biochemistry (ISSN)*, 1745-4514.
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N and Kadri, A., 2016. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 95 : 86-94
- Hamdan, D.I., Al-Gendy, A.A and El-Shazly, A.M., 2016. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of the Essential Oils of *Schinus molle* Growing in Egypt. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 8 (8): 779-793.
- Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O and Usman, L.A., 2011. Essential Oils: Its Medicinal and Pharmacological Uses. *International Journal of Current Research*, 3: 086–098.
- Hanáková, Z., Hošek, J., Kutil, Z., Temml, V., Landa, P., Vaněk, T., Schuster, D., Dall'Acqua, S., Cvačka, J., Polanský, O and Karel, Š., 2017. Anti-inflammatory Activity of Natural Geranylated Flavonoids: Cyclooxygenase and Lipoxygenase

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Inhibitory Properties and Proteomic Analysis. *Journal of Natural Products*, 80 (4) : 999–1006.
- Hazzit, M., 2002. Arômes alimentaires. Thèse magister, USTHB, Alger., 96 p.
- Heath, H.B., 1981. ‘*Source Book of Flavors*’, Springer, XXVI, 864 p.
- Hellali, N., Hadj, M.M and Masrouk, H., 2017. Physico-Chemical Study and Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Artemisia judaica* L. Essential Oil, Growing in Illizi, Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 29: 181-186.
- Hettiarachichi, D.S., 2008. Volatile oil content determination in the Australian sandalwood industry: Towards a standardised method. *Sandalwood Research Newsletter*, 23: 1-4.
- Heywood, V.H., 1985. *Las plantas con flores*. Ed. Reverté. España, p 329.
- Hilliard, O.M., 1983. Asteraceae. Inuleae, Gnaphaliinae (first part). In: Leistner OA [ed.]. *Flora of southern Africa*, 33: 61-310.
- Homayounia, H., Kavoosi, G and Nassiri, S.M., 2017. Physicochemical, antioxidant and antibacterial properties of dispersion made from tapioca and gelatinized tapioca starch incorporated with carvacrol. *Food Science and Technology*, 77: 503-509
- Hongping, X., Lanyue, Z., Zhiwen, Y., Chen, F., Zheng, X and Liu, X., 2017. Chemical compositions, antioxidative, antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activities of *Curcuma aromatic* Salisb essential oils. *Industrial Crops and Products*, 108: 6-16.
- Huang, 1987. Perfumer and flavorist, Vol. 13, 67 p.
- Hui, L., Yongqiang, C., Zhijun, P., Tao, L and Yang, S., 2014. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chemistry Central Journal*, 8 (1):1.
- Hussain, A.J., Chatha, S.A., Kamal, G.M., Ali, M.A., Hanif, M.S and Lazhari, M.I., 2017. Chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Ocimum sanctum*. *International Journal of Food Properties*, 20 (7) : 1569-1581.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hussein, H.S., Salem, M.Z.M and Soliman, A.M., 2017. Repellent, attractive, and insecticidal effects of essential oils from *Schinus terebinthifolius* fruits and *Corymbia citriodora* leaves on two whitefly species, *Bemisia tabaci*, and *Trialeurodes ricini*. *Scientia Horticulturae*, 216 (14): 111-119.
- Hussein, S.R., Marzouk, M.M., Soltan, M.M., Ahmed, E.K., Said, M.M and Hamed, A.R., 2016. Phenolic constituents of *Pulicaria undulata* (L.) C.A. Mey. subsp. *undulata* (Asteraceae): Antioxidant protective effects and chemosystematic significances. *Journal of food and drug analysis* xxx.
- Hwisa, N., Auzi, A., Parvez, N., Molvi, K and Sherif, F., 2011. Antinociceptive effect of *Helichrysum stoechas* in experimental animals. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2: 24-27.
- ISO, 1997. Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle - Vocabulaire, 2 p.
- Ivanovic, J., Ristic, M and Skala, D., 2011. Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material, *J. of Supercritical Fluids*, 57: 129–136.
- Jack, A.R., Norris, P.L., F.J and Storrs, F.J., 2013. Allergic contact dermatitis to plant extracts in cosmetics. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 32: 140–46.
- Jahier, J., Chevre, A.M., Eber, F., Delourme, R et Tanguy, A.M., 1992; Technique de cytogénétique végétale., INRA, Paris, p 181.
- Jakupovic, J., Kuhnke, J., Schuster, A., Metwally, M.A and Bohlmann, F., 1986. Phloroglucinol derivatives and other constituents from South African *Helichrysum* species. *Phytochemistry*, 25: 1133-1142.
- Jakupovic, J., Pathak, V.P., Bohlmann, F., King, R.M and Robinson, H., 1987. Obliquin derivatives and other constituents from Australian *Helichrysum* species. *Phytochemistry*, 26: 803-807.
- Jakupovic, J., Schuster, A., Bohlmann, F., Ganzer, U., King, R.M and Robinson, H., 1989. Diterpenes and other constituents from Australian *Helichrysum* and related species, *Phytochemistry*, 28: 543-551.
- Jardak, M., Elloumi-Mseddi, J., Aifa, S and Mnif, S., 2017. Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- officinalis* L. essential oil from Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, 16 (1): 190.
- Jassbi, A.R., Omidreza, F., Miri, R., Salhei, S., Zare, S., Zare, M., Masroorbabanari, M., Chandran, J.N., Schneider, B and Baldwin, I.T., 2016. Cytotoxic activity and chemical constituents of *Anthemis mirheydari*. *Pharmaceutical Biology*, ISSN: 1388-0209 (Print) 1744-5116 (Online).
- Jouhanneau, D.G., 1991. La médecine des plantes aromatiques: Phyto-aromathérapie et les huiles essentielles de l'océan indien, *Azalées Editions*, St Denis, p 153.
- Joulain, D and König, W.A., 1998. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E. B.-Verlag, Hamburg.
- Judd, W.S, Campbell, C.S, Kellogg, E and Stevens, P.F., 1999. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Jun-Hyung, T and Murray, B.I., 2015. Enhanced Cuticular Penetration as the Mechanism for Synergy of Insecticidal Constituents of Rosemary Essential Oil in *Trichoplusia Ni*. *Scientific Reports*, 5: 12690.
- Kamdem, S.K., Modeste, L.S., Dongmo, P.M.J., Boyom, F.F., Bakargna-Via, I., Fokou, J.B.H., Tsague, I.F.K., Menkem, E.Z., Zollo, P.H.A and Chantal, M., 2015. Antiradical, Anti-inflammatory and Antifungal Activities of Essential Oils of Two Aromatic Plants: *Apium graveolens* (Apiaceae) and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). *Journal of Life Sciences*, 9: 51-64.
- Karioti, A, Vrahimi-Hadjilouca, T, Droushiotis, D, Rancic, A, Hadjipavlou-Litina, D and Skaltsa, H., 2006. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med*. 72: 1330-1334.
- Kaufmann, B and Christen, P., 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal*, 13 (2): 105-13.
- Kchaou, W., Abbès, F., Ben Mansour, R., Blecker, C., Hamadi, A and Besbes, S., 2016. Phenolic profile, antibacterial and cytotoxic properties of second grade date extract from Tunisian cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chemistry*, 194: 1048-1055.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khalife, R., Hodroj, M.H., Fakhoury, R and Thymoquinone, R., 2016. From *Nigella sativa* Seeds Promotes the Antitumor Activity of Noncytotoxic Doses of Topotecan in Human Colorectal Cancer Cells in Vitro. *Planta Media*, 82 (4): 312-321.
- Khia, A., Ghanmi, M, Satrani, B., Aafi, A., Aberchane, M., Quaboul, B., Chaouch, A., Amusant, N and Charrouf, Z, 2014. Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc. *Phytothérapie*, 12 (6): 341–347.
- Kim, K.J and Jansen, R.K., 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 10-379.
- Kladar, N.V., Anackov, G.T., Rat, M.M., Srdenovic, B.U., Grujic, N.N., Sefer, E.I. and Bozin, B.N., 2015. Biochemical characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don subsp. *italicum* (Asteraceae) from Montenegro: Phytochemical screening, chemotaxonomy, and antioxidant Properties. *Chemistry and Biodiversity*, 12: 419-431.
- Kolayli, S., Sahin, H., Ulusoy, E. and Tarhan, O., 2010. Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichrysum plicatum*. *Journal of Biology and Chemistry*, 38 (4): 269-276.
- 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 (18): 8788-8795.
- Kovàts, E., 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv Chromatogr*, 7: 229–47.
- Kovats, E., 1965. In Advances in Chromatography. Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System, Chap. 7 : 229-247.
- Kubo, I and Morimitsu, Y., 1995. Cytotoxicity of Green Tea Flavor Compounds against Two Solid Tumor Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (6): 1626–28.
- Kurkin, V.A., 2003. *Chem. Nat. Compd*, 39: 123.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Labib, R.M., Youssef, F.S., Ashour, M.L., Abdel-Daim, M.M and Ross, S.A., 2017. Chemical Composition of *Pinus roxburghii* Bark Volatile Oil and Validation of Its Anti-Inflammatory Activity Using Molecular Modelling and Bleomycin-Induced Inflammation in Albino Mice. *Molecules*, 22 (9) :1384.
- Lafferty, F.W and Michnowicz, J.A., 1992. State-of-the-art GC-MS, *Chemtechnology*, p: 182- 189 .
- Lafferty, M.C and Stauffer, D.B., 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10 d. Palisade Co., Newfield
- Lahlou, M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18 : 435-448.
- Lall, N., Hussein, A.A and Meyer, J.J.M., 2006. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. *Fitoterapia*, 77 (3): 230-232.
- Lamarti, A., Badoc, A., Deffileux, G., et Carde, J.P., 1994. Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133: 69-78.
- Latorre, J.A., 2008. Estudio etnobotánico de la provincia de La Coruña. PhD Thesis, University of Valencia, Valencia.
- Lawal, O.A., Isiaka, A.O., Kasali, A.A., Opoku, A.R and Adebola, O.O., 2015. Chemical Composition, Antibacterial and Cytotoxic Activities of Essential Oil from the Leaves of *Helichrysum odoratissimum* grown in South Africa. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18 (1): 236-241.
- Le Hir, A., Chaumeil, J.C and Brossard, D., 2009. Pharmacie Galénique: Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments', Elsevier Masson, 382 p.
- Leite, M.C.A., de Brito Bezerra, A.P., de Sousa, J.P and de Oliveira Lima, E., 2015. Investigating the Antifungal Activity and Mechanism(s) of Geraniol against *Candida Albicans* Strains. *Medical Mycolog*, 53 (3): 275–84.
- Leonardi, M., Ambrysiewska, K.E., Melai, B., Flamini, G., Cioni, P.L., Parri, F and Pistelli, L., 2013. Essential-oil composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). *Chemistry and Biodiversity* 10: 343-355.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Levin, D.A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*, 122 : 1-25.
- Li, T.C., Mündel, H.H. et International Plant Genetic Resources Institute., 1996. *Safflower Carthamus Tinctorius L.* Rome, Italy: IPGRI.
- Lieutaghi, P., 2006. Petite ethnobotanique méditerranéenne. Ed. Actes Sud, Arles (Bouches-du- Rhône), p : 159-163.
- Lis-Balchin, M., 2002. Geranium and pelargonium: the genera *Geranium* and *Pelargonium*. CRC Press, Taylor & Francis, London. p. 116-131, 147-165, 184-217.
- Litvinenko, V.I., Popova, P., Popova, N.V and Bubenchikova, V.N., 1992. Medicinal plants and preparations derived from them. *Farmaseotychnyi Zhurnal*, 53: 83–84.
- Lloyd, H.A., Evans, S.L and Fales, H.M., 1978. Terpene Alcohols of *Helichrysum dendroideum* II. *Tetrahedron Lett*, 41 (5): 494-496.
- Lobstein, A., Rey, M.L et Anton, R., 1983. Altérations et conservation des huiles essentielles. *Ann. Pharm*, 41 (1): 69-75.
- Longevialle P., Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, 1981, p 208.
- Lourens, A., Viljoen, A. and Van Heerden, F., 2008. South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 630-650.
- Lourens, A.C., Reddy, D., Baserb, K.H., Viljoena, A.M and Van Vuuren, S.F., 2004. In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95: 253–258.
- Lourens, A.C.U., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Davids, H and Van Heerden, F.R., 2011 Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of selected South African *Helichrysum* species. *South African Journal of Botany*, 77: 229-235.
- Lubbe, A and Verpoorte, R., 2011. Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants for Specialty Industrial Materials. *Industrial Crops and Products*, 34 (1): 785-801.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lucchesi, M.E., 2005. Thèse sur: Extraction sans solvant assistée par Microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, Thèse d'Université de la Réunion, 146 p.
- Lucchesi, M.E., Chemat, F and Smadja, J., 2004. An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices. *Flavour and Fragrance Journal*, 19 (2) : 134–138.
- Luna, A, Lema-Alba, R.C., Dambolena, J.S., Zygadlo, J.A., Labaque, M.C and Marin, R.H., 2017. Thymol as natural antioxidant additive for poultry feed: oxidative stability improvement. *Poultry Science*, 96 (9): 3214–3220.
- Luque, A.F., Miranda, A.G., Conejo, A.J., Cabello, E.R., Munoz, E.C.T., Campana, J.A.G., Pérez, J.A.P., Montes, J.C., Najarro, J.F.S., Osuna, J.R.M., Rodríguez, M.M., Moral, M.D.M., Ramírez, M.J.M., Montes, R.M and Navas, R.H., 1998. Etnobotánica del subbético cordobés. Recupera tus tradiciones. Taller de etnobotánica.
- Maffeir, M and Sacco, T., 1987. Perfumer and flavorist. 13: 61.
- Majouli, K., Hamdi, A., Msaada, K and Kenani., A., 2016. A bioactivity guided study on the antibacterial activity of *Hertia cheirifolia* L. extracts. *Microbial Pathogenesis*, pp: 1-6.
- Manayi, A., Saeidnia, S., Faramarzi, M., Samadi, N., Jafari, S., Vazirian, M., Ghaderi, A., Mirnezami, T., Hadjiakhoondi, A., Ardekani, M and Khanavi, M., 2013. A Comparative Study of Anti-Candida Activity and Phenolic Contents of the Calluses from *Lythrum Salicaria* L. in Different Treatments. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170 (1): 176–84.
- Mancini, E., De Martino, L., Marandino, A., Scognamiglio, M.S and De Feo, V., 2011. Chemical Composition and Possible *in Vitro* Phytotoxic Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *Italicum*, *Molecules*, 16: 7725-7735.
- Mann J., 1987. Secondary metabolism. Second edition, Clarendon press, Oxford, p 374.
- Mantle, D, Anderton, J G, Falkous, G, Barnes, M, Jones, P and Perry, E K., 1998. Comparison of methods for determination of total antioxydant status: application

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121: 385-391.
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I.E., Daglia, M., Nabavi, S.F., Izadi, M., Abdollahi, S.M and Ajami, M., 2017. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43 (6): 668-689.
- Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L and Quindós., G., 2011. In Vitro Activities of Natural Products against Oral Candida Isolates from Denture Wearers. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11 (1): 119.
- Mary Helen, P.A., Vargheese, T.A., Jeeja Kumari, J.J., Abiramy, M.R., Sajina, N and Jaya Sree, S., 2012. Phytochemical Analysis and Anticancer Activity of Essential Oil from *Myristica fragrans*. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 2 (4) : 188-198.
- Marzoukia, H., Elaissib, A., Khaldic, A., Bouzidd, S., Falconerie, D., Marongiu, B., Pirasa, A and Porcedda, S., 2009. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, 2: 86-91.
- Masada, Y., 1976. Analysis of essential oils by Gas chromatography and Mass spectrometry, Halsted, Nueva York, 334 p.
- Mashigo, M., Combrinck, S., Regnier, T., Du Plooy, W., Augustyn, W and Mokgalakaa, N., 2015. Chemical variations, trichome structure and antifungal activities of essential oils of *Helichrysum splendidum* from South Africa. *South African Journal of Botany*, 96: 78-84.
- Mastelic, J., Politeo, O and Jerkovic, I., 2008. Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Determination of ester bonded acids and phenols. *Molecules*, 13: 795-803.
- Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I and Radosevic, N., 2005. Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chemistry of Natural Compounds*, 41: 35-40.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in the majority of angiosperms. *Science*, 264: 421-424.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Matić, I.Z., Aljančić, I., Žižak, Z., Vajs, Z., Jadranin, M., Milosavljević, S and Juranić, Z.D., 2013. In vitro antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. *Complementary and Alternative Medicine*, 13: 27.
- Meeran, M.F.N., Javed, H., Al Taee, H., Azimullah, S and Shreesh, K.O, 2017. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front. Pharmacol*, 8: 380.
- Mehmet, N.İ., İsa, T and Mahfuz, E., 2017. Variation in essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum L.*) varieties cultivated in two different ecologies. *Journal of Essential Oil Research*, 29 (6): 494-498.
- Melito, S., Petretto, G.L., Podani, J., Foddai, M., Maldini, M., Chessa, M and Pintore, G., 2016. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp.*microphyllum* essential oils composition, *Industrial Crops and Products*, 80: 242–250.
- Merxmüller, H., Leins, P and Roessler, H., 1977. *Inuleae*—systematic review. In: Heywood, V.H., Harbone, J.B and Turner, B.L. (Eds.). The biology and chemistry of the Compositae, vol. I. London: Academic Press, pp: 577.
- Mezzitti, T., Orzalesi, G., Rossi, C. and Bellavita, V., 1970. New triterpenoids lactone, α - amyrin and uvaol from *Helichrysum italicum*. *Planta Medica*, 18 (4): 326-31.
- Miguel, M.G., 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils. *Molecules*, 15 (12): 9252-9287.
- Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A and Chaieb, K., 2017. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial Pathogenesis*, 104: 56-63.
- Miliani, A., Boukhatem, M.N and Saidi, F., 2017. Chemical composition and Antimicrobial Activity of the Algerian *Laurus nobilis* Essential oil, *Algerian Journal of Natural Products*, 5 (2): 507-514.
- Millet, F., 2010. Les Formes Galéniques et les Huiles Essentielles. *Phytothérapie*, 8 : 33–36.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mimica-Dukić, N., Biljana, B., Soković, M., Mihajlović, B and Milan, M., 2003. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Med*, 69 (5): 413-419
- Minooeianhaghighi, M.H., Sepehrian, L and Shokri, H., 2017. Antifungal effects of *Lavandula binaludensis* and *Cuminum cyminum* essential oils against *Candida albicans* strains isolated from patients with recurrent *vulvovaginal candidiasis*. *Journal de Mycologie Médicale*, 27 (1): 65-71.
- Moghimi, R., Aliahmadi, A., McClements, D.J and Rafati, H., 2017. Nanoemulsification of *Salvia officinalis* Essential Oil; The Impact on the Antibacterial Activity in Liquid and Vapour Phase. *Journal of Bionanoscience*, 11 (1): 80-86.
- Mohamed, N.A.B., 2005. Study on important parameters affecting the Hydro-distillation for ginger oil production. Master Thesis, Universiti Teknologi Malaysia, p 172.
- Mohammad, S., Abu-Darwish and Abu-Dieyeh, Z.H.M., 2009. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11 (1): 59-63.
- Mohammedi, Z and Fouzia, A., 2007. Pouvoir fongistatique de l'huile essentielle d'une plante aromatique sur la croissance des champignons. Université Abou Bakr Belkaïd –Tlemcen, Algérie. 3 p.
- Morcia, C., Malnati, M and Terzi., V., 2012. *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants*, 29 (3): 415-422.
- Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabbeta, W and Blanco, A., 2010. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Ind. Crop. Product.*, 32: 639-649.
- Morshedloo, M.R., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, M.G and Maggi, F., 2017. Chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity on tumour cells of

