

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

People's Democratic Republic of ALGERIA
Ministry of Higher Education and Scientific Research



ZIANE ACHOUR'S UNIVERSITY, DJELFA
FACULTY OF PURE SCIENCES AND COMPUTER
SCIENCE
Department of Chemistry



PhD THESIS IN CHEMISTRY OPTION: **ORGANIC CHEMISTRY AND
NATURAL SUBSTANCES**

By:

Miss HEBBACHE Zahida Yasmina

Topic

**Phytochemical investigation of *Deverra Scoparia* and
Pogostemon Cablin extracts**

This Thesis was defended on **November 2, 2023**

In front of the members of the jury:

| | | | |
|----------------|--------------------------------|-----------|--|
| President : | Mr A. BACHA | MCA | ZIANE ACHOUR'S University, DJELFA |
| Examiners : | Mr N. BELKHEIRI | MCA | ZIANE ACHOUR'S University, DJELFA |
| | Mrs F. Z. BATANA | MCA | AMMAR THELIDJI'S University, LAGHOUAT |
| | Mr L. SAOULI | MCA | ZIANE ACHOUR'S University, DJELFA |
| | Mr M. AMARI | Professor | USTHB |
| Supervisor: | Mr Y. FOUJIL CHERIF | Professor | USTHB |
| Co-supervisor: | Mr M. FODILI | Professor | ZIANE ACHOUR'S University, DJELFA |

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ZIANE ACHOUR DE DJELFA
FACULTE DES SCIENCES EXACTES ET
INFORMATIQUES
Département de Chimie



EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN CHIMIE
OPTION : **CHIMIE ORGANIQUE ET SUBSTANCES NATURELLES**

Par

Melle HEBBACHE Zahida Yasmina

Thème

Investigation phytochimique des extraits de *Deverra Scoparia* et du *Pogostemon Cablin*

Soutenu le : 02/11/2023

Devant le jury :

| | | | |
|-------------------------|--------------------------------|------------|---------------------------------------|
| Président : | Mr A. BACHA | MCA | Université ZIANE ACHOUR DJELFA |
| Examineurs : | Mr N. BELKHEIRI | MCA | Université ZIANE ACHOUR DJELFA |
| | Mm F. Z. BATANA | MCA | Université AMMAR THELIDJI LAGHOUAT |
| | Mr L. SAOULI | MCA | Université ZIANE ACHOUR DJELFA |
| | Mr M. AMARI | Professeur | USTHB |
| Directeur de thèse : | Mr Y. FOUJIL CHERIF | Professeur | USTHB |
| Co-directeur de thèse : | Mr M. FODILI | Professeur | Université ZIANE ACHOUR DJELFA |

DEDICACES

A ma grand-mère. En témoignage de ma profonde affection, qu'elle sache que ce travail est en partie le fruit de son soutien. Je lui suis très reconnaissante. Qu'ALLAH lui prête longue vie.

A mes parents et mes sœurs adorées Assia et Chaima. Merci pour votre amour, votre patience et vos encouragements.

A ma nièce adorée Noor et à mon beau-frère.

A mes tantes et mes oncles.

A toute ma famille et mes ami (es)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur FOUJIL-CHERIF Yazid. Je tiens à le remercier de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet, pour ses conseils fructueux, sa patience et sa disponibilité. Qu'il trouve ici ma sincère considération et mes sincères remerciements.

Je présente mes remerciements les plus vifs à mon co-directeur de thèse Professeur FODILI Mokhtar pour son aide et sa disponibilité. Je vous suis très reconnaissante pour vos encouragements, vos orientations, ainsi que la confiance que vous m'avez accordée.

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (U.S.T.H.B). Je remercie Madame BOUDARENE Lynda de m'y avoir accueilli.

Je tiens à remercier les responsables pédagogiques de l'université de Ziane Achour et le personnel administratif pour leur soutien inestimable. Que ces personnes trouvent ici l'expression de ma plus grande reconnaissance

Je présente mes remerciements les plus distingués aux Professeurs Mr A. BACHA (Président du jury), Mr N. BELKHEIRI (Examineur), Mm F. Z. BATANA (Examinatrice), Mr L. SAOULI (Examineur) et Mr M. AMARI (Examineur) d'avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de ma soutenance. Je vous remercie d'avoir enrichi cette étude par vos expertises et vos expériences respectives.

Aucun mot ne suffira à exprimer ma très grande gratitude envers Madame BELFADEL Ouahiba. Je te serai éternellement reconnaissante pour ta gentillesse, tes encouragements, tes orientations, et ton aide précieuse. Merci d'avoir partagé toute cette expérience avec moi.

Il me serait impossible de ne pas remercier Monsieur MOHAMMEDI Hichem pour sa disponibilité et ses orientations scientifiques rigoureuses durant la rédaction de l'article.

J'adresse mes remerciements au département de Pharmacotoxicologie–SAIDAL en particulier à madame NEGAB Imane qui m'a permis de réaliser toutes les activités pharmaco-biologiques au sein du laboratoire.

Toute ma reconnaissance et ma gratitude sont adressées à BLIDI Mahmoud pour son soutien constant durant ce long travail.

Spécial remerciement à Madame OURABIA Imane pour son soutien permanent, ses encouragements et surtout ses précieuses orientations.

Merci à tous les membres du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle et du département de chimie pour leur assistance morale et matérielle pour la réalisation de ce travail.

Je remercie également l'ensemble des membres du Centre de Recherche en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) pour l'aide technique qu'ils m'ont apportée.

A mes amis thésards et ex-thésards, merci d'avoir partagé cette aventure scientifique et humaine avec moi, je vous souhaite à tous de la réussite, de la consécration et brillante carrière.

Enfin j'exprime mes remerciements à tous ceux qui, ont participé d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

Zahida.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم النباتات الطبية عن طريق استخراج وتحديد المكونات النشطة المختلفة الموجودة في الأجزاء الهوائية من *Deverra Scoparia (Pituranthos Scoparius)* و *Pogostemon Cablin* المسمى *Patchouli*. تم جمع الأجزاء الهوائية من نوع *Pituranthos Scoparius* على مدى موسمين في ثلاث محطات مختلفة في تمناست بالجزائر. تم استخراج الزيوت الأساسية من *Pituranthos Scoparius* و *Pogostemon Cablin* من خلال ثلاث طرق، وهي: التقطير المائي (HD)، والتقطير المائي بمساعدة الميكروويف (MAE) والتقطير بالبخار (SD). تم إجراء عمليات تحديد وتقدير المستخلصات المتطايرة التي تم الحصول عليها بواسطة كروماتوغرافيا الغاز (GC) والكروماتوغرافيا الغازية إلى جانب قياس الطيف الكتلي (GC-MS). كما تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية.

تم تحليل المستخلصات من *Pituranthos Scoparius* لخصائصها المضادة للأكسدة ومحتوى البوليفينول والفلافونويد من خلال دراسة مقارنة باستخدام طرق استخلاص متعددة. يتم الاستخلاص بالمذيبات العضوية ذات القطبية المتزايدة (الأسيتون، الإيثانول، أسيتات الإيثيل، الميثانول) على *Pituranthos Scoparius*. تقنيات الاستخراج المستخدمة للحصول على المستخلصات المائية هي: النقع الكلاسيكي، الاستخلاص بالإغلاء، والتسريب، والاستخراج بمساعدة الموجات فوق الصوتية.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقتين، وهما: اختبار DPPH و FRAP. كذلك، من أجل المساهمة في تقييم النبات الطبي الجزائري *Pituranthos Scoparius*، تمت دراسة الأنشطة الدوائية: المضادة للالتهابات، والسمية الحادة والمسكنة للمستخلصات والزيوت الأساسية المختلفة.

الكلمات المفتاحية: *Pituranthos Scoparius*؛ *Deverra Scoparia*؛ نشاط مضادات الميكروبات؛ نشاط مسكن؛ GC-MS؛ *Pogostemon Cablin*؛ زيت أساسي

Résumé

Le but de ce travail est de valoriser les plantes médicinales par l'extraction et l'identification des différents composants actifs présents dans les parties aériennes de *Deverra Scoparia* (*Pituranthos Scoparius*) et *Pogostemon Cablin* appelé Patchouli.

Les parties aériennes de l'espèce *Pituranthos Scoparius* ont été recueillies sur deux saisons dans trois stations différentes à Tamanrasset en Algérie. L'extraction des huiles essentielles de *Pituranthos Scoparius* et du *Pogostemon Cablin* a été réalisée par trois méthodes à savoir : par hydrodistillation (HD), Hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAE) et entraînement à la vapeur (SD). Les identifications et les quantifications des extraits volatils obtenus, ont été effectuées par Chromatographie en phase Gazeuse (GC) et par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été également évaluées.

Les extraits bruts de la *Pituranthos Scoparius* ont été analysés pour leurs propriétés anti-oxydantes, teneur en polyphénols et en flavonoïdes par une étude comparative en utilisant plusieurs méthodes d'extraction. Des extractions avec des solvants organiques de polarité croissante (acétone, éthanol Acétate d'éthyle, méthanol) ont été réalisées sur la *Pituranthos Scoparius*. Les techniques d'extraction utilisées pour obtenir des extraits aqueux sont la macération classique, la décoction, l'infusion et l'extraction assistée par ultrasons.

L'activité anti-oxydante a été évaluée par deux méthodes à savoir : le test de DPPH et le pouvoir réducteur FRAP. Aussi, dans le but de contribuer à la valorisation de la plante médicinale Algérienne *Pituranthos Scoparius*, les activités pharmacologiques : anti-inflammatoire, toxicité aiguë et analgésique de différents extraits et huiles essentielles ont été étudiées.

Mots-clés : *Deverra Scoparia* ; *Pituranthos Scoparius* ; activité antimicrobienne ; activité analgésique ; GC-MS ; *Pogostemon Cablin* ; Huile essentielle.

Abstract:

The aim of this work is to valorize medicinal plants by extracting and identifying the different active components present in the aerial parts of *Deverra Scoparia* (*Pituranthos Scoparius*) and *Pogostemon Cablin* called Patchouli.

Aerial parts of the species *Pituranthos Scoparius* were collected over two seasons in three different stations at Tamanrasset in Algeria. The extraction of essential oils from *Pituranthos Scoparius* and *Pogostemon Cablin* was carried out by three methods: hydrodistillation (HD), microwave-assisted hydrodistillation (MAE) and steam distillation (SD). The identifications and quantifications of the volatile extracts obtained were analyzed by Gas Chromatography (GC) and by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). The antimicrobial activity of essential oils was also evaluated.

The crude extracts of *Pituranthos Scoparius* were analyzed for their antioxidant properties, polyphenol and flavonoid content by a comparative study using several extraction methods. Extractions with organic solvents of different polarity (acetone, ethanol, ethyl acetate, and methanol) are used on *Pituranthos Scoparius*. The extraction techniques used to obtain aqueous extracts are classic maceration, decoction, infusion and ultrasonic assisted extraction.

The antioxidant activity was evaluated by two methods, namely: the DPPH test and the FRAP reducing power. Also, in order to contribute to the valorization of the Algerian medicinal plant *Pituranthos Scoparius*, the pharmacological activities: anti-inflammatory, acute and analgesic toxicity of different extracts and essential oils have been studied.

Keywords : *Deverra Scoparia* ; *Pituranthos Scoparius* ; antimicrobial activity ; analgesic activity ; GC-MS ; *Pogostemon Cablin* ; Essential oil.

Liste des abréviations et acronymes

| | |
|------------------------|--|
| AcOEt | Acétate d'éthyle |
| AFNOR | Association Française de Normalisation |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHA | Hydroxyanisole butylé |
| BHT | Butyl Hydroxy Toluène |
| CE | Electrophorèse capillaire |
| CFT | Composés flavonoïdes totaux |
| CFU | Colony Forming Unit |
| CMI | Concentration minimale inhibitrice |
| CG | Chromatographie en phase gazeuse |
| CPT | Composés phénoliques totaux |
| DL50 | Dose provoquant 50% de mortalité dans la population |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DPPH | 2,2- diphenyl-1-picrilhydrazyl |
| EA | Extrait aqueux |
| EM | Extrait méthanolique |
| EtOH | Ethanol |
| FRAP | Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter |
| GPS | Global Positioning System |
| HD | Hydrodistillation |
| HE | Huiles essentielles |
| HS-SPME | Head space solid phase microextraction |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IC₅₀ | Concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres |
| II | Illamane |
| IK | Indices de Kovats |
| MAE | Hydrodistillation assistée par micro-onde |
| MAHD | Hydrodistillation à air micro-ondes |
| MHG | Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité |
| MeOH | Methanol |
| MS | Spectroscopie de masse |
| NFRI | Institut National de Recherche Forestière |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| Ou | Oued Iguioui |
| RI | Indice de rétention |
| SD | Entrainement à la vapeur |
| SFME | Extraction par micro-ondes sans solvant |
| Ta | Taessa |
| UV | Ultra-violet |
| VMHD | Hydrodistillation par micro-ondes sous vide |
| WBD | Distillation à bulles d'eau |
| FID | Détecteur à ionisation de flamme |
| Twen 80 | Polysorbate 80 |

Liste des figures

| | | |
|------------------|--|----|
| Figure 1 | Extraction par hydrodistillation..... | 6 |
| Figure 2 | Extraction par entraînement à la vapeur..... | 6 |
| Figure 3 | Extraction par hydrodiffusion..... | 7 |
| Figure 4 | Extraction au CO ₂ supercritique..... | 9 |
| Figure 5 | Le mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries..... | 16 |
| Figure 6 | Principales classes de composés phénoliques. Ceux-ci comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les stilbènes..... | 19 |
| Figure 7 | Photographie montrant l'espèce <i>Pituranthos Scoparius</i> | 30 |
| Figure 8 | Photographie montrant l'espèce <i>Pogostemon Cablin</i> | 37 |
| Figure 9 | <i>Pituranthos Scoparius</i> plante entière..... | 43 |
| Figure 10 | Population de <i>Pituranthos Scoparius</i> (<i>Deverra Scoparia</i>) étudiée..... | 44 |
| Figure 11 | <i>Pogostemon Cablin</i> plante entière..... | 44 |
| Figure 12 | Le montage expérimental pour l'extraction d'huile essentielle en utilisant la méthode d'hydrodistillation par micro-ondes..... | 45 |
| Figure 13 | Courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 50 |
| Figure 14 | Courbe d'étalonnage de la Quercétine..... | 51 |
| Figure 15 | Courbe des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration en BHT..... | 52 |
| Figure 16 | Photographies montrant les étapes expérimentales de l'activité anti-inflammatoire..... | 57 |
| Figure 17 | Influence de la méthode d'extraction sur le rendement de l'huile essentielle de <i>P. Scoparius</i> | 61 |
| Figure 18 | Influence des méthodes d'extraction sur les classes chimiques des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> | 63 |
| Figure 19 | Composés majoritaires de <i>P. Scoparius</i> | 68 |
| Figure 20 | Comparaison entre les principaux composants des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> extraites par hydrodistillation, | |

| | | |
|------------------|--|-----|
| | hydrodistillation assistée par micro-ondes et entrainement à la vapeur..... | 60 |
| Figure 21 | Activité anti-inflammatoire de Diclofénac et des huiles essentielles et de <i>P. Scoparius</i> extraites par HD, MAE et SD.... | 76 |
| Figure 22 | Pourcentage d'inhibition des spasmes de l'huile essentielle et des extraits de <i>P. Scoparius</i> | 78 |
| Figure 23 | Influence de la méthode d'extraction sur le rendement de l'huile essentielle de <i>P. Cablin</i> | 79 |
| Figure 24 | Influence des méthodes d'extraction sur les classes chimiques des huiles essentielles de <i>P. Cablin</i> | 80 |
| Figure 25 | Comparaison entre les principaux composants des huiles essentielles de <i>P. Cablin</i> extraites par hydrodistillation, hydrodistillation assistée par micro-ondes et entrainement à la vapeur..... | 81 |
| Figure 26 | Photographies montrant les zones d'inhibitions des huiles essentielles de <i>P. Cablin</i> extraites par trois méthodes différentes | 86 |
| Figure 27 | Rendements des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> récoltée dans différentes régions et durant deux saisons..... | 90 |
| Figure 28 | Comparaison entre les classes chimiques des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> récoltée dans différentes régions et durant deux saisons | 91 |
| Figure 29 | Comparaison entre les principaux composants des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> récoltée dans différentes régions et deux saisons..... | 96 |
| Figure 30 | Photographies montrant les zones d'inhibitions des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> collectés dans différentes régions et saisons..... | 98 |
| Figure 31 | Influence des solvants et des techniques d'extraction sur la teneur en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante de <i>P. Scoparius</i> | 102 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figure 32 | La couleur jaune de la solution d'essai qui passe au vert en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon..... | 105 |
| Figure 33 | Pouvoir réducteur ferrique des extraits méthanoliques de <i>P. Scoparia</i> obtenus à partir de trois zones et deux saisons..... | 105 |