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- the essential oil from flowers of *Magnolia grandiflora* cultivated in Iran. *Natural Product Research*, 31 (24): 2857-2864.
- Mulet, L., 1991. Estudio etnobotánico de la provincia de Castellón. Diputación de Castellón, Castellón, Spain.
- Muyima, N.Y.O., Zulu, G., Bhengu, T and Popplewell, D., 2002. The Potential Application of Some Novel Essential Oils as Natural Cosmetic Preservatives in an Aqueous Cream Formulation, *Flavour and Fragrance Journal*, 17 (4): 258-266.
- Nabet, N., Boudries, H., Loupassaki, S., Souogui, S., Madani, K and Carbonell-Barrachina, Á.A., 2017. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. and *Origanum glandulosum* Desf. essential oils. *International Food Research Journal*, 24 (6): 2518-2525.
- Nagababu, E and Lakshmaiah, N., 1992. Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 43 (11): 2393-2400.
- Namur, C et Verlaque, R., 1976. Contribution à l'étude biogéographique du genre *Helichrysum* Miller. Annuaire de l'Université de Provence. *Biologie et Écologie Méditerranéenne*, 3: 17-22.
- Naqvi, A., Malasoni, R., Gupta, S., Srivastava, A., Pandey, R.R and Dwivedi, A.K., 2017. *In Silico* and *In Vitro* Anticancer Activity of Isolated Novel Marker Compound from Chemically Modified Bioactive Fraction from *Curcuma longa* (NCCL). *Pharmacognosy Magazine*, 13 (3): 640-644.
- Natalija, A., Bogdanov, J and Kungulovski, D., 2017. *In Vitro* Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Two Essential Oils and Eugenol from Flower Buds of *Eugenia caryophyllata*. *Open Biological Sciences Journal*, 3: 16-25.
- Nebojsa, V., Kladar, G., Anackov, T., Milica M. Rat, Branislava U. Srdenovic, Nevena N. Grujic, Emilia I. Sefer, I and Bozin, B.N., 2015. Biochemical Characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G.Don subsp. from Montenegro: Phytochemical Screening, Chemotaxonomy, and Antioxidant Properties. *Chemistry and Biodiversity*, 12 (3): 419-31.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Negreiros, M.O., Pawlowski, A., Soares, G.L.G., Motta, A.S and Frazzon, A.P.G., 2016. In vitro antimicrobial activity of essential oils from *Heterothalamus* Less. (*Asteraceae*) against clinically relevant bacterial and fungal species. ISSN, pp: 1980-4849 (on-line) / 1679-2343 (print).
- Ngakengi-Limbili, A.C., 2012. Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. Thèse de doctorat en Sciences des agroressources, France, l'Université de Toulouse, Délivré par : institut national polytechnique de Toulouse (INPT), p 169.
- Nicole, M., 1996. Aperçu de l'aromathérapie. Info.essence. 2 :4-5.
- Nile, S., Keum, Y.S., Nile, A.S., Jalde, S.S and Patel, V.R., 2017. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. 32 (1).
- NIST (National Institute of Standards and Technology)., 1999. PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, the Perkin Elmer Corporation.
- NIST., 2002. Mass spectral search program for the NIST/EPA/NIH Mass spectral Library. Vers.2.0. Fireash data, USA.
- Nixon, M., and McCaw, M., 2001. The Compleat distiller. New Zealand: The Amphora Society.
- Normant, H et Normant, J.F., 1968. Chimie organique., Ed. Masson et Cie, p : 74-81.
- Nur, A.H., Farediah, A., Nor, A.J and Susanti, D., 2017. In vitro Antioxidant, Antityrosinase, Antibacterial and Cytotoxicity Activities of the Leaf and Stem Essential Oil from *Piper magnibaccum* C. DC. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20 (1): 223-232.
- Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S and Endo, T., 2000. Antioxidant Activity of Eugenol and Related Monomeric and Dimeric Compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48 (10): 1467-1469.
- Olle, M. and Bender, I., 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, 8 (3) : 687-696.
- Ornano, L., Venditti, A., Sanna, C., Ballero, M., Maggi, F., Lupidi, G., Bramucci, M., Quassinti, L and Bianco, A., 2015. Chemical composition and biological activity

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- of the essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. ssp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo e Giusso growing in La Maddalena Archipelago, Sardinia. *Journal of Oleo Science*, 64 (1): 19-26.
- Orzalesi, G., Mezzetti, T and Bellavita, V., 1969. Un nuovo lattone triterpenico naturale, α -amirina euvaoloda « *Helichrysum italicum* » (G. Don). *Boll. Chim. Farm*, 108: 540-545.
- Osman, A.K., 2011. Numerical taxonomic study of some tribes of *compositae* (subfamily *asteroideae*) from Egypt. *Pak. J. Bot*, 43 (1): 171-180.
- Ouamba, J.M., 1988. Valorisation Chimique des Plantes Aromatiques du Congo: Extraction et analyse des huiles essentielles, Oximation des aldéhydes naturels, Thèse de Doctorat d'État, Université de Montpellier II, p 340.
- Ouedrhiri, W., Balouiri, M., El Houssaine, H., Moja, S and Greche, H., 2017. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. *International Journal of Food Properties*, 20 (12): 3149-3158.
- Oukerrou, M.A., Tilaoui, M., Ait Mouse, H., Leouifoudi, I., Jaafari, A and Zyad, A., 2017. Chemical Composition and Cytotoxic and Antibacterial Activities of the Essential Oil of *Aloysia citriodora* Palau Grown in Morocco. *Advances in Pharmacological Sciences*, p 10.
- Özkal, S.G and Yener, M.E., 2016. Supercritical carbon dioxide extraction of flaxseed oil: Effect of extraction parameters and mass transfer modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 112: 76-80.
- Özkan, O.E., Güney, K., Gür, M., Pattabanoğlu, ES., Babat, E and Khalifa, M.M., 2017. Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 51 (3): 1–10.
- Paolini, J., Desjobert, J.M., Costa, J., Bernardini, A.F., Castellini, C.B., Cioni, P.L., Flamini, G and Morelli, I., 2006. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands. *Flavour Fragr. J*, 21: 805–808.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Paolini, J., 2005. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE ET IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéracée endémiques de corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*, Thèse de doctorat, Université de Corse, pp: 26-38.
- Parada, M., 2007. *Estudi etnobotànic de l'Alt Empordà [Ph.D. thesis]* Barcelona, Spain: Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.
- Pardo de Santayana, M., Blanco, E and Morales, R., 2005. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 98: 1-19.
- Paris, M et Hurabielle, M., 1981. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson, p 339.
- Passalacqua, N.G., Guarnera, P.M and De Fine, G., 2007. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*, 78 : 52-68.
- Paulsen, E., Chistensen, L.P and Andersen, K.E., 2008. Cosmetics and herbal remedies with Compositae plant extracts: are they tolerated by *Compositae*-allergic patients. *Contact Dermatitis*, 58 (1): 15-23.
- Pellecuer, J., Jacob, M., and Bouchberg, M., 1980. Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice. *Plant Médicin Phytothér*, 14: 83-98.
- Pen du, D., 2012. Le petit livre des fleurs. Ed. Du Chêne, Paris, p 80.
- Peris, J.B., Stubing, G and Romo, A., 2001. Plantas Medicinales de la Peninsula Iberica e Islas Baleares. Ediciones Jaguar, Madrid.
- Perrini, R., Morone-Fortunato, I., Lorusso, E and Avato, P., 2009. Glands essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*. *Ind. Crop. Prod*, 29: 395-403.
- Pibiri, M.C., 2006. Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, p: 28-52.
- Picman, A.K., 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14 (3): 255-81.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pieroni, A., 2000. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 235-273.
- Pietta, P., Mauri, P., Maffei Facino, R and Carini, M., 1992. Analysis of flavonoids by MECC with ultraviolet diode array detection, *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, 10: 1041-1045.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. and Martinez-de-Oliveira J., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55 : 1367–1373.
- Piras, A., Marzouki, H., Falconieri, D., Porcedda, S., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C and Ligia, S., 2017. Chemical Composition and Biological Activity of Volatile Extracts from Leaves and Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi from Tunisia. *Record of Natural Products*, 11 (1) : 9-16.
- Piyamas, A., Sakon, M and Pripdeevech, P., 2017. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Cinnamomum bejolghota* bark oil from Thailand. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7 (4): 069-073.
- Politi, F.A.S., Nascimento, J.D., Alves da Silva, A., Moro, I.J., Garcia, M.L, Guido, R.V.C., Pietro,L.R., Godinho, A.F and Furlan, M., 2016. Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on common bed bug *Cimex lectularius* L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of Cache. *Parasitol Res DOI 10.1007/s00436-016-5305*.
- Pooley, E., 2003. Mountain Flowers: A Field Guide to the Flora of the Drakensberg and Lesotho, 1st ed. The Flora Publications Trust, Durban, pp. 44, 102–110, 146–157, 222–225.
- Popoola, O.K., Marnewick, J.L., Rautenbach, F., Ameer, F., Iwuoha, E.I. and Hussein, A.A., 2015. Inhibition of Oxidative Stress and Skin Aging-Related Enzymes by Prenylated Chalcones and Other Flavonoids from *Helichrysum teretifolium*. *Molecules*, 20: 7143-7155.
- Prashith Kekuda, T.R., Vinayaka, K.S., Sandeepa, K.H., Harsha, T.S., Prashanth, M and Raghavendra, H.L., 2017. Cytotoxic and Antimicrobial Activity of

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anaphalis lawii* (Hook.f.) Gamble and *Helichrysum buddleoides* DC. *EC Microbiology*, 65: 169-176.
- Proença da Cunha, A and Cardoso do Vale, J., 1974. Contribuição para o estudo da composição química do óleo essencial de *Helichrysum stoechas* (L.) D. C. var. α -*syncladum* (Jord. Et Fourr.) Rouy. *Bol. Fac. Farmácia*, 34: 5-25.
- Proença da Cunha, A., Alves Ribeiro, J and Rodrigues Roque, O., 2007. Plantas aromáticas em Portugal: caracterização e utilizações, 2nd ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisbon.
- Proença da Cunha, A., Nogueira, M.T., Rodrigues Roque, O and Gonçalves Barroso, J.M., 2012. Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações, 1st ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisbon.
- Qiang, F., Ma, Y., Chen, J., Yuan, H and Yu-Zhong, Z., 2016. Two new C-glucosyl flavonoids from *Ziziphus jujube* and their anti-inflammatory activity. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19 (5) : 462-467 .
- Quan, L., Xiao-Xian,W., Jin-Guo, L., Jing, L., Mao-Sheng, J and Lei-Xia, C., 2014. Chemical Composition and Antifungal Activity of Extracts from the Xylem of *Cinnamomum camphora*. *Bio Resources*, 9 (2): 2560-2571.
- Quézel, P et Santa, S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertique méridionales. 1-2 Ed, CNRS, Paris, p 1170.
- Rai, A., Bhargava, R and Bikash, M., 2017. Simulation of supercritical fluid extraction of essential oil from natural products. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 5: 1-9.
- 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.
- Ramanoelina, A.R.P., Terrom, G.P., Bianchini, J.P et Coulanges, P., 1987. Contribution à l'étude de l'action antibactérienne de quelques huiles essentielles de plantes malgaches, *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 53: 217-226.
- Ramdan, B., El Malki, F., Eddarraji, K., Greche, H and Nhiri, M., 2017. Composition and Antibacterial Activity of Hydro-Alcohol and Aqueous Extracts Obtained from the *Lamiaceae* Family. *Pharmacognosy Journal* , 10 (1): 81-91.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ramdane, F., Essid, R., Fares, N., El Ouassis, D., Aziz, S., Mahammed, M.H., Ould Hadj, M.D and Limam, F., 2017. Antioxidant antileishmanial cytotoxic and antimicrobial activities of a local plant *Myrtus nivellei* from Algeria Sahara. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (8): 702-707.
- Randriaminahy, M., Proksch, P., Witte, L and Wray, V., 1992. Lipophilic phenolic constituents from *Helichrysum* species endemic to Madagascar. *Zeitschrift fuer Naturforschung. Journal of Biosciences*, 47 (1-2): 10-16.
- Raquel, O.S.F., Selene, M.M., Erika , H.S.B., Raimunda, S.N.B. ,Rossana, A.C., Ynayara, C.L., Nilce, V.G. , André, J.M., José, J.C and Marcos, F.G., 2011. Alkylphenol Activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: A Focus on the Antifungal Activity of Thymol, Eugenol and O-Methyl Derivatives. *Molecules*, 16: 6422-6431.
- Razavi, S.M., Nesrollahi, P and Alireza, y., 2017. Antioxidant potential of lettuce treated,by Thymol as an allochemical. Peertechz. *Journal of Biological Research and Development*, 2 (1): 012-015.
- Recio, M. C., Giner, R. M., Terencio, M. C., Sanz, M. J and Rvos, J. L., 1991. Anti-inflammatory activity of *Helichrysum stoechas*. *Planta Med*, 57: 56–57.
- Redzic, S.S., 2007. The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. *Collegium Antropologicum*, 31: 869-890.
- René, M.G., 1937. « Aromathérapie- Les huiles essentielles hormones végétales », Librairie des sciences, Giradot and Compagnie, Paris.
- Reveal, J.L., 2012. An outline of a classification scheme for extant flowering plants. *Phytoneuron*, 37: 1-221.
- Rios, J.L., M.C. Recio and Villar, A., 1990. Antimicrobial activities of *Helichrysum stoechas*. *Planta Medica*, 56: 646-646.
- Rios, J.L., Recio, M.C and Villar, A., 1991. Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*. *J Ethnopharmacol*, 33: 51-55.
- Rios, J.L., Recio, M.C. and Villar, A., 1970. Helipyron, ein methylen-bis-triacetsaurelacton aus *Helichrysum italicum*. *Tetrahedron Letters*, 59: 3369-3370.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rivera, D., Alcaraz, F., Verde, A., Fajardo, J and Obón, C., 2008. Las plantas en la cultura popular. Enciclopedia Divulgativa de la Historia Natural de Jumilla-Yecla. Vol. 9. Sociedad Mediterránea de Historia Natural, Jumilla.
- Rivera, N.D and Obón, C.C., 1993. Ethnopharmacology of Murcia (SE Spain), Médicaments Et Aliments, Approche Ethnopharmacologique, Heidelberg, Germany, pp : 215-239.
- Robard, I., 2004. Plantes Médicinales d'Outre-Mer et Pharmacopées: Aspects Juridiques, Economiques et Culturels. *Phytothérapie*, 2 :16–21.
- Roberts, J.D et Marjorie, C., 1977. Chimie organique moderne. Inter Ed., p 879.
- Rondanelli, M., Riva, A., Morazzoni, P., Allegrini, P., Faliva, MA., Naso, M., Miccono, A., Peroni, G., Agosti, ID and Perna, S., 2017. The effect and safety of highly standardized Ginger (*Zingiber officinale*) and Echinacea (*Echinacea angustifolia*) extract supplementation on inflammation and chronic pain in NSAIDs poor responders. A pilot study in subjects with knee arthrosis. *Journal Natural Product Research*, 31 (11): 1309-1313.
- Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, P., Appendino, G and Dess, A., 2007. Evaluation of the Antioxidant and Cytotoxic Activity of Arzanol, a Prenylated α -Pyrone-phloroglucinol Etherodimer from *Helichrysum Italicum* Subsp.*microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*, 165 (2): 117–26.
- Roussis, V., Tsoukatos, M., Chinou, I.B and Harvala C., 2002. Composition and antibacterial activity of the essential oils of two *Helichrysum stoechas* varieties growing in the Island of Crete. *J Ess Oil Res*, 14: 459-461.
- Roussis, V., Tsoukatou, M., Petrakis, P.V., Chinou, I., Skoula, M and Jerey B.H., 2000. Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 163-175.
- Ruberto, G., Biondi, D.M., Barbagallo, C., Meli, R and Savoca, F., 2002. Constituents of stem and flower oils of *Helichrysum litoreum* Guss. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 46-48.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice M and Bruni, R., 2011. Comparative Evaluation of 11 Essential Oils of Different Origin

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- as Functional Antioxidants, Antiradicals and Antimicrobials in Foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- Sahraoui, N., Hazzit, M and Boutekedjiret, C., 2017. Effects of microwave heating on the antioxidant and insecticidal activities of essential oil of *Origanum glandulosum* Desf. obtained by microwave steam distillation. *Journal of Essential Oil Research*, 29 (5):420-429.
- Sala, A., Del Carmen Recio, M., Giner, R.M., Manez, S. and Rios, J.L., 2001. New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with anti-inflammatory activity. *Journal of Natural Products*, 64 (10): 1360-1362.
- Sala, A., Recio, M., Giner, R.M., Manez, S., Tournier, H., Schinella, G and Rios, J.L., 2002. Antiinflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54: 365-371.
- Sala, A., Recio, M.C., Schinella, G.R.,Mànez, S., Giner, R.M., Cerdà, N.M and Ríos, J.L., 2003. Assessment of the antiinflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur. J. Pharmacol*, 461: 53–61.
- Salari, S., Bakhshi, T., Sharififarn, F., Naseri, A., Ghasemi, P and Nejad, A., 2016. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidia* Benth. (*Lamiaceae*) against various *Candida* isolates .*Journal de Mycologie Médicale*, 26 (4): 323-330.
- Salle, J.L et Pelletier, J., 1991. Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, p : 19-45.
- Sanchez-Romero, M.J., 2003. Estudio de la flora de interés etnobotánico en el término municipal de Rute (Córdoba). Professional research. Cordoba University, Cordoba.
- Saurat, J.H et Thomas, L., 2009. Dermatologie et infections sexuellement transmissibles., Éd. 5, Elsevier Masson, 1152 p.
- Schinella, G.R., Tournier, H.A., Prieto, J.M., Mordujovichde, P and Ríos, J.L., 2002. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences*, 70 (9): 1023-1033.
- Schwedt, G.,1993. Méthodes d'analyse. Ed. Flammarion.
- Scimeca, D., 2007. Les plantes du bonheur, Ed. Alpen, p : 12-17.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Segarrai, D.E., 2008. Etnobotànica farmacèutica de Gàtova. Publicacions de la Universitat de València, Valencia.
- Segueni, N., Zellagui, A., Boulechfar, S., Derouiche, K and Rhouati, S., 2017. Essential oil of *Hertia cheirifolia* leaves: chemical composition, antibacterial and antioxidant activities. *JMES*, 8 (2): 551-556.
- Sensöz, S and Angin, D., 2008. Pyrolysis of safflower (*Charthamus Tinctorius* L.) seed press cake in a fixed-bed reactor: part 2. structural characterization of pyrolysis bio-oils. *Bioresource Technology*, 99 (13): 5498-5504.
- Shahi, C., Leitch, M and Laforest, S., 2009. Marketing Intelligence System for Small-Scale Essential Oils Industry of North-Western Ontario, IUFRO 3.08 Small Scale Forestry Symposium Proceedings, Morgantown, West Virginia, p: 227–236.
- Shan, Y., Cai, Z., Sun M and Corke, H., 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of their Phenolic Constituents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (20): 7749-7759.
- Sharif , K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M.H.A., Sahena, F and Zaidul, I.S.M., 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 124: 105-116.
- Sharon, S.V., Diego, F.Z., Méndez-Sánchez, S.C., Rodríguez-Sanabria, F., Stashenko, E.E and Luna, J.E.D., 2014. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113 (7): 2647–2654.
- Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue, Y and Guolin, Z., 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J Ethnopharmacol*, 96 (1-2):151-158.
- Silano, V and Delbò, M., 2008. Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. *EMEA*, European Medicines Agency. London, 23 p.
- Silva, A., Meireles, C., Dias, C., Sales, F., Conde, J., Salgueiro, L and Batista, T., 2011. Plantas Aromáticas e Medicinais do Parque Natural da Serra da Estrela. CISE, Seia.
- Singh, G., 2004. Plant Systematics: An Integrated Approach. Science Publishers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Singh, S., Das, S.S., Singh, G., Perroti, M., Schuff, C., César, A.N and Catalan, C.A.N., 2017. Comparative Studies of Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of Essential Oils and Oleoresins Obtained from Seeds and Leaves of *Anethum graveolens* L. *Toxicol Open Access*, 3:1.
- Singh, V.K and Singh, D.K., 2008. Pharmacological Effects of Garlic (*Allium sativum* L.). *Annual Review of Biomedical Sciences*, 10: 6-26.
- Sirot, J., Jouanel, P., Motta, C and Sirot, D., 1983. Influence of the fatty acid content of bone tissue on the activity of antibiotics, Annales de l'institut Pasteur. *Microbiologie*, 134 (1): 79-90.
- Sitarek, P., Rijo, P., Garcia, C., Skala, E., Kalemba, D., Bialas, A.J., Szemraj, J., Pytel, D., Toma, M., Wysokinska, H and sliwinski, T., 2017. Antibacterial, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Essential Oils from Hairy and Normal Roots of *Leonurus sibiricus* L. and Their chemical composition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 12 p.
- Soares, I.H., .Loreto, E.S., Rossato, L., Mario, D.N., Venturini, T.P, Baldissera, F., Santurio, J.M and Alves, S.H., 2017. In vitro activity of essential oils extracted from condiments against fluconazole-resistant and sensitive *Candida glabrata* L'activité in vitro des huiles essentielles extraites de condiments contre *Candida glabrata* résistant ou sensible au fluconazol. *Journal de Mycologie Médicale*, 25 (3) : 213-217.
- Sobhy, E.A and El-Feky, S.S., 2007. Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6 (4): 692-695.
- Soltis, D.E and Soltis, P.S., 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7051-7057.
- Spichiger, R.E., 2002. Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. PPUR presses polytechniques.
- Spurgeon, S.L and Porter, J.W., 1981. Biosynthesis of isoprenoïd compound, New York, 1: 1-46.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Srivastava, K.C., Bordia, A and Verma, S.K., 1995., Garlic (*Allium sativum*) for disease prevention. *South African Journal of Science*, 91: 68-75.
- Stebbins, G.L., 1950. Variation and evolution in plants. New York: Columbia University Press. pp: 173-208.
- Stebbins, G.L., 1971. Chromosomal Evolution in Higher plantes., Edward Arnold Ltd, London.
- Stefanini, M.B., Ming, L.C., Marques, M.O.M., Facanali, R., Meireles, M.A.A., Moura, L.S., Marchese, J.A and Sousa, L.A., 2006. Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Revista Brasileira De Medicina*, 8: 193- 198.
- Steflitsch, W and Steflitsch, M., 2008. Clinical Aromatherapy. *Journal of Men's Health*, 5 (1) :74–85.
- Stupar, M., Grbic, M.L., Dzamic, A., Unkovic, N., Ristic, M., Vukojevic, J and Unkovic, N., 2014 .Antifungal activity of *Helichrysum Italicum* (Roth) G.Don (Asteraceae) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects. *Arch. Biol. Sci*, pp: 1539-1545.
- Su, Y.C and Hou, C.L., 2016. Composition of the Leaf Essential Oil of *Phoebe formosana* from Taiwan and its in vitro Cytotoxic, Antibacterial, and Antifungal Activities. *Natural Product Communications* , 11 (6): 845-848.
- Sudipta, J., Asit, R., Anwesha, B., Ambika, S., Noohi, N., Suprava, S., Basudeba, K., Jeetendranath, P., Pratap, C.P and Sanghamitra, N., 2017. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from leaves and rhizomes of *Curcuma angustifolia* Roxb. *Natural Product Research*, 31 (12): 2188–2191.
- Suezgec-Selcuk, S and Birteksoez, A.S., 2011. Flavonoids of *Helichrysum chasmolyticum* and its antioxidant and antimicrobial activities. *South African Journal of Botany*, 77 (1): 170-174.
- Sülsen, V.P., Lizarraga, E., Mamadalieva, N.Z and Lago, J.E., 2017. Potential of Terpenoids and Flavonoids from Asteraceae as Anti-Inflammatory, Antitumor, and Antiparasitic Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sutour, S., 2010. Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. These de doctorat. Uuniversité de Corce Pascal Paoli.
- Svoboda, K.P., 2000. Secretory structures of Aromatic and medicinal plant. Microscopix Publications. Powys, UK.4.
- Tadića, V., Arsićb, I., Zvezdanovićc, I., Zugića, A., Cvetkovićc, D and Pavković, S., 2017. The estimation of the traditionally used yarrow (*Achillea millefolium* L. *Asteraceae*) oil extracts with anti-inflamatory potential in topical Application. *Journal of Ethnopharmacology*, 199 (6): 138–148.
- Taglialatela-Scafati, O., Pollastro, F., Chianese, G., Minassi, A., Gibbons, S., Arunotayanun, W., Mabebie, B., Ballero, M. and Appendino, G., 2013. Antimicrobial phenolics and unusual glycerides from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Journal of Natural Products*, 76 (3): 346-353.
- Tamert, A., Latreche, A and Aouad, L., 2017. Criblage phytochimique et activité antimicrobienne des extraits de *Thymus serpyllum* et de *Thymus vulgaris* du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 15 (6): 384–394.
- Teisseire, P.J., 1991. Chimie des substances odorantes. Technique et documentation-Lavoisier.
- Teixeira, B., Marques, A and Ramos, C., 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43: 587–595.
- Teodoro, G.R., Brighenti, F.L., Delbem, A.C., Delbem, Á.C., Khouri, S., Gontijo, A.V., Pascoal, A.C., Salvador, M.J and Koga-Ito, C.Y., 2015. Antifungal Activity of Extracts and Isolated Compounds from *Buchenavia Tomentosa* on *Candida Albicans* and Non- *Albicans*. *Future Microbiology*, 10 (6): 917–27.
- The Angiosperm Phylogeny Group (APG I)., 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85: 531-553.
- The Angiosperm Phylogeny Group (APG III)., 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105-121.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Theron, E., Holeman, M., Potin-Gautier, M and Pinel, R., 1994. Etudes du vieillissement d'huiles essentielles malgaches riches en 1,8-cineole. Partie I: *Helichrysum gymnocephalum* -Partie II : *Ravensara aromatica*. Rivista Ital. EPPOS, 76: 33-38.
- Thompson, J.D and Lumaret, R., 1992. The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology and Evolution*, 7: 302-307.
- Tira, S., Di Modica, G., Casinovi, C.G., Galeffi, C and Pela, A., 1967. New β -diketones from *Helichrysum italicum* G. Don, *Tetrahedron Lett*, 1 (2): 143-148.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M and Arzani, A., 2017. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220: 153-161.
- Tomas-Barberan, F.A., Msonthi, J.D. and Hostettmann, K., 1988. Antifungal epicuticular methylated flavonoids from *Helichrysum nitens*. *Phytochemistry*, 27 (3): 753-755.
- Tomas-Lorente, F., Iniesta-Sanmartin, E., Tomas-Barberan, F.A., Trowitzsch-Kienast, W. and Wray, V., 1989. Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrysum decumbens*. *Phytochemistry*, 28 (6): 1613-1615.
- Toshihiro, N., Fujiwara, Y., El-Aasr, M., Ikeda, T., Ono, T., Nakano, D and Kinjo, J., 2017. Antitumor Allium Sulfides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 65: 209–217.
- Toubane, A., Rezzoug, S.A., Besombes, C and Daoud, K., 2017. Optimization of Accelerated Solvent Extraction of *Carthamus Caeruleus L.* Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of extracts. *Industrial Crops and Products*, 97: 620-631.
- Tranchant, J., 1964. Manuel de chromatographie en phase gazeuse, Paris, Masson et Cie.
- Trifan, A., Aprotosoaie, A.C., Brebu, M., Cioanca, O., Gille, E., Hancianu, M and Miron, A., 2017. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from Romanian *Satureja montana* L. *Farmacia*, 63 (3): 413-416.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tsoukatou, M., Roussis, V., Chinou, L., Petrakis, P.V and Ortiz, A., 1999. Chemical composition of the essential oils and headspace samples of two *Helichrysum* species occurring in Spain. *Journal of essential oil research*, 11 (4): 511-516
- Ulloa, P.A., Guarda, A., Valenzuela, X., Javiera F. Rubilar, M and Galotto, J., 2017. Modeling the release of antimicrobial agents (thymol and carvacrol) from two different encapsulation. *Materials Food Science and Biotechnology*, 26 (6): 1763–1772.
- Uncini, R.E and Tomei, P.E., 1999. Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. *Journal of Ethnopharmacology*, 65: 181-202.
- Usher, G., 1966. A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science and statistics constable and Co Ltd, London.
- Vaiyapuri, S.P., Athinarayanan, J and Alshatwi, A.A., 2016. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on human breast cancer cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31: 449-455.
- Valarezo, E., Arias, A., Cartuche, L., Meneses, M., Ojeda-Riascos, S and Morocho, V., 2016. Biological Activity and Chemical Composition of the Essential Oil from *Chromolaena laevigata* (Lam.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. *TEOP*, 19 (2): 384-390.
- Valnet J., 1984. Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Pari, p 544.
- Van Den Dool, H and Kratz, P.A., 1963. Generalization of the retention index system.
- Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Costa, J., Munyjabo, V., Nyirankuliza, S., Hakizamungu, E. and Schamp, N., 1989. Isolation of flavonoids and a chalcone from *Helichrysum odoratissimum* and synthesis of helichrysetin. *Journal of Natural Products*, 52 (3): 629-633.
- Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., van Zyl, R.L., van Heerden, F.R., Husnu, K and Baser, C., 2006. The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don subsp. *cymosum*. South African. *Journal of Botany*, 72: 287–290.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vernin, G and Poite, J.C., 1998. GC/MS analysis of volatile components of everlasting (*Helichrysum stoechas* L.) essential oil. *Journal of essential oil research*, 10 (5): 553-557.
- Viegas, D.A., Palmeira de Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez de Oliveira, J and Palmeira de Oliveira, R., 2014. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data *Journal of Ethnopharmacology*, 151 (1): 54-65.
- Vieira, T.M., Dias, H.J., Medeiros, T.C.T., Grundmann, C.O., Groppo, M., Heleno, V.C.G., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., Crotti, A.E.M and Silva, E.O., 2016. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium Asteraceae* Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants ISSN*, pp: 0976-5026.
- Viuda-Martos M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J and Pérez-Álvarez, J.A., 2009. Antioxidant Activity of Essential Oils of Five Spice Plants Widely Used in a Mediterranean Diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25 (1): 13-19.
- Vivekananda, M., Mohan, Y and Hemalathasson, S., 2007. Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1) : 7–18.
- Voinchet, V et Giraud-Robert, A.M., 2007. Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie*, 2: 67-72.
- Vrkoc, J., Dolejs, L and Budesinsky, M., 1975. Methylene-bis-2H-pyran-2-ones and phenolic constituents from the root of *Helichrysum arenarium*. *Phytochemistry*, 14 (5-6): 1383-1384.
- Vrkoc, J., Ubik, K. and Sedmera, P., 1973. Phenolic extractives from the achenes of *Helichrysum arenarium*. *Phytochemistry*, 12 (8): 2062-2067.
- Wagstaff, S.J and Breitwieser, I., 2002. Phylogenetic relationships of New Zealand *Asteraceae* inferred from ITS sequences. *Pl. Syst. Evol.*, 231 (1-4): 203-224.
- Ward, J.M., Bayer, R.J., Breitwieser, I., Smissen, R.D., Galbany- Casals, M and Unwin, M., 2009. *Gnaphalieae*. In: Funk V.A., Susanna A., Stuessy T.F. and Bayer R.J. Eds. Systematics, Evolution, and Biogeography of *Compositae*,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- International Association for Plant Taxonomy (LAPT)*, University of Vienna, pp: 539-588.
- Weinreich, B and Nitz, S 1996. Perfumer and flavorist. Vol. 25, p. 55 .
- Wendel, J and Doyle, J., 2005. Polyploidy and evolution in plants. In: Henry RJ, ed. Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants. Wallingford: CABI, pp: 97–117.
- Wollenweber, E., Christ, M., Dustan, R.H., Roitman, J.N. and Stevens, J.F., 2005. Exudate flavonoids in some *Gnaphalieae* and *Inuleae* (Asteraceae). *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 60 (9-10): 671-678.
- Yeh, L.S and Rilling, H.C., 1977. Purification and properties of pig liver prenyltransferase: interconvertible forms of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 183: 718-725.
- Youdi, W., Jiahong, L., Jiquan, G., Qiyou, W., Shuguang, Z., Siyuan, G., Chen, Y., Min, W., Xuediao, P., Wei, Z., Dongmei, D., Ruiping, G., Junye, W and Linquan, Z., 2017. Cytotoxic and Antitumor Effects of Curzerene from *Curcuma longa*. *planta Medica*, 83: 23-29.
- Yusei, K and Miyazawa, M., 2012. Chemical composition of essential oil from bark of *Saraca indica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47 (6): 998–1000.
- Zaixiang, L., Jie, C., Fuhao, Y., Hongxin, W., Xingran, K., Chaoyang, M and Song, S., 2017. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT*, 80: 371-377.
- Zareiyan, F., Rowshan, W., Bahmanzadegan, A and Hatami, A., 2017. *Gontscharovia popovii*, a new source of carvacrol, its polyphenolic constituents, essential oil analysis, total phenolic content and antioxidant activity. *Natural Product Research*, 28: 1-4.
- Zater, H., Huet, J., Fontaine, V., Benayache, S., Stevigny, S., Duez, P and Benayache, F., 2016. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9 (6): 554–561.
- Zehra, E., 2005. Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Utilisation: a global view. *Journal of Agronomy*, 4 (2): 83-87.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhao, L., Yagiz, Y., Xu, C., Fang, X and Marshall, M.R., 2017. Identification and characterization of vitamin E isomers, phenolic compounds, fatty acid composition, and antioxidant activity in seed oils from different muscadine grape cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, 41 (4).
- Zheng, G., Kenny, P and Lam, L., 1992. Inhibition of benzo[a]-pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. *Carcinogenesis*. 13: 1921-1923.
- Zhiyuan, M., Zheng, S., Han, H., Meng, V., Yang, Zeng, X.S., Zhou, H and Jiang, H., 2016. The bioactive components of *Coreopsis tinctoria* (Asteraceae) capitula: Antioxidant activity in vitro and profile in rat plasma. *Journal of Functional Foods*, 20: 575-586.
- Zoubiria, S., Baaliouamer, A., Sebaa, N and Chamounia, N., 2014. Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. *Arabian Journal of Chemistry*, 7 (4): 480-485.