Liste des tableaux

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tableau 1 | Classification des composants volatils des huiles essentielles .. | 13 |
| Tableau 2 | Principaux composés des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> de différentes origines précédemment signalés..... | 33 |
| Tableau 3 | Variation des composés volatils identifiés à partir de plus de cents huiles essentielles de <i>Pogostemon Cablin</i> (rapportée dans la littérature) | 39 |
| Tableau 4 | Différentes méthodes réalisées sur l'extraction des huiles essentielles de <i>Pogostemon Cablin</i> | 41 |
| Tableau 5 | Paramètres géographiques des habitats naturels de <i>Pituranthos Scoparius</i> en Algérie..... | 43 |
| Tableau 6 | Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> obtenue par différentes méthodes..... | 64 |
| Tableau 7 | Activité antimicrobienne de <i>P. Scoparius</i> des huiles essentielles extraites par trois méthodes différentes..... | 70 |
| Tableau 8 | Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de <i>P. Scoparius</i> extraite par hydrodistillation (CMI)..... | 72 |
| Tableau 9 | Activité antimicrobienne de <i>P. Scoparius</i> de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux obtenu par décoction..... | 73 |
| Tableau 10 | Effets des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> sur l'œdème induit par la carraghénine | 74 |
| Tableau 11 | Activité analgésique de l'huile essentielle et des extraits de <i>P. Scoparius</i> | 77 |
| Tableau 12 | Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de <i>P. Cablin</i> obtenue par différentes méthodes..... | 82 |
| Tableau 13 | Activité antimicrobienne de <i>Pogostemon Cablin</i> des huiles essentielles extraites par trois méthodes différentes..... | 85 |
| Tableau 14 | Activité antimicrobienne de <i>P. Cablin</i> de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux obtenu par décoction..... | 88 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Tableau 15 | Rendements des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> récoltée dans différentes régions et deux saisons..... | 89 |
| Tableau 16 | Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> obtenue à partir de différentes régions et durant deux saisons..... | 92 |
| Tableau 17 | Activité Antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Pituranthos Scoparius</i> collectés dans différentes régions et saisons..... | 97 |
| Tableau 18 | Dosage antioxydant des extraits de <i>Pituranthos Scoparius</i> ... | 99 |
| Tableau 19 | Teneur totale en phénols et flavonoïdes des extraits de <i>Pituranthos Scoparius</i> | 100 |
| Tableau 20 | Activité antioxydante et teneur des extraits méthanoliques de <i>P. Scoparius</i> obtenues à partir de différentes régions et saisons..... | 103 |
| Tableau 21 | Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits méthanoliques de <i>P. Scoparius</i> obtenues à partir de différentes régions et saisons..... | 104 |

Table des matières

Liste des abréviations et acronymes

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction Générale..... 1

CHAPITRE 1 : Généralités

| | |
|---|-----------|
| I. Phytochimie : Huiles essentielles et composés phénoliques..... | 4 |
| 1. Huiles essentielles..... | 4 |
| A. Rôle et répartition des huiles essentielles dans la plante..... | 4 |
| B. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles..... | 4 |
| C. Différentes méthodes d'extraction..... | 5 |
| a. Hydrodistillation..... | 5 |
| b. Entraînement à la vapeur d'eau..... | 6 |
| c. Hydrodiffusion..... | 7 |
| d. Extraction par solvants organiques..... | 7 |
| e. Extraction par micro-ondes..... | 8 |
| f. Extraction au CO ₂ supercritique..... | 9 |
| g. Expression à froid..... | 9 |
| h. Micro extraction sur phase solide..... | 10 |
| D. Influence des méthodes d'extractions sur les caractéristiques des huiles essentielles..... | 10 |
| E. Analyse chromatographique des huiles essentielles..... | 12 |
| F. Composition chimique des huiles essentielles..... | 12 |
| G. Facteurs influençant la composition chimique et le rendement d'une huile essentielle..... | 14 |
| H. Toxicité des huiles essentielles..... | 14 |
| I. Intérêts thérapeutiques des huiles essentielles..... | 15 |
| a. Effets antimicrobiens des huiles essentielles | 15 |
| b. Activité Antioxydante des huiles essentielles | 17 |
| c. Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles | 17 |
| d. Activité analgésique des huiles essentielles | 18 |
| e. Autres activités pharmacologiques des huiles essentielles..... | 18 |
| 2. Les composés phénoliques..... | 18 |
| A. Définition et classification..... | 18 |
| B. Extraction des composés phénoliques..... | 19 |
| C. Caractérisation et dosage des composés phénoliques..... | 19 |
| D. Intérêts biologiques et thérapeutiques des composés phénoliques... | 20 |
| a. Activité antioxydante des composés phénoliques | 20 |
| b. Activité antimicrobienne des composés phénoliques | 21 |

| | |
|--|-----------|
| c. Autres activités pharmacologiques des composés phénoliques..... | 21 |
| 3. Méthodes d'évaluation des activités biologiques..... | 22 |
| A. Activité antioxydante..... | 22 |
| a. Définition..... | 22 |
| b. Méthodes d'évaluation in vitro de l'activité antioxydante..... | 22 |
| α. Test DPPH•..... | 22 |
| β. Méthode de blanchiment du β-carotène..... | 23 |
| γ. Dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)..... | 23 |
| B. Activité antimicrobienne..... | 24 |
| a. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne..... | 24 |
| α. Méthode de diffusion en milieu solide..... | 24 |
| • Méthode de diffusion sur disque | 24 |
| • Méthode du gradient antimicrobien..... | 25 |
| • Méthode de diffusion de puits de gélose..... | 25 |
| β. Méthode de dilution..... | 25 |
| • Méthode de dilution en milieu liquide..... | 26 |
| • Dilution du bouillon..... | 26 |
| • Dilution en gélose..... | 26 |
| C. Activité anti-inflammatoire..... | 27 |
| a. Définition..... | 27 |
| b. Méthodes d'évaluation in vivo de l'activité anti-inflammatoire..... | 27 |
| α. Test de l'œdème aigu induit par la carragénine sur la patte de souris..... | 27 |
| β. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris..... | 28 |
| D. Activité analgésique..... | 29 |

CHAPITRE 2 : Etude phytochimique des deux espèces : *Pituranthos Scoparius* et *Pogostemon Cablin*

| | |
|--|-----------|
| I. Monographie des plantes étudiées..... | 30 |
| 1. <i>Pituranthos Scoparius (Deverra Scoparia)</i>..... | 30 |
| A. Présentation de l'espèce..... | 30 |
| B. Caractéristiques botaniques..... | 30 |
| C. Utilisations thérapeutiques traditionnelles..... | 31 |
| D. Travaux antérieurs..... | 31 |
| a. Composition chimique des huiles essentielles..... | 31 |
| b. Activités Biologiques des huiles essentielles..... | 35 |
| II. <i>Pogostemon Cablin</i>..... | 36 |
| A. Présentation de l'espèce..... | 36 |
| B. Caractéristiques botaniques..... | 36 |
| C. Application du <i>Pogostemon Cablin</i> | 37 |

| | |
|---|----|
| D. Travaux antérieurs | 38 |
| a. Composition chimique des huiles essentielles..... | 38 |
| b. Différentes méthodes réalisées sur l'extraction des huiles essentielles..... | 40 |
| c. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles..... | 41 |

CHAPITRE 3 : Matériels et méthodes

| | |
|--|-----------|
| I. Récolte du matériel végétal..... | 43 |
| 1. <i>Pituranthos Scoparius</i> | 43 |
| a. Identification de la plante..... | 43 |
| 2. <i>Pogostemon Cablin</i> | 44 |
| II. Extraction des huiles essentielles..... | 44 |
| 1. Extraction des huiles essentielles par hydro-distillation..... | 44 |
| 2. Extraction des huiles essentielles par Micro-onde..... | 45 |
| 3. Extraction des huiles essentielles par entraînement à vapeur..... | 45 |
| III. Détermination du rendement d'extraction..... | 46 |
| IV. Extraction des composés phénoliques..... | 46 |
| 1. Sélection du meilleur solvant d'extraction..... | 46 |
| A. Préparation des extraits organiques..... | 46 |
| B. Préparation des extraits aqueux..... | 47 |
| a. Décoction..... | 47 |
| b. Infusion..... | 47 |
| c. Macération..... | 47 |
| d. Extraction assistée par ultrasons..... | 48 |
| V. Etude de la composition chimique..... | 48 |
| 1. Analyse des huiles essentielles..... | 48 |
| A. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)..... | 48 |
| B. Analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)..... | 48 |
| C. Identification des composés..... | 49 |
| 2. Analyse des produits lourds..... | 50 |
| A. Dosage des composés phénoliques totaux..... | 50 |
| B. Dosage des flavonoïdes totaux..... | 51 |
| C. Evaluation de l'activité antioxydante..... | 51 |
| a. Piégeage du radical libre DPPH..... | 51 |
| b. Pouvoir de réduction du Fer : FRAP..... | 53 |
| VI. Activités biologiques..... | 53 |
| 1. Activité Antimicrobienne..... | 53 |
| A. Souches microbiennes..... | 53 |
| B. Méthode de diffusion sur disque..... | 54 |
| C. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)... | 54 |
| 2. Activités pharmacologiques..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| A. Animaux..... | 55 |
| B. Toxicité aiguë..... | 55 |
| C. Activité anti-inflammatoire..... | 55 |
| D. Activité analgésique..... | 58 |
| VII. Analyses statistiques..... | 60 |

CHAPITRE 4 : Résultats et discussions

PARTIE 1 : Comparaison de différentes méthodes d'extractions des huiles essentielles de *Pituranthos Scoparius* et *Pogostemon Cablin* : compositions chimiques et activités biologiques

| | |
|--|-----------|
| I. <i>Pituranthos Scoparius</i>..... | 61 |
| 1. Influence de la méthode d'extraction sur le rendement des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> | 61 |
| 2. Influence de la méthode d'extraction sur la composition chimique des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> | 61 |
| 3. Influence de la méthode d'extraction sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> | 69 |
| 4. Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de <i>P. Scoparius</i> extraite par HD..... | 72 |
| 5. Activité antimicrobienne des extraits de <i>P. Scoparius</i> | 73 |
| 6. Test de toxicité aiguë..... | 74 |
| 7. Influence de la méthode d'extraction sur l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> | 74 |
| 8. Activité analgésique..... | 76 |
| II. <i>Pogostemon Cablin</i>..... | 78 |
| 1. Influence de la méthode d'extraction sur le rendement des huiles essentielles de <i>P. Cablin</i> | 78 |
| 2. Influence de la méthode d'extraction sur le rendement des huiles essentielles de <i>P. Cablin</i> | 79 |
| 3. Influence de la méthode d'extraction sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>P. Cablin</i> | 84 |
| 4. Activité antimicrobienne des extraits de <i>P. Cablin</i> | 87 |

PARTIE 2 : Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles et des activités antimicrobiennes de *Pituranthos Scoparius* collectés dans différentes régions et saisons

| | |
|---|-----------|
| I. Etude des composés volatiles..... | 89 |
| 1. Composition chimique des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> collectés dans différentes régions et saisons..... | 89 |

| | |
|--|------------|
| 2. Activité Antimicrobienne des huiles essentielles de <i>P. Scoparius</i> collectés dans différentes régions et saisons..... | 96 |
| II. Etude des composés lourds..... | 99 |
| 1. Influence des solvants sur l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits de <i>P. Scoparius</i> | 99 |
| A. Dosage de l'activité antioxydante..... | 99 |
| B. Teneur totale en phénols et flavonoïdes..... | 100 |
| 2. Influence de la région et période de récolte sur l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits de <i>P. Scoparius</i> | 102 |
| A. Dosage de l'activité antioxydante..... | 102 |
| B. Teneur totale en phénols et flavonoïdes..... | 103 |
| C. Dosage du pouvoir réducteur ferrique..... | 104 |
| Conclusion générale et perspectives..... | 107 |
| Références bibliographiques..... | 109 |

INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation des plantes médicinales a considérablement augmenté dans le monde entier, de nombreuses personnes utilisent désormais ces produits pour traiter de nombreux problèmes de santé dans la pratique médicale quotidienne dans différents pays¹.

Le problème avec les traitements à base de plantes est le manque d'informations précises et complètes sur la composition des extraits. Pour éviter tout risque, les remèdes dérivés à base de plantes nécessitent une évaluation approfondie de leurs qualités pharmacologiques et de leur innocuité qui peuvent réellement être réalisées par plusieurs études.

En raison de l'engouement pour les substances d'origine naturelle dans le monde entier, il ne serait pas judicieux de s'appuyer uniquement sur la tradition ou les supposées croyances millénaristes ; les études explicatives et pragmatiques sont utiles et doivent être considérées comme complémentaires dans l'acquisition de données². Notre travail s'inscrit alors dans ce cadre.

Nous avons entrepris une démarche visant à valoriser la flore végétale en étudiant la composition chimique des métabolites secondaires et en identifiant les activités biologiques de *Pituranthos scoparius* et *Pogostemon Cablin*. Notre premier choix s'est porté sur *P. Scoparius* car c'est une plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle en Algérie et dans d'autres pays d'Afrique du Nord pour traiter plusieurs maladies telles que l'asthme, les rhumatismes, la rougeole, les dermatoses, la jaunisse et les troubles digestifs. Notre second choix s'est porté sur *P. Cablin* qui est une plante importante et qui possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. Dans les pratiques médicinales traditionnelles, elle est utilisée pour traiter la fièvre, les maux de tête, les rhumes, les nausées, les douleurs abdominales, les vomissements, la diarrhée et les piqûres d'insectes et de serpents.