ANNEXE

Tableau annexe : composition chimiques des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum*

24	-trans-bergamotène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00
25	-trans-bergamotol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	-betulenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	bicyclogermacrène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5	0,00
28	Bicyclosesquiphellandrène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,60	0,00
29	epi-icyclosesquiphellandrène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	-bisabolène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,00	0,00
31	-bisabolenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
32	-epi-bisabolol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33	-bisabolol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00
34	bisabolone (6S,7R)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
35	borneol	0,00	0,50	0,00	0,22	1,82	0,30	1,20	0,00	3,30	1,80	0,50	0,00
36	-bourbonène	0,00	0,00	0,00	0,18	7,11	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00
37	butenoic acid, 3-methyl-2-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
38	cadina-1,4-diène	2,44	0,00	0,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,60
39	-cadinène	2,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00
40	-cadinène	0,00	0,00	0,00	1,95	1,34	0,00	0,10	2,00	0,00	0,00	0,40	0,00
41	-cadinène	0,89	0,00	0,86	4,95	0,00	0,20	0,30	2,20	0,70	0,00	0,60	3,60
42	-epi-cadinol	1,54	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	0,10	0,60	0,20	0,00	0,00	0,70
43	-cadinol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
44	-cadinol	0,00	0,00	0,00	0,72	0,00	0,00	0,10	1,00	0,20	0,10	0,00	0,00
45	cis-calamenène	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,10	0,80	0,30	0,60	0,00	1,80
46	camphène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,30	0,00	0,00	0,40	0,40	0,30	0,00
47	camphor	0,00	0,00	0,00	0,04	5,35	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
48	-3-carène	0,00	0,00	0,00	6,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
49	carvacrol	2,98	3,31	42,50	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,10	0,00	0,00	0,50
50	caryolan-8-ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
51	caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 -ol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,40	1,50	0,40	0,00	0,00	0,00
52	caryophyllène (E)	4,19	38,52	3,44	27,02	0,00	13,30	5,70	27,60	14,00	10,80	14,20	0,00
53	caryophyllène (Z)	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,20
54	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllène	0,00	1,96	0,00	0,00	0,00	5,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
55	9-epi-(E)-caryophyllène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
56	caryophyllène alcohol	0,00	0,00	0,00	1,20	0,00	0,10	0,00	1,40	1,90	0,40	0,00	0,00
57	-caryophyllène alcohol	0,00	0,98	0,00	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
58	caryophyllène oxide	4,36	10,35	0,00	7,65	12,45	1,30	2,10	6,90	2,50	1,60	0,20	0,00
59	caryophyllène II	0,00	2,08	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	1,00	0,30	0,00	0,00	0,80

Annexe

97	farnesyl acetone-(5Z,9E)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
98	-fenchane	0,00	0,00	0,00	0,00	2,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
99	-fenchene	0,78	0,00	0,00	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,10	32,30	0,00	0,00
100	fenchyl alcohol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,30	0,00	1,50	0,70	0,00	0,00	0,00
101	-fenchyl alcohol	0,00	0,00	0,00	0,88	1,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
102	geranyl acetate	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
103	geranyl butanoate	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
104	geranyl propanoate	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
105	geranyl tiglate	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
106	germacrène D	0,00	0,30	0,00	0,00	2,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
107	globulol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	0,20	0,60	0,00	0,00	1,40
108	cis- -guaiène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
109	-guaiène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
110	-guaiène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,00	0,00	0,00	1,10	0,00	0,00	0,00
111	guaiol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
112	-gurjunène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	1,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00
113	-gurjunène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
114	hentriaccontane	5,54	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40
115	heptacosane	4,57	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
116	hexadecane	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
117	hexadecanoic acid	17,50	2,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,20
118	hexadécène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
119	3,4-hexanedione	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
120	3-Hexen-1-ol-(Z)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
121	hexyl-2-methylbutanoate	0,00	0,00	0,00	0,00	1,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
123	-himachalène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
124	-humulène	0,00	2,85	0,00	1,51	1,28	0,60	0,20	9,40	2,00	1,30	1,40	0,00	2,90
125	humulène epoxide II	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,70	0,70	0,20	0,00	0,00	0,00
126	(E)- -ionone	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
127	isoeugenol acetate (E)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
128	iso-italicène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,20	0,00	0,00
129	iso-italicène epoxide	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
130	isopropyl tetradecanote	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
131	ispbornyl acetate	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
132	italicène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,0	0,00	0,00
134	kaurène	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,00	0,00	1,30	0,00	0,00	0,00	0,00

Annexe

Annexe

Annexe

Annexe

Annexe

Annexe

Annexe

Annexe

Annexe

58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	6,01
59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
62	0,00	13,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	1,30	0,00	1,30	1,80	0,90	6,83	6,59	0,00
64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
66	3,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	1,97	1,25
67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
68	0,00	2,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58	0,00
70	1,90	0,00	1,00	0,10	3,90	2,60	2,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
71	22,45	0,00	1,10	3,70	2,50	8,20	27,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
72	0,00	11,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
73	0,00	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
74	0,00	1,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,20	0,46	0,62	0,00
75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,20	0,00	0,00	1,01	0,00
76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,36	0,00	0,00
80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,49
81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22
83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,30	0,90	0,00	0,00	0,00	0,00
84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
85	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
87	0,00	0,00	2,80	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
88	0,00	2,88	0,00	0,00	1,30	2,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
89	0,00	0,00	0,70	0,20	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,50	0,00	0,00	1,70	0,00	0,00	0,18	15,01	0,00

Annexe

Annexe

132	5,42	0,00	1,10	1,00	1,20	1,30	1,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
134	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	9,55	0,00	0,00	
135	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
136	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
137	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,11	3,12	21,50	18,70	2,00	14,00	9,00	0,00	0,00	1,38	6,01	0,00					
138	2,52	6,07	3,50	0,80	0,00	0,00	0,50	0,20	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,06	
139	0,51	2,98	1,70	2,20	3,30	2,20	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,98	0,68		
140	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
141	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
142	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,65	0,00		
143	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
144	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
145	1,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,74	0,00			
146	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,24	0,00	
147	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
148	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	
149	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
151	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
152	0,78	5,04	0,00	6,80	4,40	13,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
153	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,71	0,42	0,64	
154	0,00	1,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
155	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
156	7,85	4,91	73,70	60,30	55,70	41,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
157	0,47	0,00	1,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
158	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
159	1,39	0,00	3,70	5,40	12,70	5,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
161	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00	5,30			
162	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
163	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
164	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,14		
165	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
166	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
167	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,47	0,52	0,00			
168	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09			

169	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99
170	0,00	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
171	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
172	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
173	15,91	3,78	0,00	0,00	0,00	0,00	53,50	12,02	1,70	0,70	0,60	0,00	0,00	1,40	0,00	0,00	0,32	0,00	0,00	7,99
174	0,00	1,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	4,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85
175	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	59,00	68,50	77,70	28,30	63,00	12,00	0,00	1,00	38,58	7,79	0,00		
176	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
177	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
178	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
179	0,00	0,00	0,00	0,00	3,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	0,20	0,10	0,00	0,00	1,60	4,90	1,00	0,00	0,73	0,00		
181	4,78	0,00	0,00	0,00	0,40	0,30	1,00	1,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,20	0,00	0,00	0,00	0,00
182	6,94	0,00	0,00	0,50	0,40	0,00	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	4,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,81
183	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
184	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
185	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,43	0,57	0,00		
186	0,00	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,40	0,00	
187	0,26	2,47	0,00	0,00	0,90	1,50	0,39	0,00	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73
188	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
189	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
190	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
191	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
192	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,26	0,00
193	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,10	0,00	0,00	0,00	0,00
194	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,51	0,00	0,00	
195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60	0,00	0,00	0,00	
196	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28
197	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
198	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,70	0,00	0,00	0,00	0,56
199	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00
201	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58	0,00		

Auteurs :

A (Roussis *et al.*, 2000); **B** (Bougatsos *et al.*, 2004) ; **C** (Lourens *et al.*, 2004) ; **D** (van Vuuren *et al.*, 2006) ; **E** (Cavalli *et al.*, 2006) ; **F** (Afoulous *et al.*, 2011) ; **G** (Formisano *et al.*, 2009) ; **H** (Elkiran *et al.*, 2013) ; **I** (Firouznia *et al.*, 2007) ; **J** (Esmaeili, 2013) ; **K** (Ghaemi-Dehkordi *et al.*, 2015) ; **M** (Morone-Fortunato *et al.*, 2010) ; **N** (Cristofari *et al.*, 2012) ; **O** (Morone-Fortunato *et al.*, 2010) ; **P** (Mancini *et al.*, 2011) ; **Q** (Paolini *et al.*, 2006) ;**R** (Nebojsa *et al.*, 2015) ; **S** (Nebojsa *et al.*, 2015) ; **T** (Bianchini *et al.*, 2003) ; **U** (Masteli *et al.*, 2008) ; **V** (Bianchini *et al.*, 2003) ; **W** (Masteli *et al.*, 2005) ; **X** (Ivanovic *et al.*, 2011) ; **Y** (Stupar *et al.*, 2014) ; **X** (Melito *et al.*, 2016) ; **AB** (Perrini *et al.*, 2009) ; **AC** (Costa *et al.*, 2015) ; **AD** (Proença et Cardoso, 1974) ; **AE** (Ascensao *et al.*, 2001) ; **AF** (Tsoukatou *et al.*, 1999) ; **AI** (Vernin et Poite, 1998) ; **AJ** (Roussis *et al.*, 2002) ; **AK** (Chinou *et al.*, 1997) ; **BM** (Bouchaala *et al.*, 2016).



International Journal of Pharma Research and Health Sciences

Available online at www.pharmahealthsciences.net



Original Article

Chemical Composition, Antibacterial Activity and Chromosome Number of *Helichrysum lacteum*, Endemic from Algeria

Meriem Bouchaala ¹, Messaoud Ramdani ^{1,*}, Takia Lograda ¹, Pierre Chalard ² and Gilles Figueredo ³

¹ Laboratory of Natural Resource Valorisation, SNV Faculty, Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria.

² SIGMA Clermont, Campus des Cezeaux, CS 20265, 63178 Aubière cedex France.

³ LEXVA Analytique, 460 rue du Montant, 63110 Beaumont, France.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Received: 24 Dec 2016

Accepted: 19 Jan 2017

The aim of this work is to investigate the chemical composition, antibacterial of essential oil and chromosome numbers from *Helichrysum lacteum* variety typicum endemic to Algeria. Samples of *H. lacteum* were collected in the flowering stage, in eastern Algeria locality. The air dried materials were subjected to a hydrodistillation which gave a viscous liquid with pale yellow oil. The chemical composition of the essential oil was analyzed by GC and GC / MS. A total 46 compounds representing 95.74% of the total oil were identified in *H. lacteum*. The chemical composition is dominated by the presence of major products, hexadecanoic acid (12.62%), caryophyllene (E) (10.58%), farnesyl acetone (5Z, 9E) (8.25%), α -pinene (7.99%), α -humulene (5.88%), nonanal-n (5.30%), humulene epoxide II (2.99%), caryolan-8-ol (2.82%), α -cadinol-epi (2.67%), γ -dodecalactone (2.49%), octanal-n (2.14%). The Essential oil of *H. lacteum* was tested for five microorganisms. The oil showed modest effect against all the bacteria tested. The population of *H. lacteum* shows a tertraploïde chromosome number, $2n = 4x = 28$, with a basic number $x = 7$.

Keywords: *Helichrysum lacteum*, Endemic, Essential oil, Antibacterial activity, Chromosome number, Algeria.

1. INTRODUCTION

The genus *Helichrysum* derives its name from the Greek words helios (Sun) and chrysos (Gold) which is appropriate considering the attractive yellow flowers displayed by several species ¹ commonly known as gold-everlasting or eternal flowers ². The genus belongs to the *Asteraceae* family and tribe *Inuleae* ³. This large genus consists of approximately 500-600 species ^{3,4}. It is a cosmopolitan genus

Corresponding author *

Messaoud Ramdani

Laboratory of Natural Resource Valorisation, SNV Faculty,
Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria.
E-mail: ramdanimessaoud@yahoo.com

1539

with 25 species native to the Mediterranean area⁵. In Algeria, the genus is represented by three species with *H. lacteum* variety *typicum* endemic to Algeria⁶. *Helichrysum lacteum* is an aromatic shrub of North Africa (Algeria, Morocco) with a white flowers; this species is represented in Algeria by an endemic variety *typicum*, it is found in forest clearings of cedars and mountain pastures and it is very rare⁶.

Species of the genus play an important role in traditional medicine, they are used to fight headaches; Inflammation, respiratory ailments, asthma, bronchitis, cough, infections and insomnia⁷⁻¹². Also they have been used as an astringent, diuretic and expectorant and in the treatment of the liver, skin, nervous systems, and digestive disorders¹³. The Isolated phytoproducts of *Helichrysum* species are used in the food, cosmetic and pharmaceutical industries¹⁴.

Plants from the genus *Helichrysum* are producers of secondary metabolites⁷. The chemistry of the *Helichrysum* genus is complex, with a wide variety of chemical classes, among which are monoterpenes and sesquiterpenoids, diterpenoids and flavonoids²⁰⁻²¹, triterpenoids and phenolic compounds²² and flavonoides²³⁻²⁶.

Several studies have recently reported the chemical composition of *Helichrysum* essential oils of various origins, *H. italicum* from Algeria²⁷⁻²⁸, from Belgrade²⁹ and from Brazil³⁰, *H. microphyllum* ssp *tyrrhenicum* and *H. italicum* from Italia^{14,31-32}, *H. italicum* and *H. stoechas* from Portugal³³⁻³⁴, *H. splendidum* from South Africa³⁵ and *H. oligocephalum* from Iran³⁶⁻³⁷.

Cytological studies of this genus have been restricted to a few studies of karyotypes and chromosome number, only 10-12% of the species have benefited from karyological studies³⁸. The available chromosome data indicate that polyploidy played a significant role in the speciation and the evolution of the genus³⁹⁻⁴⁰. The chromosome number most commonly found in *Helichrysum* is $2n = 28$, mainly in the Mediterranean, Macaronesian and Asian species³⁸. But some records of $2n = 14$ for African species and $2n = 56$ for some East Mediterranean and Asiatic species are also known⁴¹. The basic chromosome number in *Helichrysum* are $x = 4$ and ($x = 7$)³⁸. In the literature, the chromosome number $2n = 42$ is published two times^{38,42}.

To the best of our knowledge, the chemical composition of essential oil of *Helichrysum lacteum* has not been studied yet, as well as its antimicrobial properties and the chromosome numbers. The aim of this work was to investigate the chemical composition, antibacterial of essential oil and chromosome numbers from *Helichrysum lacteum* variety *typicum* growing in Algeria.

2. MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

Samples of *Helichrysum lacteum* L. were collected in the flowering stage, in eastern Algeria locality (Figure 1). Aerial parts were collected in October 2014.

Helichrysum lacteum variety *typicum* is a perennial, turf grass plant of 10-40 cm, characterized by globular Capitulos, nearly 1 cm long, pedunculate and gathered in dense corymb (Figure 2). The leaves are oblong or spatulate, tomentose-aranoseuse. The bracts of the involucre are silvery, milky, and brilliant, erect; Hairy at the base and matching flowers⁶. The air dried materials were subjected to hydrodistillation for 3h using a Clevenger apparatus type. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Ecology and Biology, Setif 1 University, Algeria. The oil obtained was collected and dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4°C in sealed brown vials until use.