Notre objectif principal est d'orienter la recherche vers la valorisation de ces deux espèces et de montrer l'intérêt indéniable de leurs utilisations tant pour les scientifiques que pour le grand public.

Dans cette optique, notre travail a pour objectifs de :

- Déterminer la composition chimique des huiles essentielles par des analyses chromatographiques (GC-MS et GC-FID).
- Etablir l'influence de la méthode d'extraction des huiles essentielles sur le rendement d'extraction, la composition chimique, l'activité antimicrobienne de *Pituranthos Scoparius* et du *Pogostemon Cablin*.
- Etudier l'influence de la méthode d'extraction des huiles essentielles de *Pituranthos Scoparius* sur l'activité anti-inflammatoire.
- Mettre en évidence l'impact de la polarité du solvant et de la méthode d'extraction sur le rendement, la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante des extraits de *Pituranthos Scoparius*.
- Définir la variabilité chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles en fonction des régions et des périodes de collecte.
- Evaluer l'activité analgésique des différents extraits de *Pituranthos Scoparius*.

Notre travail présenté dans ce manuscrit est réparti en trois chapitres.

Le premier chapitre est une étude bibliographique des espèces choisies, des huiles essentielles et des composés phénoliques.

Le deuxième chapitre porte sur la méthodologie expérimentale adoptée dans ce travail. Elle englobe la description des différents dispositifs expérimentaux, les méthodes d'analyse chromatographique et les tests biologiques utilisés.

Le troisième chapitre est consacré à tous les résultats et les discussions qui en découlent. Les résultats et discussions sont divisés en deux parties :

La première partie est dédiée à la variation de la composition chimique, des activités antimicrobiennes et anti-inflammatoires des huiles essentielles à

l'aide de trois méthodes d'extraction (hydrodistillation, micro-ondes et entraînement à la vapeur) des deux plantes. La deuxième partie est consacrée à l'étude de la composition chimique ainsi que l'activité biologique de *P. Scoparius* selon la région et la période de collecte.

Nous terminerons par une conclusion générale et les perspectives à donner à cette étude.

CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS

I. Phytochimie : Huiles essentielles et composés phénoliques

1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques et volatils. Elles sont obtenues à partir de différentes parties des matières végétales telles que les fleurs, les racines, l'écorce, les feuilles, les graines, la peau, les fruits, le bois et les plantes entières³.

Les plantes contiennent des substances odoriférantes et très volatiles appelées huiles essentielles, qui peuvent être extraites par distillation à la vapeur à partir d'une plante aromatique d'une seule espèce botanique, par distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Pour séparer l'huile essentielle de la phase aqueuse, on utilise généralement un procédé physique qui ne modifie pas significativement sa composition⁴.

A. Rôle et répartition des huiles essentielles dans la plante

On estime qu'il existe 350 000 espèces végétales dans le monde, et que 5 % de celles-ci (17 500 espèces) sont aromatiques. Plus de 400 espèces aromatiques sont transformées commercialement. Environ 50 % sont cultivées et le reste sont obtenues soit comme sous-produits d'une industrie primaire, soit récoltées dans la nature. Les dix principales familles de plantes à huile essentielle sont (Apiacées, Astéracées, Cupressacées, Lamiacées, Lauracées, Myrtacées, Pinacées, Poacées, Rutacées, Zingibéracées). Les huiles essentielles étant des combinaisons complexes de substances chimiques, tout effet biologique observé est le résultat de l'action de l'un ou de plusieurs de leurs composants. Souvent, le principal responsable des effets toxiques d'une huile essentielle est l'un des composés prédominants. Par exemple, la concentration élevée de thuyone constitue le facteur principal de toxicité de l'huile essentielle d'absinthe⁵.

B. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

En règle générale, les huiles essentielles ont une faible densité, sauf dans quelques cas particuliers comme les huiles de cannelle, de clou de girofle et de

sassafras, qui sont plus denses que l'eau. Elles ont une faible solubilité dans l'eau, mais peuvent être dissoutes dans la plupart des solvants organiques courants tels que l'éthanol et l'éther diéthylique. En outre, elles se mélangent facilement avec les huiles végétales, les graisses et les cires⁶.

Les huiles essentielles ont un indice de réfraction et un pouvoir rotatoire élevés, ce qui pourrait être intéressant pour leur identification et leur contrôle de qualité ; cependant, ce dernier a tendance à être variable en raison des différents codex actuellement utilisés dans le monde⁶.

C. Différentes méthodes d'extraction

Il existe en nombre plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Les technologies timides sur le traitement des huiles essentielles sont d'une importance considérable et sont encore surutilisées. Les méthodes traditionnelles les plus couramment utilisées pour l'extraction des huiles essentielles sont l'hydrodistillation (HD), la distillation à la vapeur (SD), l'extraction par solvant, l'enfleurage et la macération.

a. Hydrodistillation

La méthode d'extraction classique des huiles essentielles est l'hydrodistillation (HD), qui implique l'évaporation des huiles essentielles en chauffant un mélange d'eau et de matière végétale (figure 1). La matière végétale est placée directement (intacte ou broyée) dans un alambic rempli d'eau, qui est ensuite porté à ébullition à pression atmosphérique. L'installation comprend un condensateur et un décanteur pour recueillir le condensat et séparer les huiles essentielles de l'eau, respectivement⁷. Selon la pharmacopée européenne, le dispositif de Clevenger est souvent utilisé pour l'extraction des huiles essentielles⁸.

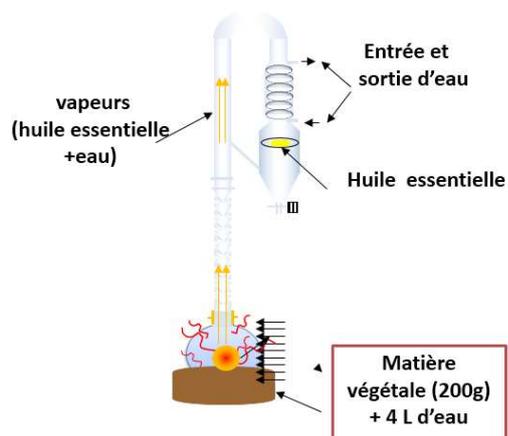


Figure 1 : Extraction par hydrodistillation

b. Entraînement à la vapeur d'eau

La matière végétale est introduite directement dans l'alambic et soumise à la vapeur sans être préalablement macérée dans l'eau. La vapeur injectée traverse les plantes depuis la base de l'alambic jusqu'en haut. Lors de la distillation à la vapeur, la vapeur d'eau est dirigée à travers le matériau végétal. Cette vapeur fonctionne comme des agents qui brisent les pores de la matière première et en libèrent l'huile essentielle (figure 2). Le système donne un mélange de vapeur et d'huile essentielle désirée. Cette vapeur est ensuite condensée davantage et l'huile essentielle est recueillie⁹.

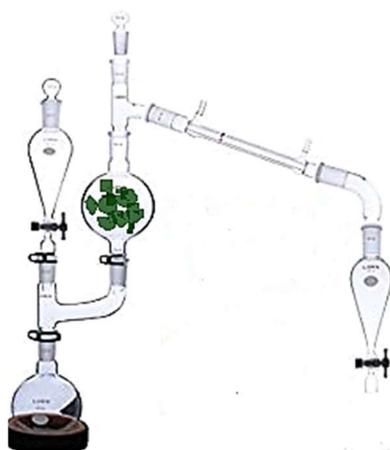


Figure 2 : Extraction par entraînement à la vapeur

Bien que l'extraction des huiles essentielles par distillation puisse sembler être un processus simple, elle présente néanmoins plusieurs inconvénients. En raison de

leur exposition de l'exposition des huiles essentielles à l'eau bouillante pendant de longues périodes, la formation des artefacts reste un problème possible en raison de la température élevée ou de l'acidité de l'eau pouvant modifier la composition des huiles volatiles extraites.

c. Hydrodiffusion

L'extraction par hydrodiffusion est une méthode d'extraction à la vapeur qui ne diffère de l'entraînement à la vapeur que par la façon dont la vapeur est introduite dans le contenant d'alambic. Cette méthode est utilisée afin de ne pas endommager la matière végétale par la température d'ébullition¹⁰. Contrairement à la méthode de l'entraînement à la vapeur, la vapeur de l'hydrodiffusion est appliquée à partir du haut de la matière végétale (figure 3). De plus, cette méthode peut être effectuée sous basse pression ou sous vide afin de réduire la température de la vapeur en dessous de 100 °C. L'extraction par hydrodiffusion est bien meilleure que celle par entraînement à la vapeur en raison d'un temps de traitement plus court et d'un rendement plus élevé avec moins de vapeur utilisée.

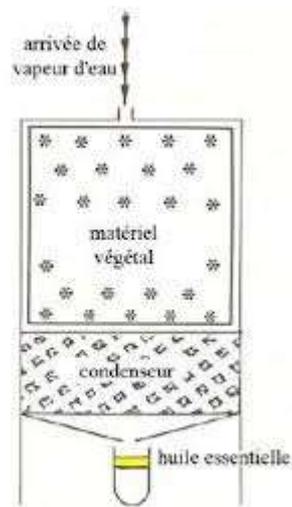


Figure 3 : Extraction par hydrodiffusion

d. Extraction par solvants organiques

Il est possible d'isoler les huiles essentielles thermosensibles par extraction à l'aide d'un solvant organique. Ces derniers doivent être utilisés à bas point d'ébullition, exempts d'odeur, d'impuretés et inertes vis-à-vis des constituants de

l'huile. De ce fait le pentane et l'hexane sont préférés pour les huiles de fleurs. Pour les épices, dans la plupart des cas, les extraits de solvants (fractions volatiles et non volatiles) sont plus représentatifs de la saveur totale que l'huile obtenue à partir d'un entraînement à la vapeur, et qui ne contribue qu'à l'arôme. Pour obtenir des extraits d'essence d'épice (oléorésine), des solvants tels que l'éthanol, les hydrocarbures chlorés et l'acétone sont utilisés, la sélection des solvants dépendant de la nature de l'épice et de ses constituants aromatiques¹¹.

e. Extraction par micro-ondes

Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés par Ganzler et al¹² et Lane et al¹³ en 1986. Depuis cette date, l'extraction végétale assistée par micro-ondes a été le fruit de nombreuses recherches et de brevets.

Les obstacles des techniques d'extraction ordinaires, telles que le solvant et l'hydrodiffusion, sont les pertes de plusieurs constituants durant l'évaporation, mauvaise cohérence d'isolement et résidus de solvants toxiques. Ces défis ont incité à envisager les nouvelles techniques d'extraction assistée par micro-ondes¹⁴.

Parmi ces dernières techniques, nous citerons :

- L'extraction par solvant assistée par micro-ondes ou « MAE : microwave assisted extraction »¹⁵.
- Le « VMHD : vacuum microwave hydrodistillation » ou hydrodistillation par micro-ondes sous vide¹⁶.
- Le « SFME : Solvant free microwave extraction » ou extraction sans solvant assistée par micro-ondes¹⁷.
- L'hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (MHG)¹⁸.

Plusieurs avantages des extractions par micro-ondes ont été rapportés par les chercheurs, qui peuvent se résumer : en l'obtention des huiles essentielles avec un meilleur rendement, le temps d'extraction plus court et un procédé qui respecte l'environnement¹⁴.

f. Extraction au CO₂ supercritique

Les huiles dérivées de l'entraînement à la vapeur varient dans leurs qualités en fonction des températures, des pressions et de la durée appliquée au processus. Le processus d'extraction au CO₂ pourrait ainsi produire des huiles de meilleure qualité qui n'ont pas été altérées par l'application d'une chaleur élevée, contrairement au processus de l'entraînement à la vapeur. Dans l'extraction au CO₂, aucun des constituants de l'huile n'est endommagé par la chaleur.

L'extraction au CO₂ supercritique est une méthode d'extraction moderne qui se déroule en plusieurs étapes (figure 4) :

- Le dioxyde de carbone sous pression devient liquide tout en restant à l'état gazeux, ce qui signifie qu'il est désormais "supercritique". Dans cet état, il est pompé dans une chambre remplie de matière végétale.
- En raison des propriétés liquides du gaz, le CO₂ agit comme un solvant sur la matière végétale naturelle, extrayant les huiles et autres substances telles que les pigments et la résine de la matière végétale. L'huile essentielle contenue se dissout alors dans le CO₂ liquide.
- Le CO₂ sera ramené à la pression naturelle et s'évapore à nouveau, tandis que ce qui reste est l'huile essentielle résultante.

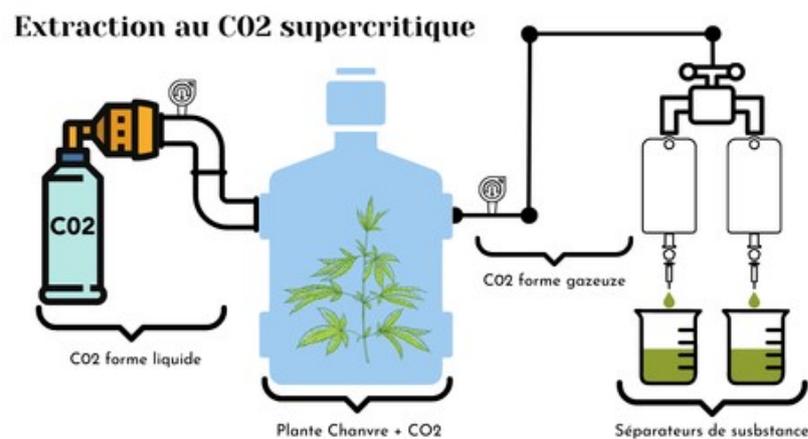


Figure 4 : Extraction au CO₂ supercritique

g. Expression à froid

Le terme pressé à froid signifie théoriquement que l'huile est pressée à basse température et pression. Ce processus garantit que l'huile résultante est pure à 100

% et conserve toutes les propriétés de la plante. C'est une méthode d'extraction mécanique où la chaleur est réduite et minimisée tout au long du dosage de la matière première. Dans ce processus, la couche externe des plantes contenant l'huile est éliminée par lavage. Par la suite, la plante entière (le matériau de la pulpe) est pressée pour libérer l'huile essentielle des pochettes. L'huile essentielle est séparée du matériau et remonte à la surface par centrifugation¹⁹.

h. Micro extraction sur phase solide

La micro-extraction en phase solide de l'espace de tête (HS-SPME) est une méthode d'extraction de la fraction volatile des plantes aromatiques qui est plus simple et plus rapide que l'hydrodistillation²⁰, contrairement à cette dernière, qui nécessite beaucoup de temps et une grande quantité d'échantillon, la HS-SPME est rapide et nécessite une quantité réduite d'échantillon. L'analyse HS-SPME permet une estimation qualitative des composés volatils en utilisant une petite quantité de matériel²¹. L'HS-SPME a également été employée pour étudier la variabilité chimique des plantes aromatiques ainsi que pour analyser les fractions volatiles émises par des espèces ne produisant pas d'huiles essentielles. Lors de l'hydrodistillation, les composés les plus volatils et les composés hydrosolubles sont perdus respectivement dans la phase gazeuse et dans la phase hydrolat ; alors qu'avec l'extraction HS, c'est l'affinité des fibres de chaque composé qui contrôle l'échantillonnage des volatils²².