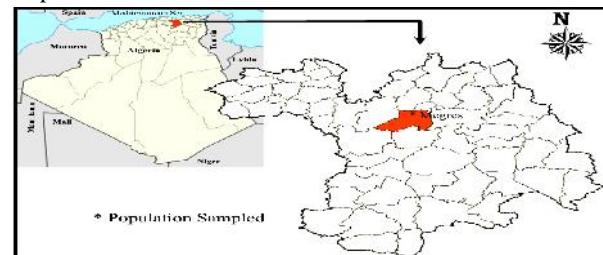


Fig 1: Population of *Helichrysum lacteum* sampled



Fig 2: *Helichrysum lacteum* of Megres region

ESSENTIAL OIL ANALYSIS

The essential oils were analysed on a Hewlett-Packard gas chromatograph Model 5890, coupled to a Hewlett-Packard model 5971, equipped with a DB5 MS column (30 m X 0.25 mm; 0.25 µm), programming from 50°C (5 min) to 300°C at 5°C/min, with a 5 min hold. Helium was used as the carrier gas (1.0 ml/min); injection in split mode (1:30); injector and detector temperatures, 250 and 280°C, respectively. The mass spectrometer worked in EI mode at 70 eV; electron multiplier, 2500 V; ion source temperature, 180°C; MS data were acquired in the scan mode in the m/z range 33-450. The identification of the components was based on comparison of their mass spectra with those of NIST mass spectral library^{43,44} and those described by Adams, as well as on comparison of their retention indices either with those of authentic compounds or with literature values⁴⁵.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY

One Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592) and four Gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Shigella* sp) were

used in present study. The bacterial inoculum was prepared from overnight broth culture in physiological saline (0.8 % of NaCl) in order to obtain an optical density ranging from 0.08-01 at 625 nm. Muller-Hinton agar (MH agar) was poured in Petri dishes, solidified and surface dried before inoculation. Sterile discs (6 mm) were placed on inoculated agar, by test bacteria, filled with 10 μ l of mother solution and diluted essential oil (1:1; 1:2; 1:5 and 1:10 v/v of DMSO). DMSO was used as negative control. The antibiotic, gentamicin, cefotaxime and colistin sulphate was used as positive control. Then Petri dishes were incubated at 37°C during 18 to 24h aerobically. After incubation, inhibition zone diameters were measured and documented.

KARYOLOGY

The crushing process is used in the karyotype analysis. The meristems of the roots, resulting from the germination of seeds, are used for chromosomal preparations. A pre-treatment at room temperature for 1 hour 15 minutes was applied before fixation of the root-tips, in a solution of colchicine a 0.05%. After fixation in a mixture of ethanol and acetic acid (3: 1), the roots are stored in ethanol at 70° to the cold, until used. The staining procedure involves the maceration of roots in acetic acid 45% for 15 minutes. The staining of chromosomes is performed in emerging in the roots extremities in acetic orcein by heating for one minute; then cut the meristems and crush them in a drop of orcein.

3. RESULTS

The hydro-distillation of *Helichrysum lacteum* essential oil gave a viscous liquid with pale yellow oil. The average yield of essential oil of the sample is 0.03%. The analysis and identification of the components of the essential oil of this species was performed using the (GC/MS) (Figure 3 and 4). The compound identified in these oils and their relative abundances are presented in order of their appearance (Table 1). This analysis led to the identification of 46 components representing 95.74% of the total oil of *H. lacteum*.

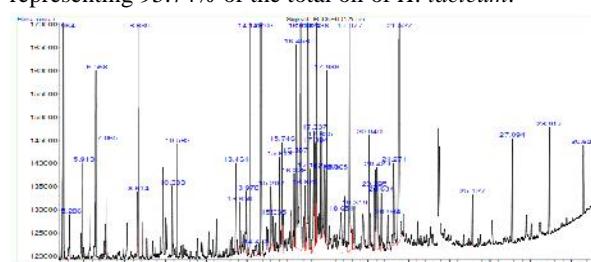


Fig 3: GC/FID profiles of *Helichrysum lacteum*

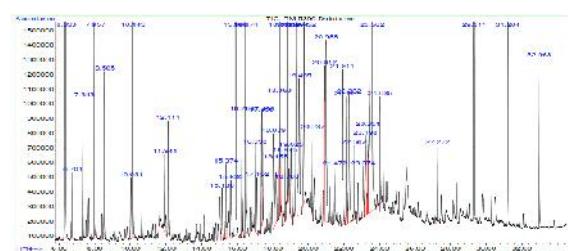


Fig 4: GC/Masse profiles of *Helichrysum lacteum*

Table 1: Chemical composition of *Helichrysum lacteum* essential oil

Total	95.74	Total	95.74
Number of compounds	KI 46	Number of compounds	KI 46
Yield (%)	0.03	Yield (%)	0.03
-pinene	934 7.99	Viridiflorol	16050.56
Camphepane	957 0.45	Humulene epoxide II	16172.99
-pinene	984 0.85	Muurola-4,10(14)-dien-1- -ol	16430.78
Octanal-n	1005 2.14	-cadinol-epi	16482.67
Limonene	1030 1.06	-cadinol	16610.98
Linalool	1108 0.68	-dodecalactone	16792.49
Nonanal-n	1114 5.30	Pentadecanone-2	16970.99
-terpineol	1207 0.73	Amorpha-4,7(11)-diene-2 -OH	17800.81
Decanal-n	1216 1.01	-bisabolol	17861.60
-copaene	1379 1.25	Isotorquatone demethyl	18220.61
-isocomene	1392 0.39	Farnesyl acetate (2E, 6E)	18571.30
Caryophyllene (Z)	1409 0.75	Nonadecane-n	19080.90
Caryophyllene (E)	1425 10.58	Farnesyl acetone (5Z,9E)	18708.25
Neryl acetone	1449 0.30	Farnesyl acetone (5E,9E)	19490.62
-humulene	1461 5.88	Cyclohexadecanolide	19281.04
-selinene	1494 0.81	Hexadecanoic acid	196812.62
Valencene	1502 0.28	Geranyl linalool (E, E)	20280.80
-cadinene	1518 0.83	Tricosane	23180.49
-cadinene	1522 0.71	Pentacosane	25201.09
Nerolidol (E)	1575 0.64	Hexacosane	26061.06
Dodecanoic acid	1563 1.22	Octacosane	29250.67
Caryolan-8-ol	1583 2.82	Pentacosane	25201.09
Caryophyllene oxide	1588 6.01	Hexacosane	26061.06

According to our results the chemical composition of the species, *H. lacteum* is dominated by the presence of major compounds, hexadecanoic acid (12.62%), caryophyllene (E) (10.58%), farnesyl acetone (5Z, 9E) (8.25%), -pinene (7.99%), -humulene (5.88%), nonanal-n (5.30%), humulene epoxide II (2.99%), caryolan-8-ol (2.82%), -cadinol-epi (2.67%), -dodecalactone (2.49%) and octanal-n (2.14%).

The antibacterial activity of the essential oils was evaluated using five microorganisms, using disc diffusion method. The diameters of inhibition zones of essential oils for the microorganisms tested are grouped in the table 2. The results show that the pure oil and dilutions of *H. lacteum* has moderate activity against all bacteria, producing a (0-13mm) diameter of inhibition. While its activity is important against the bacterium *S. aureus* compared to gentamicin. All tested bacteria are sensitive to the antibiotics except *S. aureus* that is resistant of the gentamicin.

Table 2: Inhibition diameter (mm) of *Helichrysum lacteum* essential oil

Microorganisms	Controls			Inhibition diameter*			
	Cefotaxime	Colistinsulfate	Gentamicin	Dilution			
				EO 1/2	1/5	1/10	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33.5	15	25	10	10.5	10	9.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	18	0	10	11	11	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	13	17	9	10.5	9	9
<i>Pseudomonas syringae</i>	18.5	15	22.5	9	8	8	8
<i>Shigella</i> sp	14	15	30	13	13	13	9.5

(*) Average inhibition diameter (mm) of three trials

The observation of metaphase plates of *H. Lacteum* allowed us to identify a karyotype with a tetraploïde chromosome number ($2n = 4x = 28$) and a basic number ($x = 7$) (Figure 5).

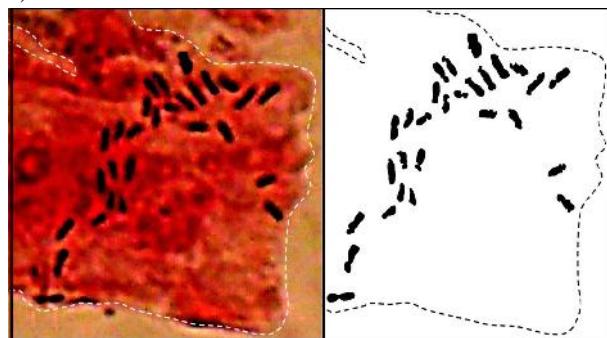


Fig 5: karyotype of *Helichrysum lacteum* ($2n= 4x= 28$). (Magnification = HI 100X).

4. DISCUSSION

In general, yields of essential oils of Algerian *Helichrysum* species are low. The yield of essential oil of the sample is 0.03%. It is similar with a yield of *H. italicum* subsp. *numidicum* 0.03%²⁷ and *H. italicum* subsp. *Italicum* 0.02%^{30,46}, 0.5 % for *H. italicum* subsp. *Microphyllum*⁴⁷, 0.2% for *H. italicum*^{9,48}, 0.44% for *H. italicum*²⁸. The oil yield was 0.8% for *H. oligocephalum*³⁶. These variations can be explained by the different climates, seasons, geographic and soil conditions, as well as differences in altitude and harvest periods of the plant.

The chemical profile of the essential oil of *H. lacteum* of Megres is different from other species reported by other authors in different regions. Our sample contains high percentages of hexadecanoic acid (12.62%), caryophyllene (E) (10.58%), farnesyl acetone (5Z, 9E) (8.25%), -pinene (7.99%), -humulene (5.88%), nonanal-n (5.30%) humulene epoxide II (2.99%), caryolan-8-ol (2.82%), -cadinol-epi (2.67%), -dodecalactone (2.49%), octanal-n (2.14%). The oil of *H. italicum* collected from the region of Bejaia (North of Algeria) contained mainly -cedrene, -curcumene, geranyl acetate, limonene, nerol, neryl acetate and -pinene²⁸. The oils of *H italicum* collected in the regions of Bibans

(Algeria) have major compounds Isopropyl tetradecanoate, -pinene, hexadecanoic acid, caryophyllene (E), ledol, palustrol, -humulene, caryophyllene <9-epi>, -copaene, cis-calamenene²⁷. On the other hand, In the Mediterranean region, several chemical compositions of essential oil of *Helichrysum* species have been observed^{14,29-30,34,36-37}. The differences in chemical composition of essential oils between different species from genus *Helichrysum* are probably due to several factors, especially geographical factors, season and vegetation cycle⁴⁹⁻⁵⁰.

The bacteriological results of oil *H. lacteum* subsp *typicum* from Algeria are similar to those of other Algerian species reporting in the literature. The methanolic and hexanic extracts of *H stoechas* showed moderate antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*⁵¹. The oil of *H. italicum* form Algeria inhibited the growth of all the tested microorganisms except three bacteria *Escherichia coli*²⁸. Outer study showed that the oil of *H. italicum* has a modest effect against all the bacteria tested and its activity is important against the bacterium *S. aureus*²⁷. *H. oligocephalum* oils from Iran showed significant antibacterial activity³⁷. The extracts from *H. italicum* have the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus* sp⁵².

The number of chromosomes most commonly observed in *Helichrysum* is $2n = 28$ mainly in Mediterranean, Macaronesian and Asian species, with basic number $x = 4$ and ($x = 7$)³⁸. The number of chromosomes $2n = 4x = 28$ with the basical number $x = 7$, is identified for the first time, for the species *H. lacteum*, subspecies *typicum*, endemic of Algeria. Our results agree with previous reports for the species of the genus, *H. italicum* subsp. *numidicum* from Algeria²⁷. The same chromosome number is confirmed in *H. italicum* subsp *silculum* from Italy^{41,38,53-55}. The same result is obtained for *H. italicum* subsp. *Microphyllum* from Italy⁴¹ and Spain⁵⁵. This allows us to say that the chromosomal number of the *Helichrysum* genus at least for Algerian species is $2n = 28$ (African species) with a basic number of $x = 7$.

5. CONCLUSION

Analysis of the chemical composition of essential oils by GC/MS allowed the identification of 46 components in the essential oil of *Helichrysum lacteum* subsp. *typicum* collected from Megres region. It is characterized by the main presence of hexadecanoic acid (12.62%), caryophyllene (E) (10.58%), farnesyl acetone (5Z, 9E) (8.25%), -pinene (7.99%), -humulene (5.88%), nonanal-n (5.30%), humulene epoxide II (2.99%), caryolan-8-ol (2.82%), -cadinol-epi (2.67%), -dodecalactone (2.49%), octanal-n (2.14%). We also note that the chemical composition of the Megres sample differs from species of genus *Helichrysum* reported in the literature.

The antibacterial activity of *H. lacteum* subsp. *typicum* essential oils is tested on for bacterial strains. The results

show that the essential oil of this species has significant inhibitory action on almost all the bacteria tested. The chromosome number of *H. lacteum* subsp. *typicum* is stable and similar to bibliographic results. The chromosomal number of the Megres population is a tetraploid with $2n = 4x = 28$, and a chromosomal basic number $x = 7$.

6. REFERENCES

- E. Pooley. Mountain Flowers: A Field Guide to the Flora of the Drakensberg and Lesotho, 1st Ed. The Flora Publications Trust, Durban, 2003.
- S. Pignatti. *Flora d'Italia*; Edizione Edagricole: Bologna, Italy, 1982.
- OM. Hilliard. Asteraceae. In: Leistner, O.A. (Ed.), Flora of Southern Africa, 33(7) (*Inuleae*). Botanical Research Institute of South Africa, Pretoria, 1983.
- Engler. Engler Syllabus der Pflanzen familien Gebrüder Borntraeger, Berlin- Nikolassee, Band, 1964; 2: 489
- Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabbeta W and Blanco A. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. Ind. Crop. Product 2010; 32: 639-649.
- P. Quézel et S. Santa. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Ed. CNRS, Paris, 1963.
- Appendino G, Ottino M, Marquez N, Bianchi F, Giana A, Ballero M, Sterner , Fiebich BL, Munoz E, Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. J. Nat. Prod. 2007; 70: 608-612.
- Rossi PG, Berti L, Panighi J, Luciani A, Maury J, Muselli A. Antibacterial action of essential oils from Corsica. Journal of Essential Oil Research 2007; 19: 176-182.
- Masteli J, Politeo O, Jerkovi I, Radosevic N. Composition and Antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* Essential oil and its terpene and terpenoid. Chemistry of Natural Compounds 2005; 41(1): 35-40.
- Sala A, Recio M, Giner RM, Manez S, Tournier H, Schinella G, Rios JL. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. J. Pharm. Pharmacol., 2002; 54(3): 365-371.
- Sala A, Recio MC, Schinella GR, Mànèz S, Giner RM, Cerdà NM, Ríos JL. Assessment of the anti inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. Eur. J. Pharmacol. 2003; 461: 53-61.
- Nostro A., Cannatelli MA, Musolino AD, Procopio F, Alonso V. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. Lett. Appl. Microbiol. 2002; 35: 181-184
- Viegas Daniel Antunes, Ana Palmeira de Oliveira, Lígia Salgueiro, José Martinez de Oliveira, Rita Palmeira de Oliveira. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data Journal of Ethnopharmacology 2014; 151(1): 54-65.
- Luingi Orano, Alessandro Venditti, Cinzia Sanna, Mauro Ballero, Filippo Maggi, Giulio Lupidi, Massimo Bramucci Luana Quassinti and Armando Orano Binco. Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. ssp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo e Giusso growing in la Maddalena archipelago, Sardinia. J. Oleo Sci. 2015; 64(1): 19-26
- Lourens AC, Reddy D, Baser KH, Viljoen AM, Van Vuuren SF. In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. Journal of Ethnopharmacology 2004; 95(2-3): 253-258
- Satta M, Tuberoso CIG, Angioni A, Pirisi FM, Cabras P. Analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. J Essent Oil Res. 1999; 11(4): 711-715.
- Bougatsos C, Meyer JJM, Magitatis P, Vagias C, Chinou JB. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum Kraussii* and *Helichrysum rugulosum* Less from South Africa. Flavour Frag J. 2003; 18: 45-51
- Bougatsos C, Ngassapa O, Runyaro DK, Chinou IB. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of two *Helichrysum* species from Tanzania. Z Naturforsch C. 2004; 59(5-6): 368-372.
- Formisano C, Mignola E, Rigano D, Senatore F, Arnold NA, Bruno M, Rosselli S. Constituents of leaves and flowers essential oils of *Helichrysum pallassi* (Spreng.) Ledeb Growing wild in Lebanon. J Med Food. 2009; 12(1): 203-207.
- Drewes SE, Mudau KE, van Vuuren SF, Viljoen AM. Antimicrobial monomeric and dimeric diterpenes from the leaves of *Helichrysum tenax* var *tenax*. Phytochemistry. 2006; 67(7): 716-722.
- Zanetsie Kakam AM, Franke K, Ndom JM, Dongo E, Mpondo TN, Wessjohann LA. Secondary metabolites from *Helichrysum foetidum* and their chemotaxonomic significance. Biochem Syst Ecol. 2011; 39: 166-167.
- Mezzetti T, Orzalesi G, Rossi C, Bellavita V. A new triterpenoid lactone, alpha-amyrin and uvaol from *Helichrysum italicum*. Planta Med. 1970; 18(4): 326-331.
- Legoalea PB, Mashimbyeb MJ and Van Rec T. Antiinflammatory and antioxidant flavonoides from *Helichrysum kraussii* and *H. odoratissimum* flower. Nat Prod Commun. 2013; 8(10): 1403-1404.
- Süzgeç S, Meriçli AH, Houghton PJ, Çubukçu B. Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. Fitoterapia. 2005; 76(2): 269-272.