D. Influence des méthodes d'extractions sur les caractéristiques des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles a montré que leur profil chimique peut différer non seulement par la quantité des différents constituants mais aussi dans la structure des molécules extraites, la méthode d'extraction influence les caractéristiques de l'huile essentielle. Il a été démontré que les différentes méthodes d'extraction peuvent produire des huiles au profil organoleptique plus naturel. La variation dans les profils d'huiles essentielles obtenus par des méthodes d'extraction différentes peut être expliquée par les différences de

composition chimique de ces huiles. En effet, la méthode d'extraction utilisée, qu'il s'agisse de la distillation par solvant ou de la distillation traditionnelle, peut influencer la composition finale de l'huile obtenue.²³.

Des chercheurs ont effectué une analyse comparative de l'impact de plusieurs méthodes, à la fois traditionnelles et innovantes, sur la composition chimique des huiles essentielles extraites des fleurs de lavande²⁴. De manière générale, les méthodes d'extraction basées sur les micro-ondes ont donné des résultats très similaires tandis que l'huile obtenue par turbo hydrodistillation avait une forte odeur musquée en rapport avec l'endommagement de l'huile par cette méthode. Différentes méthodes ont été utilisées pour extraire l'huile essentielle de *Tetralinis articulata*, notamment l'extraction par solvant (éthanol ou hexane), l'hydrodistillation et l'extraction par un fluide supercritique. Ces méthodes ont révélé des activités antioxydantes variables pour l'huile essentielle obtenue. Les dosages de l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique et du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ont montré que l'huile essentielle obtenue avec l'extraction par un fluide supercritique a présenté l'activité antioxydante la plus prononcée, probablement en raison de la dégradation thermique réduite des constituants actifs²⁵. De plus, une étude a montré que l'huile essentielle produite par micro extraction sur phase solide était plus active contre les bactéries gram-positives et négatives testées par rapport à l'huile obtenue par Hydrodistillation, probablement en raison de la teneur plus élevée en composés oxygénés qui ont une action antifongique et antibactérienne élevée²⁶.

La méthode d'extraction d'une huile essentielle peut influencer sa composition, même si elles sont similaires, peut différer en termes de concentration relative de composés identifiés et qui peuvent ensuite donner différentes propriétés à l'huile. Par conséquent, le type d'extraction doit être choisi en fonction de l'utilisation de l'huile essentielle²⁷.

E. Analyse chromatographique des huiles essentielles

La complexité et la diversité des structures moléculaires que l'on peut trouver dans les huiles essentielles demandent des procédures chromatographiques avec séparation à haute résolution afin de caractériser les constituants. La méthode d'analyse la plus couramment utilisée pour l'analyse des huiles essentielles est la chromatographie en phase gazeuse (CG). La volatilité et la polarité des constituants de l'huile essentielle a fait que la (CG) soit la méthode de choix. A des fins analytiques, les composés volatils sont généralement séparés sur une colonne capillaire de silice fondue avec différentes phases stationnaires²⁸.

L'identification s'appuie soit sur des données chromatographiques comme les indices de Kovats. Ces derniers sont déterminés en injectant une gamme d'alcanes dans les mêmes conditions chromatographiques que l'échantillon à analyser. Il est possible de différencier deux types d'indices pour caractériser les composés volatils : les indices de Kovats (IK) et les indices de Van Den Dool et Kratochvil (Ir). Les IK sont déterminés à température constante par interpolation logarithmique, tandis que les Ir sont obtenus en programmation de température par interpolation linéaire²⁹.

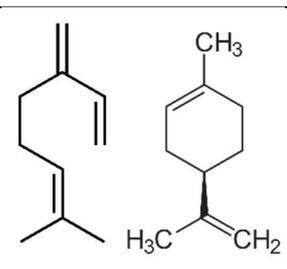
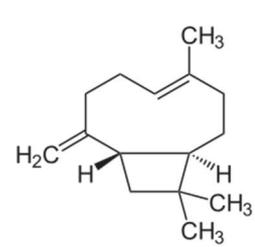
Les détecteurs de spectrométrie de masse (SM) sont le type de détecteur le plus populaire pour les composés volatils. Les spectres de masse obtenus sont comparés à des spectres de masse de référence qui sont indexés ou contenus dans des banques de données tels que NIST, Wiley Registry of Mass Spectral Data ou encore Adams⁴.

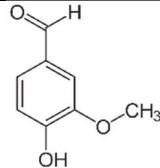
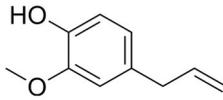
F. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances complexes et multi-composées, contenant une grande variété de composants chimiques différents. De ce fait une analyse exacte par des instruments analytiques est nécessaire pour étudier et trouver les compositions chimiques des huiles essentielles.

Les plantes synthétisent une large gamme de métabolites secondaires qui jouent un rôle crucial dans l'adaptation de la plante à son environnement biotique et dans la régulation des interactions avec d'autres organismes. Parmi les métabolites secondaires, Les huiles essentielles jouent un rôle crucial en tant que produits naturels, présentant une grande variété d'activités biologiques et thérapeutiques. Les huiles essentielles (huiles volatiles) sont des mélanges complexes de principes odorants stockés dans des cellules et des glandes végétales spéciales dans différentes parties des plantes, qui sont obtenus par des organismes vivants et isolés par pressage et hydrodistillation ou entraînement à la vapeur dans certaines familles de plantes. Les constituants des huiles essentielles appartiennent principalement à deux classes chimiques distinctes : les terpènes et les phénylpropanoïdes (tableau 1). En outre, les composés terpéniques se distinguent en général en deux grandes catégories : les hydrocarbures, principalement les mono-, sesqui- et diterpènes ; et leurs composés oxygénés, par exemple, les alcools, les oxydes, les aldéhydes, les phénols, les cétones, les acides, les esters et les lactones³⁰.

Tableau 1 : Classification des composants volatils des huiles essentielles

| | DESCRIPTION | EXEMPLES |
|---|---|--|
| LES HYDROCARBURES TERPENIQUES | | |
| Monoterpènes (C ₁₀ H ₁₆) | <ul style="list-style-type: none"> • Ils sont constitués de deux unités isoprènes (C₅H₈). • Ils peuvent être linéaires, cycliques ou bi cycliques. • Ils peuvent être rattachés à diverses fonctions chimiques (alcools, cétones etc.) |  Myrcène Limonène |
| Sesquiterpènes (C ₁₅ H ₂₂) | <ul style="list-style-type: none"> • Ils sont constitués de trois unités isoprènes. • Cette sous-classe diversifiée se divise en plusieurs catégories structurales : acycliques, monocycliques, bi cycliques, tricycliques, polycyclique. |  β-caryophyllène |

| | | |
|------------------------------|---|---|
| | Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés. | |
| LES COMPOSES OXYGENES | | |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Ce sont des dérivés du phénylpropane. • Ils sont responsables du caractère organoleptique des huiles essentielles comme par exemple l'Eugénol pour l'HE du clou de girofle ou encore la vanilline pour la vanille. |  <p style="text-align: center;">Vaniline</p>  <p style="text-align: center;">Eugénol</p> |

G. Facteurs influençant la composition chimique et le rendement d'une huile essentielle

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent avoir une influence sur la composition et le rendement des huiles essentielles, tels que les conditions de croissance, le climat, l'altitude, le type de sol, les pratiques agricoles, le stade de développement, la partie de la plante utilisée et le moment de la récolte. De plus, les méthodes d'extraction utilisées peuvent également avoir un impact significatif sur les rendements et la composition des huiles essentielles obtenues.³⁰.

H. Toxicité des huiles essentielles

Toutes les huiles essentielles sont toxiques à très fortes doses, surtout si elles sont prises par voie orale et par des enfants/nourrissons. De nombreuses huiles essentielles sont intrinsèquement toxiques à de très faibles concentrations en raison de la présence de composants spécifiques très toxiques. L'éventail des effets toxiques attribués aux huiles essentielles et à leurs constituants ne cesse de s'élargir, mais les recherches menées dans ce sens semblent dépourvues d'une approche systématique apparente. Il est nécessaire d'effectuer des études in vitro et in vivo sur les effets des huiles essentielles sur la viabilité et la fonction des

cellules de mammifères et d'autres organismes, les interactions avec des biomolécules/cibles spécifiques, les mécanismes d'action spécifiques afin de résoudre les problèmes de sécurité associés à l'utilisation des huiles essentielles³¹.

I. Intérêts thérapeutiques des huiles essentielles

Les HE et les extraits de plantes aromatiques sont utilisés et reconnus depuis de nombreuses années comme des sources utiles d'agents pharmaceutiques et d'additifs alimentaires³². Les propriétés des huiles essentielles de différentes espèces végétales ont suscité un intérêt croissant au cours des dernières décennies, en particulier en raison de leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, insecticides et antioxydantes.³³ Ces huiles volatiles fonctionnent également dans la défense chimique, agissent comme insecticides et acaricides, évitent la colonisation des champignons phytopathogènes, attirent les ennemis naturels des herbivores³⁴, et possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques.

Il a été démontré que les composés biologiquement actifs des huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés médicinales utiles dans les industries pharmaceutiques.

a. Effets antimicrobiens des huiles essentielles

Différentes huiles essentielles possèdent différents modes d'action, en raison de leur composition chimique, de la dose de composants majeurs antimicrobiens et du degré d'affinité pour certains sites cibles dans les cellules bactériennes.

Les huiles essentielles présentent un avantage dans leur action contre les bactéries car elles sont hydrophobes, ce qui leur permet de se distribuer dans les lipides de la membrane cellulaire ainsi que dans les mitochondries³⁵. De ce fait les principaux modes d'action des huiles essentielles vis-à-vis de la cellule bactérienne sont les suivants :

- L'action des huiles essentielles contre les bactéries peut se faire en provoquant la rupture de la paroi cellulaire. En pénétrant la membrane cellulaire, les huiles essentielles peuvent entraîner une fuite de solutés et d'ions essentiels à

la survie de la cellule, aboutissant à la lyse de la paroi cellulaire et éventuellement à la mort de la cellule bactérienne. La paroi cellulaire est en effet une structure cruciale pour la survie des bactéries (figure 5).

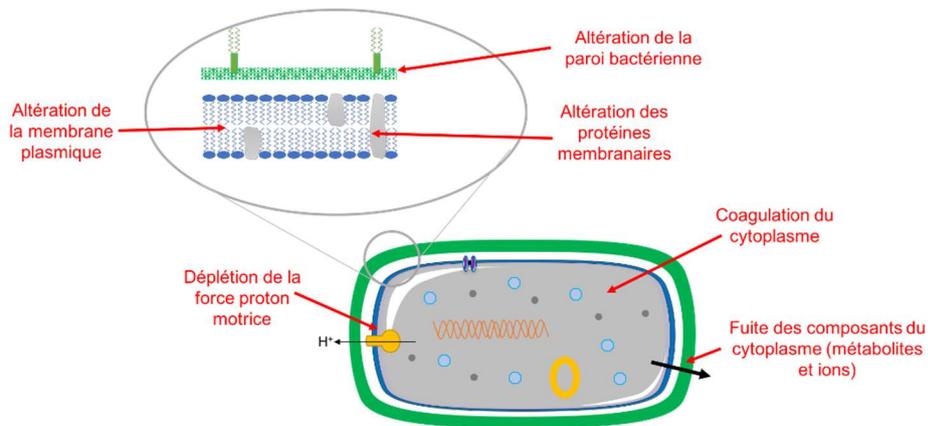


Figure 5 : Le mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

- Les huiles essentielles ciblent également la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes. Plus précisément, les protéines présentes dans la membrane cytoplasmique sont les cibles de certains composants de l'huile essentielle. Les membranes cellulaires sont des barrières vitales qui délimitent et régulent le flux intracellulaire et extracellulaire de substances. La destruction de ces structures, par l'action des composants de l'huile essentielle afin d'inhiber les bactéries a été rapportée³⁶.
- Les composés phénoliques contenus dans les huiles essentielles provoquent la perturbation de la force motrice des photons, du flux d'électrons et du transport actif, et induisent la coagulation du contenu cellulaire³⁷.

Ces sont les principaux mécanismes d'action des huiles essentielles qui ont été rapportés pour leur effet sur les cellules bactériennes. Cependant, les étapes qui suivent une inactivation ou une lyse entraînent une série de conséquences souvent mortelles pour la bactérie.

b. Activité Antioxydante des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont de plus en plus étudiées pour leur potentiel en tant qu'antioxydants naturels, en raison des préoccupations croissantes quant à l'utilisation de certains antioxydants synthétiques tels que le BHT et BHA, qui pourraient être nocifs pour la santé humaine. De nombreuses huiles essentielles ont été identifiées comme ayant des propriétés antioxydantes, et leur utilisation dans ce domaine suscite un intérêt croissant. L'ajout d'HE aux produits comestibles, soit par mélange direct, soit dans des emballages actifs et des revêtements comestibles, peut donc représenter une alternative valable pour empêcher l'auto-oxydation et prolonger la durée de conservation³⁸.

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont un élément clé de leurs activités biologiques, car le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies. Ces propriétés sont principalement attribuées à la capacité de certains composants, en particulier les phénols, à prévenir ou ralentir l'oxydation des substances. Cependant, la teneur en composés phénoliques peut être limitée dans les huiles essentielles obtenues par distillation, car de nombreux composés phénoliques sont non volatils. Néanmoins, certaines huiles essentielles dépourvues de phénols peuvent également présenter des propriétés antioxydantes en raison de la chimie radicalaire de certains terpénoïdes et autres composants volatils, tels que les composés soufrés présents dans l'ail ³⁸.

c. Activité anti-inflammatoire des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires végétaux qui sont largement utilisés en aromathérapie et dans divers systèmes médicaux traditionnels. Certaines d'entre elles possèdent différentes propriétés pharmacologiques, dont l'une est l'effet anti-inflammatoire sur plusieurs modèles d'inflammation différents. Un grand nombre d'huiles essentielles contiennent divers composés bioactifs, dont certains ont un effet anti-inflammatoire puissant comme le carvacrol, le limonène, le citronellal et le cinnamaldéhyde ³⁹.

d. Activité analgésique des huiles essentielles

Le nombre d'étude sur les effets analgésiques des composants des huiles essentielles ne cesse de croître, ce qui met en évidence le potentiel thérapeutique de cette classe chimique⁴⁰⁻⁴³. Ces constituants sont efficaces et agissant via différents mécanismes d'action, les composés des HE sont des molécules intéressantes pour des études dans des approches cliniques. Malgré la faible quantité de divers constituants analgésiques dans les HE, il est possible, grâce à des réactions peu coûteuses, de synthétiser facilement certains de ces composés, comme les monoterpènes α , β -époxy-carvone et hydroxydihydrocarvone. L'utilisation de ces constituants bioactifs comme prototypes pour synthétiser des composés analogues est une autre voie intéressante dans le développement de nouveaux médicaments analgésiques⁴⁴.

e. Autres activités pharmacologiques des huiles essentielles

Plusieurs études expérimentales ont démontré que les huiles essentielles ont un large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques lorsqu'elles sont testées in vitro. Il a été prouvé que les huiles essentielles à base de plantes possèdent des propriétés antimicrobiennes, antivirales, antifongiques et antiparasitaires. Il a également été rapporté qu'elles présentent des activités anti-inflammatoires, antispasmodiques, immunostimulantes, cicatrisantes et anticancéreuses. Sur la base du large spectre de diverses activités biologiques, Des recherches ont proposé que les huiles essentielles et les terpènes, que l'on peut trouver dans les fruits, légumes, herbes, etc., pourraient constituer un nouveau groupe d'agents thérapeutiques et préventifs⁴⁵.

2. Les composés phénoliques

A. Définition et classification

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires que l'on trouve couramment dans les plantes. Ils sont caractérisés par leur structure chimique commune, qui comprend un cycle aromatique avec un ou plusieurs substituants hydroxyle. Les composés phénoliques peuvent être divisés en plusieurs classes,

les principales étant les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes et les lignanes (figure 6) ^{46, 47}.

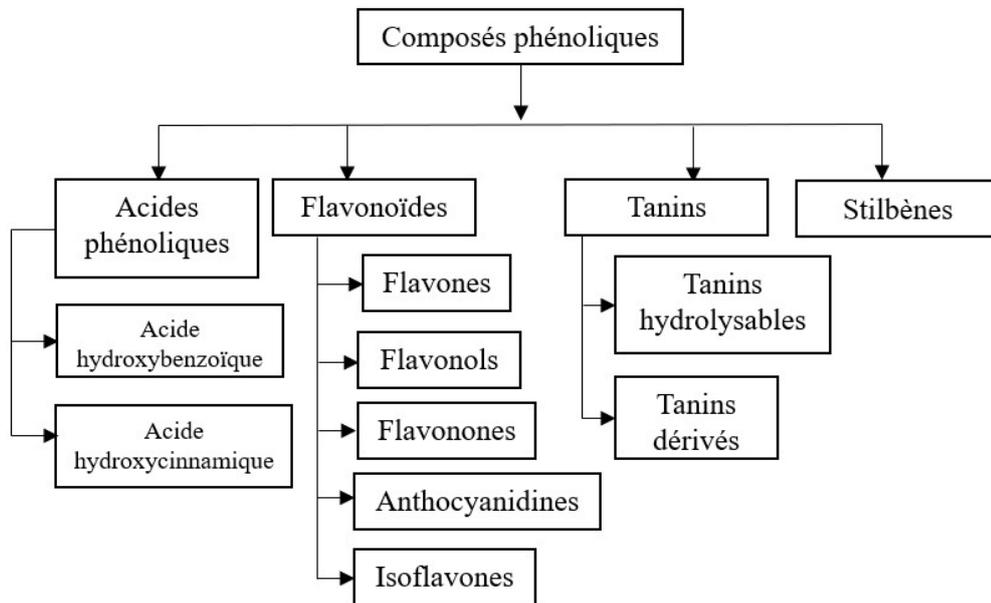


Figure 6 : Principales classes de composés phénoliques. Ceux-ci comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les stilbènes.

B. Extraction des composés phénoliques

L'étape d'extraction est essentielle pour l'identification et la quantification des composés chimiques dans les plantes. De nombreuses études se sont concentrées sur l'extraction et l'analyse des composés phénoliques présents dans diverses matières végétales, telles que les fruits, les légumes et les herbes. Les méthodes conventionnelles telles que l'extraction solide-liquide et l'extraction par reflux chauffé peuvent être utilisées pour extraire les composés phénoliques. Des méthodes avancées telles que l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction accélérée par solvant, l'extraction par fluide supercritique, et l'extraction à haute pression hydrostatique sont également appliquées pour extraire ces composés⁴⁷.

C. Caractérisation et dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être analysés à l'aide de diverses techniques. La spectrométrie de masse (MS), la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la (GC-MS), la

calorimétrie, la spectrophotométrie ultraviolette (UV), ultraviolette-visible (UV/VIS) et d'autres techniques spectrophotométriques représentent des exemples de ces techniques⁴⁸⁻⁵¹.

- La teneur phénolique totale (CPT) des composés phénoliques dans les plantes est couramment mesurée à l'aide de techniques de spectrophotométrie telles que les méthodes de Folin-Denis et Folin-Ciocalteu⁵². Cette dernière méthode, basée sur le transfert d'électrons, s'est avérée plus préférable et donc plus courante^{48,49}.
- La GC a été utilisée pour analyser les acides phénoliques, les tanins condensés, les flavones et les flavonoïdes.
- La HPLC a été utilisée pour analyser les anthocyanes, les tanins hydrolysables, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les acides cinnamiques⁵¹.
- Les anthocyanes ont été analysées par absorption UV dans une gamme de longueurs d'onde de 489 à 550 nm⁵¹.
- Les tanins hydrolysables ont également été analysés à une longueur d'onde de 500 à 550 nm⁵¹. Sur la base de leur capacité à se lier aux protéines, les tanins ont été analysés à l'aide de méthodes de liaison aux protéines⁵³.
- Des méthodes calorimétriques ont été utilisées pour déterminer le CPT dans les flavonoïdes et les tanins. D'autres techniques d'analyse des composés phénoliques comprennent l'électrophorèse capillaire et la chromatographie électrocinétique micellaire⁵⁴.

D. Intérêts biologiques et thérapeutiques des composés phénoliques

a. Activité antioxydante des composés phénoliques

Les composés phénoliques ont montré des propriétés antioxydantes prometteuses, leur potentiel étant directement lié au type de solvant utilisé dans l'extraction, mais aussi à l'origine de la plante, aux conditions de croissance, au moment de la récolte et aux conditions de stockage. L'étude du potentiel antioxydant des extraits phénoliques dérivés d'espèces végétales est l'un des sujets brûlants de la communauté scientifique⁵⁵.

L'activité antioxydante des composés phénoliques est en relation directe avec leurs structures chimiques telles que le nombre ainsi que la position des groupements hydroxyles⁵⁶. En raison des variations saisonnières, les tendances des différents composés phénoliques sont également différentes. Les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux étaient fortement corrélées à l'activité antioxydante⁵⁷. On donne l'exemple des composés phénoliques totaux, les flavonoïdes totaux et la capacité antioxydante de tous les cultivars de bleuets qui ont augmenté de manière non linéaire avec la maturation⁵⁸.

b. Activité antimicrobienne des composés phénoliques

Les propriétés antimicrobiennes des composés phénoliques extraits des plantes et des aliments végétaux ont été étudiées en détail pour leur potentiel dans la lutte contre divers micro-organismes⁵⁹. Les flavan-3-ols, les tanins et les flavonols ont été particulièrement étudiés en raison de leur large spectre d'action et de leur puissante activité antimicrobienne par rapport à d'autres composés phénoliques⁶⁰.

Il a été démontré que les polyphénols (les stilbènes, les acides phénoliques, les tanins, les isoflavones et les catéchines) inhibent la reproduction et la croissance de divers champignons, levures, virus et bactéries, notamment *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* ou *Chlamydia pneumoniae*, *Vibrio cholerae* et *E. coli*. Etant donné que les composés phénoliques agissent comme un mécanisme de défense naturel contre les infections microbiennes, leur utilisation dans la transformation alimentaire peut être envisagée comme une solution pour augmenter la durée de conservation de certains aliments, comme les filets de poisson⁶¹.

c. Autres activités pharmacologiques des composés phénoliques

A ce jour les preuves épidémiologiques indiquent que les polyphénols remplissent des fonctions essentielles telles que l'inhibition des agents pathogènes et des micro-organismes de décomposition, la prévention du dépôt de triglycérides, la réduction de l'incidence des maladies non transmissibles telles

que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les accidents vasculaires cérébraux et le diabète, et exercent des effets anti-inflammatoires et des effets allergiques via des processus impliquant des espèces réactives de l'oxygène. Ces effets protecteurs sont partiellement attribués aux métabolites secondaires phénoliques⁶¹.

3. Méthodes d'évaluation des activités biologiques

A. Activité antioxydante

a. Définition

Le terme antioxydant signifie littéralement "contre l'oxydation". Une substance qui a une concentration plus faible que celle du substrat oxydable et qui peut retarder ou empêcher significativement l'oxydation de ce substrat est appelée antioxydant. Les antioxydants sont importants pour la préservation de la qualité des aliments ainsi que pour maintenir la santé humaine.⁶².

b. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

α. Test DPPH•

Le test DPPH le plus couramment utilisé est simple et très sensible. Le DPPH est commercialisé sous forme radicalaire en raison de sa stabilité. Ce radical présente un fort maximum d'absorption à 517 nm (violet). En présence d'antioxydants, la couleur vire du violet au jaune. Par conséquent, le seul équipement nécessaire pour le dosage est un spectrophotomètre UV-VIS. Initialement, on pensait que le radical DPPH était réduit en hydrazine lorsqu'il réagissait avec les substances hydrogènes donneuses. Des recherches plus récentes ont révélé que le mécanisme d'action des antioxydants lors de l'essai du DPPH est principalement basé sur un transfert rapide d'électrons de l'échantillon au radical DPPH.



La réduction du DPPH• est déterminée par le changement de couleur du violet vers le jaune. Le radical libre ΦO• va dans un second temps réagir à nouveau

selon l'équilibre stœchiométrique entre le nombre de molécules DPPH réduites (décolorées) et le nombre de réducteur.



L'abstraction d'hydrogène de l'échantillon par le radical DPPH est marginale, car elle se produit très lentement et dépend du solvant accepteur de liaison hydrogène. L'éthanol et le méthanol, des solvants généralement utilisés pour les tests de capacité antioxydante, acceptent fortement les liaisons hydrogène, donc la réaction d'abstraction de l'hydrogène se produit très lentement⁶³.

Certains auteurs préfèrent utiliser exclusivement la méthode DPPH pour évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles en raison de sa simplicité et de sa sensibilité. Parfois, la décision de n'utiliser que cette méthode peut être attribuée à la faible activité antioxydante détectée, c'est pourquoi les auteurs ont jugé inutile de poursuivre d'autres méthodes.

β . méthode de blanchiment du β -carotène

La méthode de blanchiment du β -carotène (oxydation couplée du β -carotène et de l'acide linoléique) estime la capacité relative des composés antioxydants dans les extraits de plantes à piéger le radical de peroxyde d'acide linoléique qui oxyde le β -carotène dans la phase d'émulsion. Le β -carotène en l'absence d'antioxydant subit une décoloration rapide puisque le radical acide linoléique libre attaque le β -carotène qui perd les doubles liaisons et par conséquent sa couleur orangée⁶⁴.

γ - Dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

Cette méthode utilise la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} pour évaluer la capacité antioxydante des échantillons. La couleur jaune de la solution d'essai change en différentes nuances de vert et de bleu, selon la capacité réductrice de chaque échantillon. La présence d'agents réducteurs provoque la conversion du complexe

Fe³⁺/ferricyanure en la forme ferreuse, qui peut être suivie à 700 nm grâce à la formation du bleu de Prusse de Perl Fe₄[Fe (CN)₆]₃. L'augmentation de l'absorbance à 700 nm est indicative d'une augmentation de la capacité de réduction. Cette méthode est largement utilisée pour évaluer la capacité antioxydante des échantillons⁶⁵.

B. Activité antimicrobienne

a. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Il existe plusieurs méthodes de laboratoire pour évaluer ou cribler l'activité antimicrobienne in vitro d'un extrait ou d'un composé pur. Parmi les méthodes les plus connues et les plus basiques, on peut citer la méthode de diffusion sur disque et la méthode de dilution en bouillon ou en gélose. Pour les tests antifongiques, la technique des aliments empoisonnés est souvent utilisée. D'autres méthodes peuvent également être utilisées en fonction des besoins spécifiques de l'étude.

α. Méthode de diffusion en milieu solide

- **Méthode de diffusion sur disque**

La méthode de diffusion sur disque est largement utilisée dans les tests de sensibilité aux antimicrobiens en laboratoire de microbiologie. Elle consiste à inoculer des plaques de gélose avec un inoculum standardisé du micro-organisme à tester, puis à placer des disques de 6 mm imbibés d'une concentration désirée du composé à tester sur la surface de la gélose. Après incubation dans des conditions appropriées (température et durée précises), l'agent antimicrobien se diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du micro-organisme testé. Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance sont mesurés pour évaluer la sensibilité du micro-organisme à l'agent antimicrobien^{66, 67}.

- **Méthode du gradient antimicrobien**

La méthode du gradient antimicrobien est une méthode qui combine les principes des méthodes de dilution et de diffusion pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un agent antimicrobien. Elle consiste à créer un gradient de concentration de l'agent antimicrobien sur la surface de la gélose inoculée avec le micro-organisme testé. Cette méthode est couramment utilisée pour la détermination de la CMI des antibiotiques, des antifongiques et des antibactériens. La valeur de la CMI est déterminée à l'intersection de la bande et de l'ellipse d'inhibition de la croissance⁶⁸.

- **Méthode de diffusion de puits de gélose**

La méthode de diffusion en puits est une méthode couramment utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Cette méthode implique l'inoculation de la surface de la plaque de gélose avec un volume standardisé d'inoculum microbien. Ensuite, un trou de 6 à 8 mm de diamètre est créé de manière stérile à l'aide d'un outil approprié, et une quantité d'agent antimicrobien ou d'extrait à une concentration souhaitée est ajoutée dans le puits. Les plaques de gélose sont incubées dans des conditions appropriées en fonction du micro-organisme testé. L'agent antimicrobien se diffuse dans la gélose et inhibe la croissance de la souche microbienne testée⁶⁹.

β. Méthode de dilution

Les méthodes de dilution sont considérées comme les plus appropriées pour déterminer la CMI d'un agent antimicrobien, car elles permettent d'estimer la concentration de l'agent dans la gélose (dilution de gélose) ou le bouillon (macro-dilution ou micro-dilution). Les méthodes de dilution en bouillon ou en gélose sont quantitatives et peuvent être utilisées pour mesurer l'activité antimicrobienne *in vitro* contre les bactéries et les champignons. La CMI est définie comme la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien testé qui inhibe la croissance visible du micro-organisme testé, et elle est généralement exprimée en $\mu\text{g/mL}$ ou mg/L ⁷⁰.

- **Méthode de dilution en milieu liquide**

Les méthodes de dilution en bouillon ou en gélose sont utilisées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un agent antimicrobien in vitro. La CMI est définie comme la concentration la plus faible d'agent antimicrobien qui inhibe la croissance du micro-organisme testé.