25. Süzgeç-Selçuk S, Birteksöz AS. Flavonoids of *Helichrysum chasmolyticum* and its antioxidant and antimicrobial activities. South African Journal of Botany 2011; 77: 170-174.
26. Al-Rehaily AJ, Albishi OA, El-Olemy MM, Mossa JS. Flavonoids and terpenoids from *Helichrysum forskahlii*. *Phytochemistry*. 2008; 69(9): 1910-1914.
27. Bouchaala, M., Ramdani, M., Chalard, P., Figueiredo, G., Lograda, T1, Chemical Composition, Antibacterial Activity and Chromosome Number of *Helichrysum italicum* from Algeria. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016; 8(10); 1675-1683.
28. Bouzid D, Nouioua W, Soltani E, De Haro JP. Angeles Esteban M, Zerroug, M. Chemical constituents of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil and their antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, filamentous fungi and *Candida albicans*. Saudi Pharmaceutical Journal 2016;
29. Stupar M, Grbic ML, Dzamic A, Unkovic N, Ristic M, Vukojevic J, Unkovic N. Antifungal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (*Asteraceae*) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects. Arch. Biol. Sci., Belgrade 2014; 66(4): 1539-1545.
30. Nebojsa VK, Goran TA, Milica MR, Branislava US, Nevena NG, Emilia IS, and Biljana NB. Biochemical Characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. from Montenegro: Phytochemical Screening, Chemotaxonomy, and Antioxidant Properties. Chemistry and Biodiversity 2015; 12(3): 419-31
31. Melito S, Petrettob GL, Podanic J, Foddaib M, Maldinib M, Chessa M, Pintore G. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. Industrial Crops and Products 2016; 80: 242-250.
32. D'Abrosca B., Buommino E, Caputo P, Scognamiglio M, Chambery A, Donnarumma G and Fiorentino A. Phytochemical study of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Spectroscopic elucidation of unusual amino-phlorogucinols and antimicrobial assessment of secondary metabolites from medium-polar extract. *Phytochemistry* 2016; 132: 86-94.
33. Rodrigues Ana M, Silva Letícia, Falé Pedro LV, Serralheiro Maria L and Ascensão Lia. Glandular Trichomes and Biological Activities in *Helichrysum italicum* and *H. stoechas*, Two *Asteraceae* Species Growing Wild in Portugal. *Microsc. Microanal.* 2015; 21(Suppl 5): 91-92
34. Costa P, Miguel Loureiro J, Teixeira MA, Rodrigues AE. Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO₂ from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal, Industrial Crops and Products 2015; 77: 680-683.
35. Mashigoa M, Combrinck S, Regnierb T, Plooyc WD, Augustyna W and Mokgalakaa N. Chemical variations, trichome structure and antifungal activities of essential oils of *Helichrysum splendidum* from South Africa. South African Journal of Botany 2015; 96: 78-84.
36. Ghassemi-Dehkordi N, Sadeghi M, Kaviani MR, Zolfaghari B. Analysis of *Helichrysum oligocephalum* DC. Essential oil. Research Journal of Pharmacognosy 2015; 2(1): 47-52.
37. Esmaeili A. Biological activities and chemical composition of the stems and roots of *Helichrysum oligocephalum* DC grown in Iran. Pak. J. Pharm. Sci. 2013; 26(3): 599-604.
38. Galbany-Casal M, Garcia-Jacas N, Sáez L, Susanna A, Benedí C. Phylogeny, biogeography, and character evolution in Mediterranean, Asiatic and Macaronesian *Helichrysum* (*Asteraceae*, *Gnaphalieae*) inferred from nuclear phylogenetic analyses. International Journal of Plant Science 2009; 170: 365-380.
39. Carr GD, King RM, King A, Powell M and Robinson H. Chromosome numbers in *Compositae* XVIII. American Journal of Botany 1999; 86: 1003-1013.
40. Castro M and Rosselló JA. Karyological observations on plant taxa endemic to the Balearic Islands. Journal of the Linnean Society 2007; 153: 463-476.
41. Galbany-Casal M and Romo A. Polyploidy and new chromosome counts in *Helichrysum* Mill. (*Asteraceae*, *Gnaphalieae*). Botanical Journal of the Linnean Society 2008; 158: 511-521.
42. Febles R. Estudios en la flora Macaronésica: algunos números de cromosomas VI. Botánica Macaronésica, 1989; 17: 57-71.
43. Y. Masada. Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Halsted, Nueva York. 1976; 34 p.
44. NIST. Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. vers. 2002
45. RP. Adams. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4th Ed. Carol Stream. IL, Allured Publishing Corporation. USA, 2007; 804p.
46. Mancini E, De Martino L, Marandino A, Scognamiglio MS, De Feo V. Chemical Composition and Possible *in Vitro* Phytotoxic Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *Italicum*, Molecules 2011; 16: 7725-7735.
47. Perrini R, Morone-Fortunato I, Lorusso E, Avato P. Glands, essential oils and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*. Ind. Crop. Prod 2009; 29: 395-403.
48. Ivanovic J, Ristic M, Skala D. Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material. J. of Supercritical Fluids 2011; 57: 129-136.

49. Bianchini A, Tomi P, Costa J and Bernardini AF. Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. subsp. *italicum* essential oils from Corsica (France) Flav. and Frag. J. 2001; 16: 30-33.
50. Paolini J, Desjobert JM, Costa J, Bernardini AF, Castellini CB and Cioni PL. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. *italicum* form Tuscan archipelago islands. Flav. and Frag. J. 2006; 21: 805-808.
51. Haddouchi F, Zerhouni K, Sidi-Yekhelef A, Chaouche TM. Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liege 2016; 85: 152-159
52. Nostro A, Cannatelli MA, Crisafi G, Musolino AD, Procopio F, Alonzo V. Modification of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. Lett. Appl. Microbiol. 2004; 38: 423-427.
53. D'Amato G. Numeri cromosomici per la Flora Italiana 67-80. Informatore Botanico Italiano 1971; 3: 124-157.
54. Bacchetta G, Brullo S, Mossa L. Note tassonomiche sul genere *Helichrysum* Miller (Asteraceae) in Sardegna. Informatore Botanico Italiano 2003; 35(1): 217-225.
55. Galbany-Casals M, Sáez L, Benedí C. A taxonomic revision of *Helichrysum* Mill. sect. *Stoechadina* (DC.) Gren. & Godr. (Asteraceae, Gnaphalieae). Canadian Journal of Botany 2006; 84: 1203-1232.

Conflict of Interest: None

Source of Funding: This work was supported by MESRS of Algeria (code Project CNEPRU F01220140022), and in part by the Laboratory of Chemistry and Heterocyclic of Clermont Ferrand, France.

Chemical Composition, Antibacterial Activity and Chromosome Number of *Helichrysum italicum* from Algeria

Bouchaala M¹, Ramdani M^{1*}, Chalard P^{2,3}, Figueiredo G⁴, Lograda T¹

¹Laboratory of Natural Resource Valorisation, SNV Faculty, Setif 1 University, 19000 Setif, Algeria.

²SIGMA Clermont, Ecole d'ingénieurs, Institut de Chimie de Clermont Ferrant, CNRS, UMR6296.

³Campus des Cezeaux ; CS 20 265-63178 Aubière cedex

⁴LEXVA Analytique, 460 rue du Montant, 63110 Beaumont, France.

Available Online : 15th October, 2016

ABSTRACT

The hydro-distillation of the essential oil of *Helichrysum italicum* variety *numidicum Pomel* gave a viscous liquid with pale yellow oil. The average yield of essential oil of the samples is 0.03%. The chemical composition of essential oil was analyzed by GC and GC/MS. A total 43 compounds representing 92.9% of the oil were identified in *H. italicum*. The chemical composition is dominated by the presence of major products, Isopropyl tetradecanoate (12.10%), α -pinene (12.02%), Hexadecanoic acid (9.96%), Caryophyllene (E) (9.22%), Ledol (9.11%), Palustrol (5.55%), α -Humulene (4.28%), Caryophyllene <9-epi> (3.75%), α -copaene (3.72%), cis-Calamenene (2.18%). The Essential oil of *H. italicum* was tested for six microorganisms. The oil showed modest effect against all the bacteria tested and it has no significant antifungal activity against the *Candida albicans*. The population of *Helichrysum italicum* shows a terraploïde chromosome number of $2n = 28$ with basic number $x = 7$.

Keywords: *Helichrysum italicum*, Essential oil, Antibacterial activity, Chromosome, Algeria.

INTRODUCTION

The genus *Helichrysum* (Miller) belongs to the Asteraceae family. The genus *Helichrysum* is distributed in the Mediterranean region¹. The species *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don is an aromatic shrub, endemic Mediterranean plant². This species is represented in Algeria by an endemic variety (*numidicum Pomel*)³ (Figure 1). *Helichrysum italicum* has a high economic interest due to its essential oil very sought out by the perfume industry and aromatherapy^{2,4}. The Dried flowers of this species had a great reputation in traditional medicine as choleric, diuretic, cholagogue, expectorant⁵⁻⁷. Many works report that the essential oil of *H. italicum* is an antihematome powerful⁸, so its flowers and leaves are the most used parts in the treatment of health disorders such as allergies, colds, cough, toothache, liver and gallbladder disorders, respiratory and ENT, Digestive disorders, inflammation, infections and sleeplessness⁹⁻¹⁹. The genus is an important source of secondary metabolites²⁰. The most analyzed extract of *H. italicum* is the essential oil⁴. There are many studies of the chemical composition essential oils of *H. italicum* grown in France²¹⁻²⁴, in Italy²², in Portugal²⁸, in Croatia^{29,30}, in Belgrade³¹, in Brazilia³². The chemical composition of essential oils of *H. italicum* in the world is highly variable (Table 1). The major components, having significant variability are α -pinene, neryl acetate, γ -curcumene, limonene, curcumene-ar, β -selinene and α -selinene. It should be noted that the chemical composition of essential

oil of *H. italicum* shows a high level of intra-specific differences in response to plant genetics³³, environmental factors³⁴⁻³⁶, geographical origin and the growing cycle^{21,25}. The biological activities of the many metabolites isolated from *H. italicum*, and especially its volatile fraction have been found to display pharmacological properties, such as anti-inflammatory^{8,20,37}, antiallergic^{8,38}, antioxidant³⁹⁻⁴², antiviral activity and anti-HIV properties²⁰, antimicrobial activity^{29,43-44} and antifungal properties^{29,38}. Cytological studies of this genus have been restricted to a few studies of chromosome numbers and karyotypes, only 10-12% of the species are studied⁴⁵. The available chromosome data indicate that polyploidy played a significant role in the speciation and the evolution of the genus⁴⁶⁻⁴⁸. The chromosome number most commonly found in *Helichrysum* is $2n = 28$, mainly in the Mediterranean, Macaronesian and Asian species⁴⁵. But some records of $2n = 14$ for African species and $2n = 56$ for some East Mediterranean and Asiatic species are also known⁴⁸. The basic chromosome number in *Helichrysum* are $x = 4$ and $x = 7$ ⁴⁵. In the literature, the chromosome number $2n = 42$ is published two times⁴⁸⁻⁴⁹. The chromosome number of $2n = 28$ has been identified in *H. italicum* Subsp. *Microphyllum* from Italy⁴⁸ and Spain⁵. The same chromosome number is confirmed in *H. italicum* subsp. *silcicum* from Italy^{48,50-52}. The aim of these studies is to identify the chemical composition of *H. italicum* (variety *numidicum Pomel*) essential oil and to compare the results to bibliographic data in the world as well as the identification of the

*Author for Correspondence: ramdanimessaoud@yahoo.com



Figure 1: *Helichrysum italicum* var. *numidicum* Pomel (Photo Bouchaala, 2015).

geographical distribution of chemotypes. Furthermore, the investigation of the antibacterial activity of the essential oil and the chromosome count of this species.

MATERIELS AND METHODES

Plant material

Samples of *Helichrysum italicum* were collected in the flowering stage, in eastern Algeria locality (Figure 2). Aerial parts were collected in October 2014. The air dried materials were subjected to hydrodistillation for 3h using a Clevenger apparatus type. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Ecology and Biology, Ferhat Abbas University, Algeria. The oil obtained was collected and dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4°C in sealed brown vials until use.

Essential oil analysis

The essential oils were analysed on a Hewlett-Packard gas chromatograph Model 5890, coupled to a Hewlett-Packard model 5971, equipped with a DB5 MS column (30 m X 0.25 mm; 0.25 µm), programming from 50°C (5 min) to 300°C at 5°C/min, with a 5 min hold. Helium was used as the carrier gas (1.0 ml/min); injection in split mode (1:30); injector and detector temperatures, 250 and 280°C, respectively. The mass spectrometer worked in EI mode at 70 eV; electron multiplier, 2500 V; ion source temperature, 180°C; MS data were acquired in the scan mode in the m/z range 33-450. The identification of the components was based on comparison of their mass spectra with those of NIST mass spectral library^{53,54}, and those described by Adams, as well as on comparison of their retention indices either with those of authentic compounds or with literature values⁵⁵.

Antibacterial activity

One Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592) and four Gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 and *Shigella* sp) and the yeast *Candida albicans*, were used in present study. The bacterial inoculums was prepared from

overnight broth culture in physiological saline (0.8 % of NaCl) in order to obtain an optical density ranging from 0.08-01 at 625 nm. Muller-Hinton agar (MH agar) was poured in Petri dishes, solidified and surface dried before inoculation. Sterile discs (6 mm) were placed on inoculated agar, by test bacteria, filled with 10µl of mother solution and diluted essential oil (1:1; 1:2; 1:5 and 1:10 v/v of DMSO). DMSO was used as negative control. The antibiotic, Gentamicin, Cefotaxime and Colistin sulphate was used as positive control. Then Petri dishes were incubated at 37°C during 18 to 24h aerobically. After incubation, inhibition zone diameters were measured and documented.

Karyology

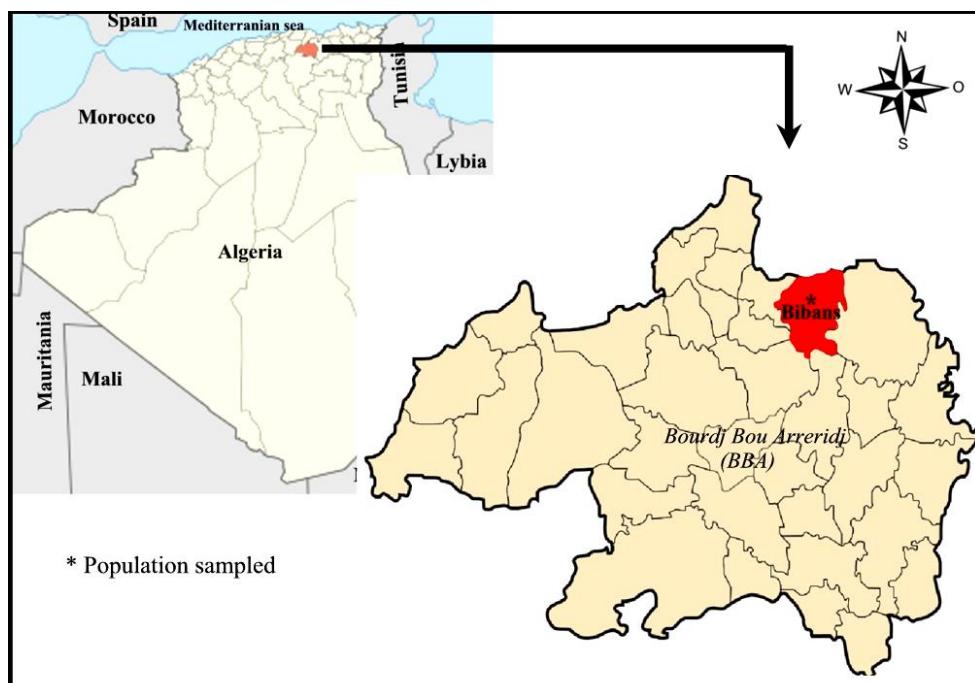
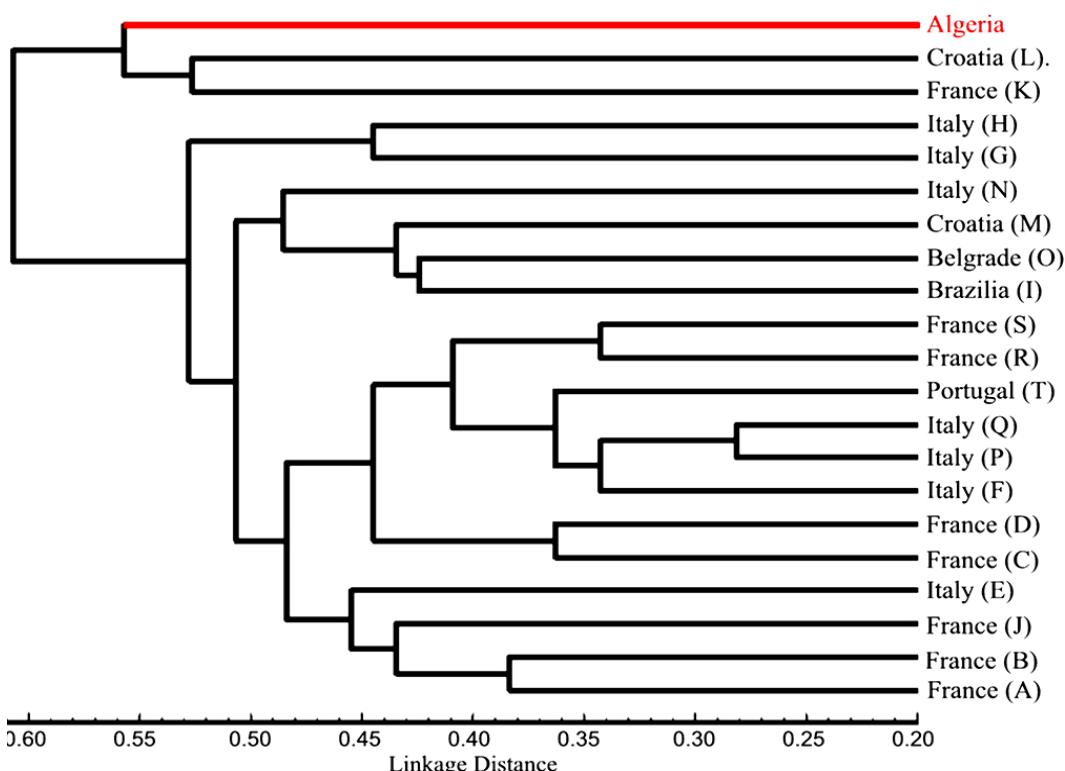
The crushing process is used in the karyotype analysis. The meristems of the roots, resulting from the germination of seeds, are used for chromosomal preparations. A pre-treatment at room temperature for 1 hour 15 minutes was applied before fixation of the root-tips, in a solution of colchicine a 0.05%. After fixation in a mixture of ethanol and acetic acid (3: 1), the roots are stored in ethanol at 70° to the cold, until used. The staining procedure involves the maceration of roots in acetic acid 45% for 15 minutes. The staining of chromosomes is performed in emerging in the roots extremities in acetic orcein by heating for one minute; then cut the meristems and crush them in a drop of orcein.