- **Dilution du bouillon**

La microdilution et la macrodilution en bouillon sont des méthodes de test de sensibilité aux antimicrobiens très basiques. Le processus implique la préparation de dilutions doubles de l'agent antimicrobien dans un milieu de croissance liquide, qui est ensuite distribué dans des tubes avec un volume minimum de 2 ml ou dans des plaques de microtitration à 96 puits avec des volumes plus petits. Chaque tube ou puits est ensuiteensemencé avec un inoculum microbien dilué dans le même milieu, après dilution d'une suspension microbienne standardisée ajustée à l'échelle 0,5 McFarland. Après un mélange adéquat, les tubes ou la plaque de microtitration sont incubés sans agitation dans des conditions appropriées pour le micro-organisme testé.

La CMI (concentration minimale inhibitrice) correspond à la plus petite concentration d'agent antimicrobien qui est capable d'inhiber complètement la croissance de l'organisme testé, telle que visible à l'œil nu dans les tubes ou les puits de microdilution⁷¹.

- **Dilution en gélose**

La méthode de dilution sur gélose implique l'incorporation d'agent antimicrobien à différentes concentrations souhaitées dans un milieu gélosé fondu en utilisant généralement des dilutions doubles en série. Ensuite, un inoculum microbien défini estensemencé sur la surface de la plaque de gélose. La CMI est enregistrée comme étant la plus faible concentration

d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées⁷¹.

La méthode de dilution en gélose est appropriée pour les tests de sensibilité antibactériens et antifongiques. Elle est souvent préférée à la dilution en bouillon pour la détermination de la CMI lorsque plusieurs isolats sont testés contre un seul composé ou lorsque le composé testé masque la détection de la croissance microbienne dans le milieu liquide avec sa coloration.⁷¹.

C. Activité anti-inflammatoire

a. Définition

L'inflammation est le mécanisme de défense immunologique par lequel le corps combat les infections ou les blessures causées par des virus, des bactéries et d'autres agents pathogènes⁷². De plus, l'inflammation s'avère de plus en plus être impliqué dans le développement de plusieurs maladies chroniques telles que l'artériosclérose, le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives et même le cancer. Depuis les années 1970, l'aspirine et autres anti-inflammatoires non stéroïdiens ont été utilisés pour traiter l'inflammation aiguë⁷³.

b. Méthodes d'évaluation *in vivo* de l'activité anti inflammatoire

α. Test de l'œdème aigu induit par la carragénine sur la patte de souris

Méthode 1

L'injection intra-plantaire de carragénine induit une augmentation aiguë et progressive du volume de la patte injectée. Cet œdème, qui est proportionnelle à l'intensité de la réponse inflammatoire, est un paramètre utile dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire. La carragénine déclenche le processus inflammatoire, atteignant des niveaux de sélection entre 2 et 3 heures après l'application^{74, 75}.

Avant le test, le volume du membre pelvien inférieur de l'animal (patte arrière) doit être évalué par pléthysmométrie (un outil très utile pour évaluer la réponse inflammatoire induite expérimentalement chez les petits rongeurs et pour dépister

les propriétés anti-inflammatoires ou anti-œdème potentielles de la substance pharmacologique). L'administration doit se faire dans un groupe témoin pour évaluer le solvant utilisé pour la solubilisation du composé testé, un groupe témoin avec un anti-inflammatoire de référence, et les groupes à tester avec des doses bien définies. Après 1h d'application, le volume doit être mesuré à 30, 60, 120 et 180 minutes par l'injection de la patte dans le pléthysmomètre⁷⁶.

Méthode 2

Les extraits à tester ont été administrés par sonde gastrique dans 0,5 ml d'eau. Les souris témoins, reçoivent le même volume d'eau par la même voie. Pour induire une inflammation, 0,025 ml carragénine est injectée dans la plante de la patte arrière gauche. 0,025 ml d'une solution saline à 0,9 % également injectée dans la plante de la patte, ou patte témoin. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale. Les pattes sont immédiatement amputées au niveau de l'articulation talo-crurale et pesées sur une balance analytique. Les extraits à tester sont administrés 30 minutes avant les injections dans la patte et le sacrifice est effectué systématiquement 4 heures après l'injection⁷⁷.

β. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

L'importance du test est d'évaluer la capacité à inhiber la formation d'œdème dans l'oreille des animaux testés après l'application topique d'huile de croton. Pour effectuer ce test, le composé à tester doit être administré une heure avant sur la surface de l'oreille interne. Il convient de décider quelle oreille recevra l'induction du processus inflammatoire avec de l'huile de croton, et laquelle recevra de l'acétone en même quantité que l'huile pour le contrôle négatif. Par la suite il faut mesurer la formation d'œdème dans les deux oreilles. Le test peut également être utilisé en ajoutant un groupe d'animaux testés avec des médicaments déjà connus sur le marché, tels que l'indométhacine et la dexaméthasone⁷⁸.

D. Activité analgésique

Le test de contorsion abdominale chez la souris est une méthode couramment utilisée pour évaluer l'activité analgésique des substances contre la douleur, où l'acide acétique à la concentration de 0,6% (0,1mL/10g de l'animal) induit des lésions sur l'abdomen des souris, ce qui suffit à provoquer des spasmes traduits en contorsions. Le composé testé doit être appliqué aux concentrations prédéfinies. Après 60 minutes, appliquez l'injection péritonéale d'acide acétique et placez l'animal dans une boîte en acrylique afin qu'il soit possible d'observer le nombre de contractions effectuées pendant 20 minutes⁷⁹.

**CHAPITRE 2 : ÉTUDE
PHYTOCHIMIQUE DES DEUX
ESPECES : *PITURANTHOS
SCOPARIUS* ET *POGOSTEMON
CABLIN***

I. Monographie des plantes étudiées

1. *Pituranthos Scoparius* (*Deverra Scoparia*)

A. Présentation de l'espèce

P. Scoparius (Coss & Dur) Benth & Hook, également connue sous le nom de *Deverra Scoparia*, est une plante endémique de la région saharienne de l'Afrique du Nord⁸⁰. Bien qu'elle soit considérée comme rare dans le Sahara central, elle est fréquente dans les hauts plateaux du Tassili n'Ajjer, l'Atlas saharien et le Sahara septentrional.⁸¹ connue sous le nom de « Tattayet » en Tamahaq (langue touareg) et « Guezzah » en arabe.

B. Caractéristiques botaniques

P. Scoparius est une plante vivace aphyllé. Les tiges mesurent 40 à 80 cm de haut. Les fleurs, souvent à pédoncule, pétales blancs et les nervures médullaires, elles sont regroupées en ombelles latérales assez étalées (figure 7). Cependant, en raison de la température élevée du Sahara central à partir de laquelle les plantes utilisées dans cette expérience ont été obtenues, les espèces utilisées ne contenaient pas de feuilles, de fleurs ou de graines. La floraison a lieu de février à octobre, D'après Quezel et Santa la classification botanique de *P. Scoparius* est comme suit ⁸⁰ :

Règne : Végétal.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Ordre : Ombellales.

Famille : Apiaceae.

Genre : *Pituranthos*.

Espèces : *Pituranthos Scoparius* (Coss. et Dur.) Benth et Hook

Autre appellation :

Deverra Scoparia (Coss. & Durieu)

Deverra fallax (Batt. & Trab.)

Deverra virgata (Coss. & Durieu)

Pituranthos fallax (Batt. & Trab.)

Pituranthos virgatus (Coss. & Durieu)



Figure 7 : Photographie montrant l'espèce *Pituranthos Scoparius*

C. Utilisations thérapeutiques traditionnelles

Pituranthos Scoparius, également connue sous le nom de *Deverra Scoparia*, est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle dans plusieurs pays d'Afrique du Nord, y compris en Algérie, pour le traitement de diverses maladies⁸².

Elle est couramment utilisée comme additif alimentaire pour aromatiser les aliments⁸³. Cette plante est traditionnellement employée par les guérisseurs locaux pour soigner des affections telles que les rhumatismes et l'asthme^{83, 84}, la rougeole, la jaunisse, les troubles digestifs, les soins post-partum, l'indigestion, les maux d'estomac et abdomen⁸⁴. De plus, elle est utilisée pour les maux de tête⁸⁵, les spasmes, les douleurs, le diabète, les hépatites et les infections urinaires⁸⁶.

D. Travaux antérieurs

a. Composition chimique des huiles essentielles

Les recherches antérieures sur la composition chimique des huiles essentielles de *P. Scoparius* obtenues par HD (hydrodistillation) et SD (entraînement à la vapeur) de différentes origines sont résumées dans le tableau 2. Il est à noter qu'aucune étude sur l'extraction de l'huile essentielle de *P. Scoparius* en fonction des méthodes n'a été réalisée à ce jour. Comme mentionné ci-dessus, une différence qualitative et quantitative significative dans les compositions chimiques de HE a été observée. Le tableau 1 montre que la plupart des échantillons, qu'ils proviennent de Tunisie ou de différentes régions algériennes (M'sila, Batna, Biskra et Souk Ahras) étaient caractérisés par une quantité élevée d' α -Pinène (8.3-35.8 %) et de Sabinène (14.8 -34.4 %)^{85, 87, 88}. Par ailleurs, les huiles essentielles obtenues à partir des graines et des tiges d'Oum El Bouaghi étaient dominées par l'Apiol (52.8% et 15%, respectivement) et l' α -Pinène (11% et 34%, respectivement).

L'Acétate de bornyle était présent en grande quantité uniquement dans l'huile essentielle des graines (21 %)⁸⁹. Le Limonène (32.7-66.5%), la Myristicine

(jusqu'à 31,0%), le Dillapiol (jusqu'à 23%) et l' α -Pinène (4.4-11.2%) étaient les principaux composés de l'huile essentielle de partie aérienne de *P. Scoparius* de Ghardaïa⁹⁰, tandis que le Germacrène D (12.7 %) était le composé majoritaire de l'huile de tiges et l'oxyde de Caryophyllène (12.2 %) le composé majoritaire des graines de la même région de Ghardaïa. Ces deux échantillons étaient également caractérisés par des quantités similaires de limonène, de Myristicine et d' α -Pinène (6.8-9.8 % et 8.2-11.2 %, respectivement) pour les huiles de tiges et de graines⁹¹. Les échantillons de Djelfa et de Laghouat ont montré des profils chimiques similaires, dominés par l' α -Pinène (23.7-35,8%), le Dillapiol (9.9-47.3%), le limonène (jusqu'à 30%), l'Acétate de bornyle (3.0-9.6%) et le β -Pinène (jusqu'à 5.3%).

Cependant, la Myristicine n'était présente en grande quantité que dans l'huile essentielle de la région de Djelfa (jusqu'à 18.2 %) ⁹⁰. La Myristicine (24.1 %) et l' α -Pinène (14.4 %) étaient également les principaux composés dans l'huile de M'sila, suivis de l' α -Phellandrène (15.6 %) ⁹². Les huiles essentielles de *P. Scoparius*, isolées de Batna, Bechar et Ghardaïa, contenaient les mêmes composés dominants : 6-Méthoxyélémicine (0–59.6%), Limonène (0.3–44%), sabinène (0.8–55.6%), Myristicine (0 à 32.4 %) et α -Pinène (0,7 à 31,0 %).

Le Dillapiol a été trouvé comme composé principal uniquement dans l'huile essentielle de Batna (jusqu'à 16.8 %) ⁹³. La 6-méthoxyélémicine n'a été identifiée ni dans notre travail, ni dans d'autres rapports. Dans la même étude, les échantillons provenant de Biskra étaient dominés par le Sabinène (19.9-28.0%), l'Elémicine (jusqu'à 29,1%) et la Myristicine (jusqu'à 20,1%), tandis que le Dillapiol et l' α -Pinène étaient également présents avec des pourcentages appréciables (1.4-18 % et 7.2-11.2 %, respectivement) ⁹³.

Le Limonène (46.9 %) était le composé prédominant dans l'échantillon de Tamenrasset, suivi du 1,8-cinéol (7.6) ⁹⁴. En revanche, l' α -Pinène (12.1%), l'Epi-Bicyclosesqui phellandrène (8.4%), l'Erémophilène (8.2%) et le γ -Cadinène (6.3%) étaient les principaux composants de l'huile essentielle obtenue par

hydrodistillation de la même région (Tamenrasset)⁹⁵. De plus, la 7-Méthoxy-3-méthyl-1-H-isichromène-1-one et le méthyl propène ont été identifiés, ainsi que la Myristicine, en quantités appréciables uniquement dans l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur de Ghardaïa (10.6 %, 9.9 % et 12.1 %, respectivement)⁸⁵.

L'ensemble des informations précédemment citées sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Principaux composés des huiles essentielles de *P. Scoparius* de différentes origines précédemment signalés.

| Pays/ Region | | Partie utilisée | Composés majoritaires (%) | | | | | | Ref |
|--------------|----------------|-----------------|---------------------------|----------|-----------|-------------|-------------|---|-----|
| | | | α -Pinène | Sabinène | Limonène | Myristicin | Dillapiol | Autres composés majoritaires | |
| Algérie | Oum El Bouaghi | T | 34 | - | - | - | - | Apiol (15.0) | 89 |
| | | G | 11 | - | - | - | - | Apiol (52.8) ; Bornyl acétate (21%). | |
| | Ghardaïa | T | 6.8 | - | 9.8 | 7.2 | - | Germacrène D (12.7) ; α -Phéllandrène (7.1); Méthyl eugénol (5.9). | 91 |
| | | G | 8.2 | - | 11.2 | 11.1 | - | Caryophyllène oxide (12.2); <i>p</i> -Cymène (7.5); Thymol (5.9). | |
| | M'sila | F | 17.4 | 7.5 | - | 24.1 | - | α -Phellandrène (15.6). | 92 |
| | Ghardaïa | P | 4.4-11.2 | - | 32.7-66.5 | \leq 31.1 | \leq 23.0 | α -Phellandrène (\leq 6.4); Germacrène D (\leq 6.3). | 90 |
| | Djelfa | P | 23.7-27.0 | - | 1.0-7.8 | \leq 18.2 | \leq 47.3 | Bornyl acétate (\leq 9.6); <i>p</i> -Cymène (2-6.7); β -Pineène (\leq 5.3). | |

| | | | | | | | | |
|------------------|---|-------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|--|----|
| Laghouat | P | 35.1 - 35.8 | - | 7.0- 30.0 | - | 9.9- 25.7 | Bornyl acétate (3.0- 9.5); β -Pinène (5.2). | |
| M'sila | P | 16.4 | 14.8 | - | - | - | Caryophyllène oxide (9.7); α -Farnesène (7.7); α -Terpinène (5.8). | 88 |
| Batna | P | 23.3 | 18.6 | - | - | - | α -Terpinène (7.7); β -Ocimène-E (7.6). | |
| Biskra | P | 8.3- 13.4 | 18.9 - 24.8 | - | 7.6 | 6.6- 16.8 | - | |
| Tamenraset | P | 12.1 | - | - | - | - | Bornyl acétate (32); Epi-Bicycle sesquiphellandrène (8.4); Eremophilène (8.2); γ -Cadinène (6.3). | 95 |
| Ghardaïa | P | - | - | - | 12.1 | - | 7-Methoxy-3-methyl- 1-H isichromen-1-one (10.6); Methyl propène (9.9). | 96 |
| Souk Ahras | P | 16.3 - 26.5 | 23.6 - 34.4 | - | - | - | <i>p</i> -Cymène (8.6-10.1); Terpinèn-4-ol (4.1 - 9.7); α -Thujène (5.3- 5.7); β -Pinène (\leq 5.5). | 85 |
| Tamenra -sset | P | - | - | 46.9 | - | - | 1.8-Cinéol (7.6). | 94 |
| Batna | P | \leq 11.2 | \leq 10.5 | \leq 22.4 | \leq 19.4 | \leq 16.8 | 6-Methoxyélémicine (\leq 58.2). | 93 |

| | | | | | | | | |
|----------------|---|--------------|-------------------|--------------|-----------|------|--|-----------|
| Biskra | P | 7.2- 11.2 | 19.9 - 28.0 | - | ≤ 20.1 | ≤ 18 | Elémicine (≤ 29.1). | |
| Bechar | P | | 32.4 | 19.1 | - | - | 6-Methoxyelemicine (27.4). | |
| Ghardaïa | P | 2.8- 17.1 | ≤ 31.3 | 9.2- 26.7 | ≤ 13.6 | - | 6-Methoxyelemicine (≤ 29.4); α -Phellandrène (≤15.4); β -Phellandrène (≤ 7.9); β -Pinène (≤ 7.1). | |
| Tunisie | P | 32.0 | 17.2 | - | - | | Δ -3-Carene (16.9); α -Thujène (13.7); Ocimène (9.8). | 87 |