Statistical analysis

Cluster analysis (UPGMA) was carried out on the original variables and on the Manhattan distance matrix to seek for hierarchical associations among the populations. The cluster analyses were carried out using STATISTICA 10 software.

RESULTS AND DISCUSSION

The hydro-distillation of the essential oil of *H. italicum* subsp. *numidicum* gave a viscous liquid with pale yellow oil. The yield of essential oil of the sample is 0.03%. It is similar with a yield of *H. italicum* subsp. *Italicum* 0.02%^{26,32}. This yield is low compared to those of literature. The oil yield was 0.2% for *H. italicum*^{2,30}, 0.5% for *H. italicum* subsp. *Microphyllum*¹ and they show that the yield of *Helichrysum* varies according to geographical location. The analysis and identification of the components of the essential oil of this species was performed using the (GC/MS). The compounds identified in the oil and their relative abundances are presented in order of their appearance (table 2). This analysis led to identification of 43 compounds representing 92.99 % of the total oil of *H. italicum*. The chemical composition of *H. italicum*'s essential oil in the world shows a high level of intraspecific differences, this is a response to environmental factors^{34,35}, especially soil properties³⁶, geographical origin, the growing cycle^{21,25} and genetic³³. This variability is so pronounced, that the UPGMA analysis did not brought out homogeneous groups, so that we can identify the different chemotypes composing this species. The classification of our populations, according to their chemical kinship relations, is based on the construction of clades. The UPGMA based on the Unweighted pair-group average

Figure 2: Population of *Helichrysum italicum* sampledFigure 3: UPGMA cluster of *Helichrysum italicum* population.

distance and the City-block (Manhattan) (Figure 3), has divided the populations into two clades. Although this is the same species of *H. italicum*, it exhibits enormous difference in the chemical composition of essential oils. Our sample is separated from that of France and the Croatia in the first clade. We noted the individualization of *H. italicum* population studied. This population is rich in isopropyl tetradecanoate (12.10%), α -pinene (12.02%), hexadecanoic acid (9.96%), caryophyllene (E) (9.22%),

Ledol (9.11%). It opposed to the populations of France² and the Croatia²⁹, which are characterized by 2-methylcyclohexyl pentanoate (11.1-8.3%) and neryl acetate (10.4- 11.5%). These populations are close of our population by the presence of α -pinene (12.8-11.2%). The antibacterial activity of the essential oils was evaluated using six microorganisms, using disc diffusion method. The diameters of inhibition zones of essential oils for the microorganisms tested are grouped in the Table 3. The

Table 1: Chemical composition of *Helichrysum italicum* in the world.

Subsp. Country	<i>Italicum</i>								<i>Helichrysum italicum (Roth) Guss. Don</i>						<i>microphyllum</i>			<i>picardii</i>		
	France		Italy			Brazil	France		Croatia		Italy	Belgrade	Italy		France	Portugal				
Authors	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1,4,6,9-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.1	—	—	—	0.2	—	—	—	—	—	—
Trimethyldec-8-en-3,5-dione																				
2,4,6,9-	2.2	2.6	—	—	4.5	—	5.7	2.6	—	4.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tetramethyldec-8-en-3,5-																				
2-Methylcyclohexyl octanoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.4	4.8	—	—	—	—	—	—	—	—
2-Methylcyclohexyl pentanoate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.1	8.3	—	—	—	—	—	—	—	—
Hexanedione <3,4>	—	—	—	—	11.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,5,7,10-Tetramethylundec-9-en-4,6	—	—	3.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,6,9-Trimethyldec-8-en-3,5-dione	3.7	5.6	11	6.2	4.6	—	14.7	8.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4,6-Dimethyloctan-3,5-dione	1.3	2	2.4	0.6	—	—	1	1.4	—	0.9	—	—	—	—	—	—	—	0.8	1.1	—
5,7,10-Trimethylundec-9-en-4,6-	1.7	2.6	6.9	2.6	0.4	—	0.6	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cedren-13-<8-ol>	—	—	—	—	—	4.2	—	—	—	—	6.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Curcumene <ar->	2.3	1.8	6.4	6.4	3.5	—	1.9	1.5	8.3	1.5	2.3	—	4	0.1	1.9	1	0.1	3.9	2.6	2.8
Aromadendrene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.4	—	—	—	—	—	—	—	—
Carvacrol	—	—	1.9	9.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.5	1.5	—
Bergamotene < α -cis->	—	—	—	—	0.5	—	0.7	0.3	—	0.6	—	2.2	—	1.4	—	—	1.6	—	0.2	—
Eremophilene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.3	—	—	—	—	—	0.1	—	—	—
Eudesm-5-en-11-ol	0.8	3.5	—	—	2.3	—	1.8	1.7	—	3.4	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—
Guaiol	0.5	1	—	—	1.1	2.3	0.6	0.3	—	—	2	0.6	—	0.3	—	—	0.2	1.1	3.1	0.2
Hexadecene	—	—	—	—	—	9.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Italicene <iso->	0.7	0.3	0.4	0.5	0.8	16.	0.2	0.2	3.2	0.4	—	—	—	—	—	—	1.2	—	0.3	0.3
Italicene	2.4	1.2	0.9	—	3	—	0.7	0.6	—	1.3	—	—	4.6	—	5.4	1.1	—	1.2	1.3	1.2

Table 1: Chemical composition of *Helichrysum italicum* in the world.

Subsp.	<i>Italicum</i>								<i>Helichrysum italicum (Roth) Guss. Don</i>						<i>microphyllum</i>			<i>picardii</i>		
Country	France				Italy				Brazil	France		Croatia		Italy	Belgrade	Italy		France	Portugal	
Authors	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
Limonene	6.9	2.9	—	—	4.6	—	1.9	7.6	—	4.5	4	3.8	0.6	4.5	2.5	3.5	0.8	—	—	0.5
Linalool	2.4	2.1	3.9	0.5	2.7	—	3.9	1.1	—	2.1	—	1.4	0.4	1.4	0.5	1.7	2.2	3.3	2.2	0.1
Manool	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.2	—	—	—	—	—	—	—
Neryl acetate	36. 3	35	32	8.5	31	—	18.7	33.	29.2	35.	10.4	11.5	3.1	1.5	7.9	73.	60.3	55.7	41.5	—
Neryl isovalerate	—	—	2.5	1.6	0.4	0.5	—	—	0.7	—	—	—	—	—	0.5	1.9	—	—	—	—
Nerol	3.2	4.2	3.9	18.	4	—	1.4	2.2	0.7	2.7	1.1	0.2	0.2	—	0.8	—	6.8	4.4	13.1	—
Neryl propanoate	4.8	4.9	3.6	6.8	5.1	—	4.7	3.8	10.1	3.4	0.7	—	—	0.4	1.4	3.7	5.4	12.7	5.6	—
Caryophyllene <trans>	—	—	—	—	—	—	—	—	2.8	—	5.4	1.1	6.9	7.9	4.7	—	—	—	3.8	—
Bergamotene < α -> trans>	—	—	—	—	0.3	4.7	0.6	0.3	0.7	3.3	—	—	—	0.2	3.2	—	—	—	—	0.6
Amorphene < α ->	—	—	—	3.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cedrene < α ->	—	—	—	—	—	—	—	—	2.4	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—
Copaene < α ->	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—	1.2	0.2	3.6	0.7	3.5	—	—	—	—	—
Eudesmol < α ->	0.2	1	—	—	0.9	0.9	0.3	0.4	—	2.3	2.2	—	—	0.3	—	—	—	1.3	2.9	—
Pinene < α ->	2.7	1.7	—	—	1.8	—	2.0	4.2	0.4	0.8	12.8	10.2	2.8	53.5	15.9	—	—	—	—	53.5
Selinene < α ->	—	—	—	—	—	—	0.6	0.6	3.9	—	—	0.4	5.9	5.2	4.8	—	—	0.4	0.3	1.0
Terpineol < α ->	0.7	1.7	1.0	2.3	0.5	—	1.3	2.1	1.1	0.9	2	1.4	0.49	0.8	0.26	—	—	0.9	1.5	0.4
Caryophyllene < β ->	—	—	—	2.7	—	—	—	1.7	—	—	4.2	—	5.7	—	—	—	—	—	—	—
Costol < β ->	—	—	—	—	—	7.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eudesmol < β ->	0.4	0.8	—	—	1.3	1.4	—	—	—	2.5	3.5	0.5	1.1	—	—	0.7	0.2	1.9	—	—
Selinene < β ->	—	—	—	—	—	—	0.5	0.8	1.6	—	2	1.6	9.9	—	6.9	—	—	0.5	0.4	—
Curcumene < γ ->	3.7	—	5	—	10.7	—	11.1	8.6	18.8	6.6	1.1	—	12.4	1.4	22.5	3.7	12.9	2.5	8.2	27.4
Gurjunene < γ ->	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.4	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—
Cadinene < δ ->	—	—	—	0.6	—	—	0.2	0.1	0.9	—	0.6	0.5	0.9	—	1.5	0.0	3.9	—	—	0.3

A, B⁻²¹; C, D⁻²³; E⁻²⁴; F⁻²⁶; G, H⁻²⁵; I⁻³²; J⁻²²; K⁻²; L⁻²⁹; M⁻³⁰; N⁻²²; O⁻³¹; P, Q⁻²⁷; R, S⁻¹; T⁻²⁸. Table data are used in the UPGMA analysis.

Table 2: Chemical composition of *Helichrysum Italicum* essential oil.

Total	KI	92.99	Total	KI	92.99
Number of compounds		43	Number of compounds		43
Yield (%)		0.03	Yield (%)		0.03
α -pinene	932	12.02	Palustrol	1567	5.55
β -pinene	974	0.67	Thujopsan-2- α -ol	1586	0.08
Limonene	1024	0.20	Caryophyllene oxide	1582	1.14
β -phellandrene	1025	0.80	Gleenol	1586	0.36
n-nonanal	1100	0.32	Ledol	1602	9.11
n-decanal	1201	0.63	Humulene epoxide II	1608	0.18
α -Copaene	1374	3.72	Cubenol-1,10-di-epi	1618	0.27
β -elemene	1389	0.28	Cubenol-1-epi	1627	0.99
α -gurjunene	1409	0.75	α -cadinol-epi	1638	1.83
Caryophyllene (E)	1417	9.22	α -muurolol	1644	0.35
Neryl acetone	1434	0.16	α -cadinol	1652	1.45
α -humulene	1452	4.28	Selin-11-en-4- α -ol	1658	1.59
Caryophyllene-9-epi (E)	1464	3.57	Citronellyl tiglate	1666	0.20
γ -muurolene	1478	0.62	Isopropyl tetradecanoate	1828	12.10
β -ionone (E)	1483	0.26	Hexadecanoic acid	1959	9.96
β -selinene	1489	0.65	Tricosane	2300	0.19
α -selinene	1498	1.30	Tetracosane	2400	0.15
Tridecanal	1509	0.43	Pentacosane	2500	1.39
γ -cadinene	1513	0.58	Hexacosane	2600	0.13
Δ -cadinene	1522	1.01	Heptacosane	2700	0.82
Calamenene-cis	1528	2.18	Nonacosane	2900	0.69
Cadina-1,4-diene-trans	1533	0.84			

The chemical composition of the essential oil of *H. italicum* is dominated by the presence of major compounds, Isopropyl tetradecanoate (12.10%), α -pinene (12.02%), hexadecanoic acid (9.96%), caryophyllene (E) (9.22%), Ledol (9.11%), palustrol (5.55%), α -humulene (4.28%), caryophyllene <9-epi> (3.75%), α -copaene (3.72%) and calamenene-cis (2.18%).

Table 3: Inhibition diameter, (mm) of *Helichrysum italicum*'s essential oil.

Microorganisms	Controls			Inhibition diameter*				
	Cefotaxime	Colistin sulfate	Gentamicine	Dilution	EO	1/2	1/5	1/10
<i>Shigella</i> sp	14	15	30	11.5	10	11.5	9	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	33.5	15	25	14	9	9	0	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	13	17	13	7	7	0	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	18	0	14	9	9	0	
<i>Pseudomonas syringae</i>	18.5	15	22.5	14	0	0	0	
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	

(*) Average inhibition diameter (mm) of three trials

results show that the pure oil of *H. italicum* has moderate activity against all bacteria, producing a (0-14 mm) diameter of inhibition. While its activity is important against the bacterium *S. aureus* compared to gentamicin. The dilutions (1/2) have an effect on all tested bacteria, except against *P. syringae* that is resistant to all dilution. The antibiotics used in this study, as well as *H. italicum*'s oil, have no effect on the growth of the fungus *Candida albicans*. This inhibition was dependent on the sensitivity of the bacteria tested. All tested bacteria are sensitive to the antibiotics except *Staphylococcus aureus* that is resistant to the gentamicine. The *candida albicans* fungus is resistant to the antibiotics tested. The bacteriological results of *H. italicum* are similar to those in the literature. The essential oil is active against *Staphylococcus aureus*

and *Echerichia coli*^{29,43,44}. Other studies have showed that the extracts from *H. italicum* have the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus* sp.⁵⁶⁻⁵⁹. Our investigation show a moderate inhibition of grows bacteria tested. The results showed that the oil of *H. italicum* subsp. *Numidicum* from Algeria does not look like those of the literature reporting on antifungal properties. A strong antifungal activity of *H. italicum* against *Globisporangium ultimum* is reported³⁸; While the oil of this species inhibits growth of *Candida albicans*²⁹. There is accordance with previous counts for this species. The observation of metaphase plates of *H. italicum* allowed us to identify a karyotype with a tetraploïde chromosome number ($2n = 4x = 28$); whose base number is $x = 7$ (Figure 4). This subspecies *numidicum*, endemic from Algeria, its distribution is very

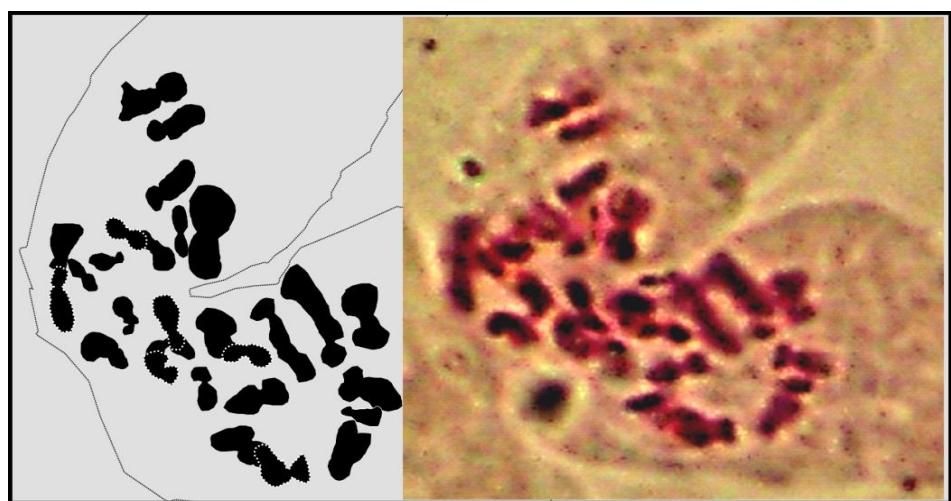


Figure 4: Caryotype of *Helichrysum italicum* ($2n = 4x = 28$). (Magnification = HI 100X).

limited. We obtained the first chromosome number on material from Bibans (Bourdj Bouarreridj) Algeria $2n = 28$. Our results agree with previous reports for material from Corsica⁶⁰ and Sardinia⁵². The same result is obtained for *H. italicum* subsp. *Microphyllum* from Italy⁴⁸ and Spain⁵⁰. The same chromosome number is confirmed in *H. italicum* subsp. *silcicum* from Italy^{45,48, 50-52}.