P : Parties aériennes ; T : Tiges ; F : Fleurs ; G : Graines.

b. Activités Biologiques des huiles essentielles

À notre connaissance, il y a très peu de rapports disponibles concernant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P. Scoparius*. Les résultats obtenus par Ksouri et al. ont montré que les espèces fongiques testés étaient très sensible à l'huile essentielle de *P. Scoparius* contrairement aux bactéries de grammes négatives qui étaient très résistantes⁹⁴. D'autres échantillons ont aussi montré une très faible activité contre l'*Escherichia coli*, la *Klebsiella pneumoniae* et le *Bacillus cereus*, avec des diamètres de zone d'inhibition compris entre 6 et 8.7 mm⁹⁷. A l'inverse, Boutaghane et al. ont révélé que l'huile essentielle extraites des tiges et des graines de espèces récoltées dans la région de Ghardaïa a inhibé la croissance des micro-organismes de gramme négatif, nommément la *Pseudomonas aeruginosa*, le *Proteus mirabilis* et la *Klebsiella pneumonie*⁹⁸. Malti et al. rapportent également une sensibilité des espèces fongiques aux huiles essentielles des parties aériennes de *Pituranthos scoparius*⁹⁷.

Aucune étude n'a été portée sur l'activité antiinflammatoire ou analgésiques des huiles essentielles de *P. Scoparius* mais uniquement sur des extraits. Les résultats trouvés par Karbab et al. ont révélé que l'extrait hydrométhanolique de *P.*

Scoparius a un effet anti-inflammatoires et analgésiques chez les souris. De plus, l'extrait n'a donné aucun signe de toxicité ou de mortalité lié au traitement chez le rat. L'extrait n'était pas toxique même à 5 g/kg de poids corporel chez les rats⁸². Dans une autre étude l'extrait aqueux a donné une excellente activité anti-inflammatoire ($80,30 \pm 5,91$) %⁹⁹.

II. *Pogostemon Cablin*

A. Présentation de l'espèce

Le patchouli est une herbe vivace, ramifiée et aromatique avec feuilles parfumées. En arabe le patchouli est appelé *Rihane*. Cette plante a été décrite pour la première fois par le botaniste Pelletier-Sautelet aux Philippines en 1845 et a été nommé *Pogostemon* patchouli. On pense qu'il s'agit d'une espèce originaire des Philippines. Elle pousse à l'état sauvage en Malaisie, en Indonésie, Singapour et dans plusieurs parties du monde. Le patchouli cultivé en zones côtières du sud de l'Inde, du Bengale occidental, de l'Assam, Karnataka, Madhya Pradesh et les régions côtières de Gujarat¹⁰⁰.

B. Caractéristiques botaniques

Le patchouli est une plante herbacée vivace rustique adaptée aux conditions climatiques chaudes et humides. Il pousse jusqu'à 1 à 1,2 mètre de hauteur avec une tige dressée et de larges feuilles (0,85 pouces). Le Patchouli est une plante qui présente des tiges tétraogonales et des feuilles opposées, ovales, larges, molles, veloutées et irrégulièrement dentées (figure 8). Sa fragrance distinctive et tenace est due à ses feuilles. Les bords des feuilles sont lobés et des poils abondants sont présents sur sa face dorsale¹⁰¹. Les feuilles sont connues pour accumuler de l'huile essentielle dans les trichomes glandulaires¹⁰². Les épis de petites fleurs blanches ou rose-blanc pâle se trouvent à l'extrémité des tiges de la plante¹⁰³.

La classification botanique de *Pogostemon Cablin* est comme suit :

Règne : Végétal.
Embranchement : Spermaphytes.
Sous embranchement :
Angiospermes.
Classe : Dicotylédones.
Ordre : Ombellales.
Famille : Lamiacées.
Genre : *Pogostemon*.
Espèces : *Pogostemon Cablin benth.*



Figure 8 : Photographie montrant l'espèce *Pogostemon Cablin*

C. Application du *Pogostemon Cablin*

Le patchouli est un constituant clé des parfums exotiques afin de donner une touche épicée au parfum. Il peut aussi être utilisé dans les produits cosmétiques et comme parfum à part entière. Il a aussi une bonne propriété fixatrice, en particulier dans les parfums de savon¹⁰⁴.

L'huile essentielle de patchouli est reconnue pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques, telles que ses effets cicatrisants, antidépresseurs, antiphlogistiques, antiseptiques, aphrodisiaques, astringents, cytophylactiques, insecticides, déodorants, diurétiques, fébrifuges, fongicides, sédatifs et toniques. En aromathérapie, le patchouli est utilisé pour calmer les nerfs, contrôler l'appétit et soulager la dépression et le stress. A haute dose, il peut stimuler et à plus faible dose c'est un sédatif. Il est utilisé pour aiguïser l'intelligence et améliorer concentration¹⁰⁵.

En médecine chinoise, la décoction de feuilles est utilisée avec d'autres médicaments pour traiter les vomissements, les nausées, la diarrhée, le rhume et les maux de tête¹⁰⁶.

En Malaisie et au Japon, il est utilisé comme antidote pour les morsures de serpent venimeux et les feuilles fraîches sont utilisées pour guérir d'autres maladies. L'huile essentielle de patchouli est efficace contre les champignons et les infections bactériennes et est d'une grande aide pour les piqûres d'insectes. Sur la

peau, l'huile de patchouli est l'une des plus actives et est un superbe régénérateur tissulaire, qui aide à stimuler la croissance de nouvelles cellules cutanées. Dans la cicatrisation des plaies, non seulement il favorise une guérison plus rapide, mais aide également à prévenir la laideur des cicatrices lorsque la plaie est guérie. L'huile essentielle de patchouli est également utilisée comme remède topique pour les problèmes de peau tels que l'eczéma, l'acné, la peau enflammée, craquelée, gercée et irritée.

D. Travaux antérieurs

a. Composition chimique des huiles essentielles

Les feuilles séchées donnent une odeur typique de patchouli, moins développée que celle des feuilles fraîches. Pour l'extraction des huiles essentielles, le séchage à l'ombre est favorisé car la perte d'huile est observée lorsque les feuilles sont séchées au soleil. Le patchouli est l'une des rares huiles à conserver ces caractéristiques dans le temps. C'est l'une des plus chères et des plus durables huiles de conservation¹⁰⁷.

Les avantages potentiels de *P. cablin* ont été bien explorés ces dernières années par de nombreux scientifiques. Diverses études sur ses activités chimiques et biologiques sont bien documentées et plus des études de recherche récentes se concentrent sur l'isolement de composés individuels pour comprendre leurs mécanismes impliqués dans diverses activités pharmacologiques. Cette plante contient divers composés phytochimiques dont de nombreux monoterpénoïdes, triterpénoïdes, sesquiterpénoïdes, phytostérols, flavonoïdes, acides, lignines, glycosides, alcools et aldéhydes¹⁰⁸.

Les composants chimiques volatils connus et identifiés à partir de l'huile essentielle de patchouli sont présentés dans le tableau 3. Les larges fourchettes de ce tableau donnent une indication sur les composés qui sont des constituants majeurs, intermédiaires et mineurs.

Tableau 3 : Variation des composés volatils identifiés à partir de plus de cents huiles essentielles de *Pogostemon Cablin* (rapportée dans la littérature)¹⁰⁹ :

| Composés | % |
|---|----------------|
| α -Pinène | 0.01-0.3 |
| β -Pinène | 0.02-1 |
| Limonène | 0.01-0.3 |
| δ -Elémène | 0.01-1.9 |
| β-Patchoulène* | 0.03-12 |
| β -Elémène | 0.18-1.9 |
| Cycloseychellène | 0.02-0.8 |
| (E)- β -Caryophyllène | 0.75-6.8 |
| α-Guaiène* | 2.9-23 |
| Seychellène* | 2.3-13 |
| α -Humulène | 0.05-2 |
| α-Patchoulène* | 1.2-13 |
| Germacrène D | 0.0-0.2 |
| Aciphyllène | 0.7-4.2 |
| α-Bulnesène* | 2.9-23 |
| Norpatchoulénol | 0.11-4.0 |
| Caryophyllene oxide | 0.0-4.6 |
| Pogostol | 0.2-6.2 |
| Patchoulol* | 11-72 |

**Composés majoritaires des huiles essentielles de Pogostemon Cablin*

Plus de 100 analyses d'huile provenant de 75 articles ont été évalués et les résultats exprimés en pourcentage moyen et en fourchettes sont résumés dans le tableau 3.

On remarque une énorme variation entre les composés des huiles essentielles identifiées principalement pour le patchoulol (11-72) %, α -Bulnesène (2.9-13) %, α -Guaiène (2.9-23) % et α -Patchoulène (1.2-13) %. La composition chimique de l'huile essentielle de patchouli varie selon les échantillons prélevés dans différents lieux géographiques. Li et al.¹¹⁰ ont révélé l'effet significatif des

différentes régions, la période de collecte, et les méthodes d'extractions sur le rendement en huile essentielle et ses principaux constituants.

L'huile de patchouli est riche en sesquiterpènes, principalement l'alcool de patchouli (Patchoulol), un tricyclique sesquiterpène qui est largement utilisé dans les produits de parfumerie, les savons et autres produits cosmétiques¹¹¹.

Patchoulènes, Guaiène, Seychellène sont quelques autres hydrocarbures sesquiterpéniques qui caractérisent également l'arôme de l'huile essentielle de patchouli. Selon de nombreux chercheurs, le Patchoulol et l' α -Patchoulène sont les principaux constituants qui régulent et contrôlent la qualité de l'huile de patchouli¹¹¹⁻¹¹³. Plusieurs autres sesquiterpènes minoritaires comme le Caryophyllène, le Pogostol, le α -, β -, γ - et δ -Patchoulène, le Seychellène, le Cycloseychellène, Le α - et β -Bulnésène, le α -, β -Guaiène et le Norpatchoulénol sont également signalés dans l'huile de patchouli.

b. Différentes méthodes réalisées sur l'extraction des huiles essentielles

L'huile essentielle de patchouli peut être extraite de toutes les sections de plante (feuilles, tige et racines). Généralement, il est rapporté que la partie aérienne de la plante enferme la qualité suprême d'huile, et qui peut être extrait selon quatre méthodes. Après séchage des feuilles qui sont par la suite bien conservées, elles peuvent être facilement utilisées ou transportées pour le processus de distillation.

Les feuilles séchées peuvent être conservées pendant 4 à 6 mois pour extraire une plus grande quantité d'huile essentielle à forte odeur. Classiquement, l'entraînement à la vapeur est le processus qui est collectivement utilisé pour extraire l'huile de patchouli¹¹⁴. D'autres techniques conventionnelles et non conventionnelles par lesquelles l'huile de patchouli a été extraite sont résumées dans le tableau 4. Ce dernier passe en revue le travail effectué jusqu'à ce jour pour extraire l'huile essentielle de la plante de patchouli.

Classiquement, le rendement le plus élevé (1.53 %) était obtenu par hydrodistillation avec 64.90% de patchoulol¹¹⁵ alors que l'hydrodistillation

assistée par micro-ondes a fourni de meilleurs résultats (6.01 %) avec une teneur en patchoulol améliorée dans le cadre d'un concept plus écologique¹¹⁶. Cependant, l'entraînement à la vapeur reste la méthode idéale pour extraire huiles essentielles à partir de matières premières à l'échelle industrielle¹¹⁴.

Tableau 4 : Différentes méthodes réalisées sur l'extraction des huiles essentielles de *Pogostemon Cablin*.

| Partie de la plante | Technique d'extraction | Rendement (%) | Patchoulol (%) | Ref |
|-----------------------------|---|---------------|----------------|-----|
| Feuilles séchées | Extraction au CO ₂ supercritique | 5.07 | - | 117 |
| | SD | 1.05 | - | |
| | Extraction au CO ₂ supercritique | - | - | 118 |
| | HD | 1.53 | 64.90 | 115 |
| | MAE | 3.84 | - | 119 |
| | MAHD | - | 26.32 | 120 |
| | MAE | - | 25.32 | |
| | MAE | 4.60 | - | 121 |
| | SFME | 4.00 | - | |
| | MAE | 6.01 | - | |
| Feuilles et racines séchées | SD | 2.40 | 38.24 | 122 |
| | WBD | 5.90 | 61.23 | |

SD : entraînement à la vapeur, *MAE* : Hydrodistillation assistée par micro-ondes, *MAHD* : Hydrodistillation à air micro-ondes, *WBD* : Distillation à bulles d'eau, *SFME* : Extraction par micro-ondes sans solvant - : non rapporté.

c. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles

L'activité antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Pogostemon Cablin* a été le sujet de beaucoup d'auteurs^{123, 124}. Pour les bactéries de gram-négatives, l'huile de *P. Cablin* a donné une faible activité antimicrobienne contre *Pseudomonas*

aeruginosa et *Salmonella enterica*, et une activité modérée contre *Yersinia enterocolitica* et *Serratia marcescens*. Chez les micro-organismes de gram positifs, une faible activité antimicrobienne a été détectée contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, et une activité antimicrobienne modérée a été démontrée contre *Enterococcus faecalis* et *Micrococcus luteus*¹²³. L'activité antibactérienne a révélé que l'huile essentielle du *Pogostemon Cablin* était plus active contre les bactéries de gram positives que les bactéries de gram négatives. La plus grande zone d'inhibition était de 35 mm (contre *Bacillus cereus*)¹²⁴. L'huile a aussi montré une activité antifongique modérée contre *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*¹²⁴.

CHAPITRE 3 :
MATÉRIELS & MÉTHODES

I. Récolte du matériel végétal

1. *Pituranthos Scoparius*



Etude botanique

Nom scientifique : *Pituranthos Scoparius* ou *Deverra Scoparia*

Français : Fenouil sauvage

Arabe : Guezzah

Tamahaq : Tattayet

Figure 9 : *Pituranthos Scoparius*
plante entière

Les parties aériennes de l'espèce *Pituranthos Scoparius* (figure 9) ont été recueillies sur deux saisons (juillet et mars 2012) dans trois stations différentes à Tamanrasset en Algérie. La localisation a été enregistrée à l'aide du GPS système de positionnement global (tableau 5). La figure 10 montre la Population de *Pituranthos Scoparius* étudiée.