CONCLUSION

The essential oil of *Helichrysum italicum* subsp. *numidicum*, collected from Bibans region is characterized by the main presence of Isopropyl tetradecanoate (12.1%), α -pinene (12.02%), Hexadecanoic acid (9.96%), Caryophyllene (E) (9.22%), Ledol (9.11%), Palustrol (5.55%), α -humulene (4.28%). We also note that the chemical composition of the Bibans sample differs from those reported in the literature. These variations may be explained by the different climates, seasons, geographic and soil conditions as well as altitude differences and harvest periods of the plant. The antibacterial activity of *H. italicum* subsp. *numidicum* essential oils is tested on for bacterial strains. The results show that the essential oil of this species has significant inhibitory action on almost all the bacteria tested. The chromosome number of *H. italicum* subsp. *numidicum* is stable and similar to bibliographic results. The chromosome count of the Bibans population is determined, and the number is tetraploïde with $2n = 4x = 28$ and a basic chromosome number with $x = 7$.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by MESRS of Algeria and in part, by the Laboratory of Chemistry and Heterocyclic of Clermont Ferrand, France.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests

REFERENCES

- Perrini R, Morone-Fortunato I, Lorusso E, Avato P. lands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*. Ind. Crop. Prod 2009; 29: 395-403.
- Mastelić J, Politeo O, Jerković I. Contribution to the Analysis of the Essential Oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. – Determination of Ester Bonded Acids and Phenols. Molecules 2008; 13: 795-803
- Quézel P et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol., 1963 Ed CNRS, Paris.
- Leonardi M, Ambrysiewska KE, Melai B, Flamini G, Cioni PL, Parri F, Pistelli L. Essential-oil composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). Chemistry & Biodiversity 2013; 10: 343-355.
- Chinou IB, Roussis V, Perdetzolou D and Loukis A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. Planta Med 1996; 62: 339-377.
- Chinou IB, Roussis V, Perdetzolou D, Tzakou O, Loukis A. Chemical and antibacterial studies of two *Helichrysum* species of Greek origin. Planta Med 1997; 63: 181-183.
- Litvinenko VI, Popova P, Popova NV and Bubenchikova VN. Medicinal plants and preparations derived from them. Farmaseotichnyi Zhurnal 1992; 53: 83-84
- Voinchet V Giraud-Robert AM. Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. Phytothérapie 2007; 5: 67-72.
- Schnaubelt K, Medical aromatherapy - healing with essential oils, 1999 1st ed. Frogs Ltd., Berkeley.
- Peris JB, Stubing G, Romo A, Plantas Medicinales de la Peninsula Iberica e Islas Baleares. 2001 Ediciones Jaguar, Madrid.
- Pieroni A. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. Journal of Ethnopharmacology 2000; 70: 235-273.
- Pardo de Santayana M, Blanco E, Morales R. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmacological review. Journal of Ethnopharmacology 2005; 98: 1-19.

13. Barber A, Rendero S, Corbi M, Alba B, Molina D, Barber JX. Aproximación al conocimiento etnobiológico y etnoecológico de Ibi (Foia de Castalla-L'Alcoià, Alicante). 2005 Identia Institute, Spain.
14. Parada M. Estudi etnobotànic de la comarca de l'Alt Empordà. PhD Thesis, 2007 University of Barcelona, Barcelona
15. Passalacqua NG, Guarnera PM, De Fine G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). Fitoterapia 2007; 78: 52-68.
16. Redzic SS. The ecological aspect of ethnobotany and ethnopharmacology of population in Bosnia and Herzegovina. Collegium Antropologicum 2007; 31: 869-890.
17. Latorre JA. Estudio etnobotánico de la provincia de La Coruña. PhD Thesis, 2008 University of Valencia, Valencia.
18. Benítez G, González-Tejero MR, Molero-Mesa J. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. Journal of Ethnopharmacology 2010; 129: 87-105.
19. Antunes VD, De Oliveira AP, Salgueiro L, De Oliveira JM, De Oliveira RP. *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data, Journal of Ethnopharmacology 2013; 58p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.005>
20. Appendino G, Ottino M, Marquez N, Bianchi F, Giana A, Ballero M, Sterner O, Fiebich BL, Munoz E. Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol-pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*. J. Nat. Prod 2007; 70: 608-612.
21. Bianchini A, Tomi P, Costa J, Bernardini AF. Composition of *Helichrysum italicum* G. Don fil. subsp. *Italicum* essential oils from Corsica (France). Flav. Fragr. J 2001; 16: 30-34.
22. Bianchini A, Tomi P, Morelli I, Costa J, Bernardini AF, Flamini G, Cioni L, Usaï M and Marchetti M. A comparative study of volatile constituents of two *Helichrysum italicum* (Roth) Guss. Don Fil subspecies growing in Corsica (France), Tuscany and Sardinia (Italy), Flavour Fragr. J 2003; 18: 487-491.
23. Morone-Fortunato I, Montemurro C, Ruta C, Perrini R, Sabbeta W and Blanco A. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. Ind. Crop. Product 2010; 32: 639-649.
24. Cristofari G, Znini M, Majidi L, Costa J, Hammouti B, Paolini J. *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* Essential Oil as Environmentally Friendly Inhibitor on the Corrosion of Mild Steel in Hydrochloric Acid, Int. J. Electrochem. Sci 2012; 7: 9024-9041.
25. Paolini J, Desjobert JM, Costa J, Bernardini AF, Buti Castellini C, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. Composition of essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil subsp. *italicum* from Tuscan archipelago islands, Flavour Fragr. J 2006; 21: 805-808.
26. Mancini E, De Martino L, Marandino A, Scognamiglio MS, De Feo V. Chemical Composition and Possible *in Vitro* Phytotoxic Activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *Italicum*, Molecules 2011; 16: 7725-7735.
27. Melito S, Petretto GL, Podani J, Foddai M, Maldini M, Chessa M, Pintore G. Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. Industrial Crops and Products 2016; 80: 242-250.
28. Costa P, Miguel Loureiro J, Teixeira MA, Rodrigues AE. Extraction of aromatic volatiles by hydrodistillation and supercritical fluid extraction with CO₂ from *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* growing in Portugal. Industrial Crops and Products 2015; 77: 680-683.
29. Mastelić J, Politeo O, Jerković I, Radosevic N. Composition and Antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* Essential oil and its terpene and terpenoid. Chemistry of Natural Compounds 2005; 41(1): 35-40.
30. Ivanovic J, Ristic M, Skala D. Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plant material. J. of Supercritical Fluids 2011; 57: 129-136.
31. Stupar M, Grbic ML, Dzamic A, Unkovic N, Ristic M, Vukojevic J, Unkovic N. Antifungal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (Asteraceae) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects. Arch. Biol. Sci., Belgrade 2014; 66(4), 1539-1545.
32. Nebojsa VK, Goran TA, Milica MR, Branislava US, Nevena NG, Emilia IS, and Biljana NB. Biochemical Characterization of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don subsp. from Montenegro: Phytochemical Screening, Chemotaxonomy, and Antioxidant Properties. Chemistry & Biodiversity, 2015; 12(3): 419-31
33. Shafie MSB, Zain Hasan SM, Shah MS. Study of genetic variability of Wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) using inter simple sequence repeat (ISSR) in Pahang region, Malaysia. Plant Omics J 2009; 2: 127-134
34. Purohit S, Vyas S. Medicinal Plant Cultivation: A scientific approach including Processing and Financial Guidelines, 2004 1st Ed. Publishers Agrobios, Jodhpur, India, pp. 1-3.
35. Loziene K, Venskutonis PR. 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. Biochem.Syst. Ecol 2005; 33: 517-525.
36. Bianchini A, Santoni F, Paolini J, Bernardini AF, Mouillet D, Costa J. Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. Essential oil. Chemistry & Biodiversity 2009; 6: 1014-1033.
37. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Máñez S, Giner RM, Cerdà NM, Ríos JL. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger

- activity of tiliroside. Eur. J. Pharmacol 2003; 461: 53-61.
38. Angioni A, Barra A, Arlorio M, Coisson JD, Russo MT, Pirisi FM, Satta M, Cabras P. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *michrophyllum* (Willd) Nym. J. Agric. Food Chem 2003; 51: 1030-1034.
39. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazzoa P., Ríos, JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. Life Sciences 2002; 70: 1023-1033.
40. Sala A, Recio MC, Giner RM, Manez S, Rios JL. New acetophenone glucosides isolated from extracts of *Helichrysum italicum* with anti-inflammatory activity. J. Nat. Prod 2001; 4(10): 1360-1362.
41. Sala A, Recio M, Giner RM, Manez S, Tournier H, Schinella G, Ríos JL. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. J. Pharm. Pharmacol 2002; 54(3): 365-371.
42. Rosa A, Deiana M, Atzeri A, Corona G, Incani A, Melis MP, Appendino G, Dessa MA. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyronephloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *michrophyllum*. Chem. Biol. Interact 2007; 165: 117-126.
43. Chao S, Young G, Oberg C, Nakaoka K. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. Flavour and Fragrance Journal 2008; 23: 444-449.
44. Galbany-Casal M, Garcia-Jacas N, Sáez L, Susanna A, Benedí C. Phylogeny, biogeography, and character evolution in Mediterranean Asiatic and Macaronesian *Helichrysum* (*Asteraceae*, *Gnaphalieae*) inferred from nuclear phylogenetic analyses. International Journal of Plant Science 2009; 170: 365-380.
45. Carr GD, King RM, King A, Powell M, Robinson H. Chromosome numbers in *Compositae* XVIII. American Journal of Botany 1999; 86: 1003-1013.
46. Castro M and Rosselló JA. Karyological observations on plant taxa endemic to the Balearic Islands. Journal of the Linnean Society 2007; 153: 463-476.
47. Galbany-Casal M and Romo A. Polyploidy and new chromosome counts in *Helichrysum* Mill. (*Asteraceae*, *Gnaphalieae*). Botanical Journal of the Linnean Society, 2008; 158: 511-521.
48. Febles R. Estudios en la flora Macaronésica: algunos números de cromosomas VI. Botánica Macaronésica 1989; 17: 57-71.
49. Galbany-Casals M, Sáez L, Benedí C. A taxonomic revision of *Helichrysum* Mill. sect. *Stoechadina* (DC.) Gren. & Godr. (*Asteraceae*, *Gnaphalieae*). Canadian Journal of Botany 2006; 84: 1203-1232.
50. Bacchetta G, Brullo S, Mossa L. Note tassonomiche sul genere *Helichrysum* Miller (*Asteraceae*) in Sardegna. Informatore Botanico Italiano 2003; 35(1): 217-225.
51. D'Amato G. Numeri cromosomici per la Flora Italiana 67-80. Informatore Botanico Italiano 1971; 3: 124-157.
52. Masada Y. Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. 1976 Halsted, Nueva York., 34 p.
53. NIST. Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH. 2002 Mass Spectral Library. vers.
54. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4th Ed. Carol Stream, IL, 2007 Allured Publishing Corporation. USA, 804p.
55. Rossi PG, Berti L, Panighi J, Luciani A, Maury J, Muselli A. Antibacterial action of essential oils from Corsica. Journal of Essential Oil Research 2007; 19: 176-182.
56. Cosar G and Cubukcu B. Antibacterial activity of *Helichrysum* species growing in Turkey. Fitoterapia 1990; 1(LXI): 161-164.
57. Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germano MP, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob. Agents 2001; 17: 517-520.
58. Nostro A, Cannatelli MA, Musolino AD, Procopio F, Alonzo V. *Helichrysum italicum* extract interferes with the production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus*. Lett. Appl. Microbiol 2002; 35: 181-184.
59. Nostro A, Cannatelli MA, Crisafi G, Musolino AD, Procopio F, Alonzo V. Modification of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract. Lett. Appl. Microbiol 2004; 38: 423-427.
60. Contandriopoulos J. Recherches sur la flore endémique de la Corse et sur ses origines. Annales de la Faculté des Sciences de Marseille 1962; 32: 1-354.

الملخص

تم استخلاص الزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية للنباتات *H. lactuem* var. *typicum*, *H. italicum* var. *numidicum* و *H. stoechas* ssp. *rupstre*, *H. stoechas* ssp. *scandens* تحت التوقيتين d' و d². تم الحصول على مركبات من شرق الجزائر بواسطة التقطر المائي. أسفرت عملية الاستخلاص عن سائل لزج مع مردود ضعيف قدره 0.025%. أظهر التحليل الكيميائي للزيوت العطرية للنباتات *Helichrysum* بواسطة كروماتوجرافيا الغازية المزاوجة بالمطيافية الكلية GC-SM وجود 46 مركب مع وجود تباين كبير بين هذه الأنواع. يؤكد التحليل الإحصائي انقسام أنواع جنس *Helichrysum* على أساس تقييم النشاطية ضد المكوروية للزيوت الأساسية لأنواع من *Helichrysum*. تأثيراً متواضعاً ضد جميع البكتيريا التي تم اختبارها، في حين أنها لم تظهر أي نشاط ضد الخميرة *Candida albicans*. تقييم نشاط السمية الخلوية للزيوت الأساسية لأنواع التابعة لجنس *Helichrysum* على خلايا سرطانية MCF-7، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الزيوت الأساسية لأنواع جنس *Helichrysum* ليس لها أي نشاط سمي على الخلايا السرطانية MCF-7. مكنت الدراسة الكاربولوجية لأنواع من جنس *Helichrysum* تحديد عدد كروموسومي رباعي الصيغة 28 = 4x = 2n = 28 مع العدد الأساسي 7 = x لكل الأنواع المدروسة التابعة لهذا الجنس.

الكلمات المفتاحية: زيت أساسي، تركيب كيميائي، دراسة كاربولوجية، كروموسوم، السمية الخلوية، نشاط مضادات الميكروبات، MCF-7، الجزائر.

Etude Phytochimique, activités biologiques et caryologique des huiles essentielles du genre *Helichrysum* Auct. Plur. de l'Est Algérien

Résumé

L'extraction des parties aériennes des huiles essentielles d'*Helichrysum italicum* var *numidicum* et *H. lactuem* var *typicum* et de deux sous espèces, *H. stoechas* ssp *scandens* et *H. stoechas* ssp *rupstre*, a été réalisée par hydro distillation, l'extraction a donné un liquide visqueux avec un rendement faible avec une moyenne de 0,025%. La composition chimique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* a été analysée par GC et GC/MS. L'analyse a permis d'identifier 46 composées avec la présence d'une variabilité interspécifique importante. L'analyse statistique confirme la séparation des espèces de genre *Helichrysum* avec la présence de variabilité chimique entre ces espèces. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du genre *Helichrysum* a montré un effet modeste contre toutes les bactéries testées, alors qu'elles ne présentent aucune activité antifongique significative contre *Candida albicans*. L'évaluation de l'activité cytotoxique des huiles essentielles des espèces du genre *Helichrysum* a été réalisée sur une lignée des cellules cancéreuse mammaire. Les résultats obtenus ont montré que les huiles essentielles des espèces n'ont aucune activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses MCF7. L'étude caryologique du genre *Helichrysum* a permis de déterminer un nombre chromosomique tétraploïde 2n = 4x = 28 avec un nombre de base x = 7 pour chacune de ses espèces.

Mots clefs: *Helichrysum*, Huile essentielle, Composition chimique, Caryologie, Chromosome, Cytotoxicité, activité antimicrobienne, Algérie.

Phytochemical, karyological and biological activities of the genus *Helichrysum* Auct. pl. from the East of Algeria

Abstract

Extraction of the aerial parts of the essential oils of *Helichrysum italicum* var *numidicum* and *H. lactuem* var *typicum* and two subspecies, *H. stoechas* ssp *scandens* and *H. stoechas* ssp *rupstre*, was carried out by hydro distillation. The extraction gave a viscous liquid with a low yield with an average of 0.025%. The chemical composition of the essential oils of the genus *Helichrysum* was analyzed by GC and GC / MS. The analysis identified 46 compounds with the presence of significant interspecific variability. Statistical analysis confirms the separation of the genus *Helichrysum* species with the presence of chemical variability between these species. Evaluation of the antimicrobial activity of *Helichrysum* essential oils has shown a modest effect against all bacteria tested, while they show no significant antifungal activity against *Candida albicans*. Evaluation of the cytotoxic activity of the essential oils of the species of the genus *Helichrysum* was carried out on a line of breast cancer cells. The results obtained showed that the essential oils of the species have no cytotoxic activity on MCF7 cancer cells. The karyology study of the genus *Helichrysum* made it possible to determine a tetraploid chromosomal number 2n = 4x = 28 with a base number x = 7 for each of its species.

Keywords: *Helichrysum*, Essential oil, Chemical composition, Caryology, Chromosome, Cytotoxicity, antimicrobial activity, Algeria