Tableau 5 : Paramètres géographiques des habitats naturels de *Pituranthos Scoparius* en Algérie.

| A | Site de récolte | Latitude | Longitude | Altitude (m) | Distance ^a |
|----|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|
| Ou | Oued Iguioui, Tamanrasset, | 23°04'35,6"N | 5°26'15,2"E | 1600 | 75 km |
| Ta | Taessa, Tamanrasset | 23°05'64,2"N | 05°30'79,7"E | 1748 | 80 km |
| II | Illamane, Tamanrasset | 23°14'17,7"N | 5°30'52,0"E | 2789 | 140 km |

Propriétés géographiques des habitats naturels de Pituranthos Scoparius en Algérie

N : direction du nord.

E : direction de l'est.

a : Distance de Tamanrasset.

A : Abréviation.

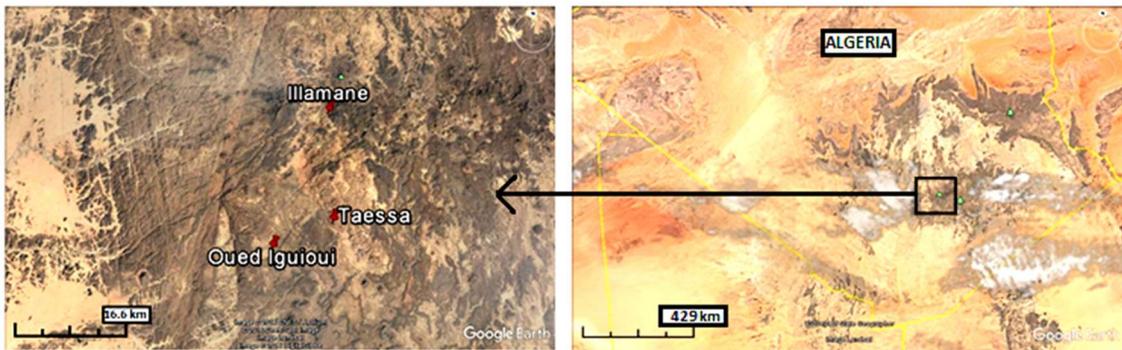


Figure 10 : Population de *Pituranthos Scoparius* (*Deverra Scoparia*) étudiée.

a. Identification de la plante

L'identification a été faite dans le laboratoire de l'Institut National de Recherche Forestière de la NFRI botanique à Tamanrasset Algérie, la matière végétale a été stockée et maintenue dans un endroit frais, sec et sombre.

2. *Pogostemon Cablin*

La matière végétale sèche en provenance de Chine a été achetée dans une herboristerie de la wilaya de Blida, le nom commun du *Pogostemon Cablin* est le Patchouli (figure 11).



Figure 11 : *Pogostemon Cablin*
plante entière

Etude botanique

Nom scientifique : *Pogostemon Cablin* (figure 11)

Français : Patchouli

II. Extraction des huiles essentielles

1. Extraction des huiles essentielles par hydro-distillation

Au cours de chaque essai, 200 g de la plante sèche sont introduit dans un ballon en pyrex et distillé avec 4L d'eau pendant 4h en utilisant un appareil de type

Clevenger. Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition et la vapeur d'eau entraîne avec elle l'huile essentielle à travers un tube de condensation. Lorsque la première goutte de distillat apparaît à la sortie du tube, l'huile essentielle est collectée¹²⁵. Les huiles essentielles sont recueillies et stockées dans un flacon brun scellé à 4 °C dans l'obscurité pour d'autres expériences. Nous avons calculé le rendement basé sur le poids sec de l'échantillon.

2. Extraction des huiles essentielles par Micro-onde

Cette technique est utilisée dans l'optique d'évaluer l'influence du micro-onde sur le rendement d'extraction et la composition chimique des huiles essentielles (figure 12). Le montage est constitué d'un four à micro-ondes (MW8123ST, *Samsung*, United Kingdom) dans lequel est introduit un ballon de 1 L contenant la matière première 100 g et l'eau distillée 100 ml. Cet ensemble est directement relié au dispositif Clevenger, situé à l'extérieur du four¹²⁶. L'expérimentation est menée à une puissance de 850 W, 2450 MHz pendant 50 min. Les huiles essentielles récoltées sont stockées dans des flacons ambrés à 4°C.

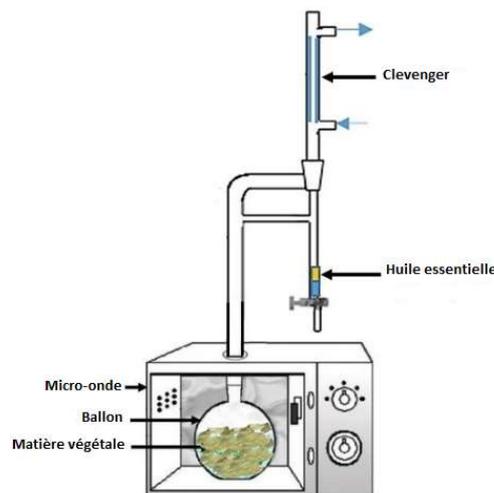


Figure 12 : Le montage expérimental pour l'extraction d'huile essentielle en utilisant la méthode d'hydrodistillation par micro-ondes

3. Extraction des huiles essentielles par entraînement à vapeur

L'évaporation sélective de la partie volatile d'une plante peut être réalisée par l'entraînement à la vapeur d'eau. Dans cette méthode, 200 g de matière végétale

est placé dans une ampoule à décanter ou un tube relié à un ballon qui contient 5 L d'eau. La vapeur d'eau est mise en contact avec la matière végétale finement divisée et les constituants volatils sont éliminés de la plante. Ils sont ensuite condensés en passant par le condensateur¹²⁷. Les huiles essentielles sont recueillies sur de l'eau et ensuite stockées dans un flacon brun scellé à 4 ° C dans l'obscurité pour d'autres expériences.

III. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle (R_{HE}) est défini selon la norme AFNOR (1986) comme le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M_{HE}) et la masse de la matière végétale utilisée (M_V). Il peut être calculé en utilisant la formule suivante :

$$R_{HE} = (M_{HE} / M_V) * 100$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle de *Pituranthos Scoparius*.

M_{HE} : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

M_V : masse de la matière végétale utilisée en gramme.

IV. Extraction des composés phénoliques

1. Sélection du meilleur solvant d'extraction

Une recherche préalable du meilleur solvant d'extraction est menée. La poudre de feuilles broyées de chacune des espèces étudiées est extraite par une macération simple (10 g) en utilisant des solvants de nature différente. Quatre solvants sont sélectionnés à l'état pur : le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et l'acétone.

A. Préparation des extraits organiques

La partie aérienne de la plante est broyée et soumise à des extractions utilisant des solvants organiques de polarité croissante tels que l'acétone, l'éthanol, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Pour chaque extraction, 10 g de poudre sont mélangés avec 100 ml de solvant et agités à température ambiante pendant 48

heures, puis filtrés à l'aide d'un papier Whatman N°1. Le filtrat est ensuite concentré sous pression à l'aide d'un rotavapeur, et les extraits obtenus sont stockés à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation. Les rendements de chaque extraction sont calculés en divisant la masse de l'extrait brut par la masse de la poudre végétale sèche introduite.

B. Préparation des extraits aqueux

Parallèlement, nous avons préparé des extraits aqueux en utilisant quatre méthodes différentes :

a. Décoction

10 g de poudre de chaque plante sont soumis à une décoction (10 % poids/volume, plante : eau) la poudre de plante est mise dans un ballon contenant 100 ml d'eau distillée, le tout est bouilli pendant 15 min à une température d'environ 100°C. L'extrait aqueux obtenu après filtration sous vide et refroidissement est lyophilisé.

b. Infusion

10 g de poudre de chaque plante sont introduit dans un ballon contenant 100 ml d'eau distillée bouilli. Le mélange est laissé au repos et hors du feu pendant 15 minutes. Le mélange refroidi est filtré sous vide et lyophilisé.

c. Macération à froid

10 g de la poudre végétale est mélangé avec 100 ml d'eau distillée, pendant 48 h à température ambiante (environ 20°C) en secouant de temps en temps. Après la macération du broyat, la suspension obtenue est filtrée à travers un papier filtre pour séparer le marc du filtrat. Ensuite, l'extrait aqueux obtenu est soumis à un processus de lyophilisation afin de le transformer en poudre.

d. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons est appliquée dans cette partie. 10 g de la poudre végétale est mis dans un ballon et mélangé avec 100 ml d'eau distillée. Le ballon est immergé dans un bain à ultrason pendant 2 h. Le filtrat est récupéré, refroidi puis lyophilisé.

V. Etude de la composition chimique

1. Analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles extraites à partir des matrices végétales étudiées sont analysées qualitativement et semi- quantitativement par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS).

A. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

Les huiles essentielles sont analysées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse de la marque Hewlett-Packard 6800. La colonne capillaire utilisée a une épaisseur de film de 0,25 μm , une longueur de 30 m et un diamètre de 0,32 mm. La température du four est initialement maintenue à 60°C pendant 8 minutes avant d'être augmentée progressivement à raison de 2°C/min jusqu'à atteindre 250°C. Elle est ensuite maintenue à cette température pendant 20 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 250 °C et 280 °C, respectivement. L'hélium est utilisé comme gaz porteur à un débit de 1,2 mL/min. 1 μL d'échantillon est injecté en mode fractionné à un rapport de 1 :70 et l'énergie d'ionisation de détection est de 70 eV.

B. Analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses GC-MS sont effectuées en utilisant les mêmes conditions que pour la chromatographie en phase gazeuse décrite précédemment. Cependant, la GC est couplée à un spectromètre de masse de série MSD 5973 C fabriqué par Agilent

Technologies. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, avec un débit de 1,5 ml/min. La température de l'injecteur est de 250 °C. Un impact électronique à 70 eV est utilisé pour ioniser les échantillons. La plage de balayage de masse est de 29 à 550 Uma. La composition en pourcentage des huiles est exprimée en aire de pic par intégration à partir du courant ionique total. Le pourcentage de chaque composé est calculé à l'aide de la méthode de normalisation, qui consiste à diviser l'aire du pic GC par la somme de toutes les aires de pic, et à multiplier le résultat par 100 pour obtenir la proportion en pourcentage de chaque composé. Cette méthode est appliquée après avoir calculé la valeur moyenne de trois injections sans utiliser de facteurs de correction.

C. Identification des composés :

L'identification des composés est basée sur la comparaison des indices de rétention avec ceux rapportés dans la littérature. Les indices de rétention sont calculés en utilisant l'équation de Van Den Dool et Kratz. Les séries de n-alcane (C₅-C₂₈) sont injectées dans les mêmes conditions. Les spectres de masse EI des huiles essentielles sont comparés à ceux de la bibliothèque de spectres de masse (bibliothèque NIST et Wiley 7N) et de la littérature ²⁹.

$$I_{r_x} = 100 * n + 100(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$$

Avec :

I_{r_x} : Indice de rétention du composé à identifier

n : Nombre de carbone de l'alcane

t_x : Temps de rétention du composé à identifier

t_n et **t_{n+1}** : Temps de rétention des alcanes

La semi-quantification des composés à identifier a été calculée à partir des surfaces des pics des chromatogrammes GC.

2. Analyse des produits lourds

A. Dosage des composés phénoliques totaux

La méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu est utilisée pour mesurer les teneurs en phénols totaux des extraits de *P. Scoparia*¹²⁸. Le réactif de Folin Ciocalteu est un mélange d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) qui ont une couleur jaunâtre caractéristique. Lorsque les phénols présents dans les extraits végétaux sont oxydés, le réactif de Folin Ciocalteu est réduit et forme un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration obtenue est proportionnelle à la quantité de polyphénols dans les extraits végétaux. 200 μ l d'extrait ou d'acide gallique (10-150 μ g/mL) sont mélangés avec 800 μ l d'eau distillée et 100 μ l du réactif Folin Ciocalteu, après 3 min, 300 μ l de solution aqueuse de Na_2CO_3 à 20 % sont ajoutés, le mélange est incubé à température ambiante pendant 2 h. L'absorbance des surnageant clairs est mesurée à 765 nm par rapport à un blanc préparé sans extrait. La teneur totale en composés phénoliques est indiquée en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE)/g de poids sec en utilisant l'équation suivante basée sur la courbe d'étalonnage : $y=0.0343x+0.0058$ selon la figure 13. Toutes les expériences sont réalisées en triplicata.

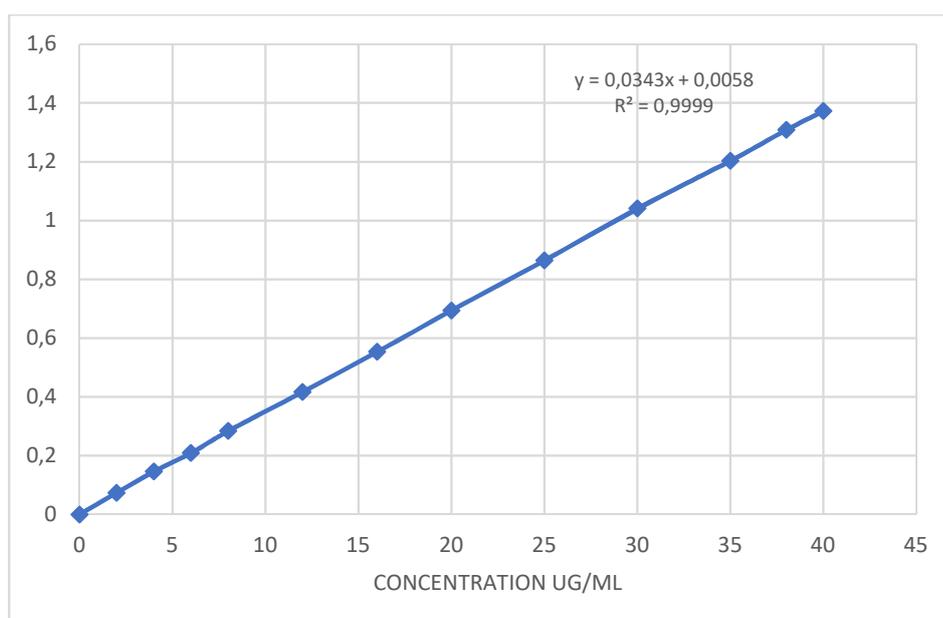


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

B. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des extraits est déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode rapportée par la littérature ¹²⁹. 1 mL d'extrait ou de quercétine (2-40 ug/mL) est mélangé avec 1 mL de solution méthanolique d'AlCl₃ (2%) poids/volume. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 440 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (OPTIZEN 3220), les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg d'équivalents de quercétine (EQ) par g de poids sec en utilisant l'équation suivante basée sur la courbe d'étalonnage : $y=0.0107x+0.0065$ selon la figure 14.

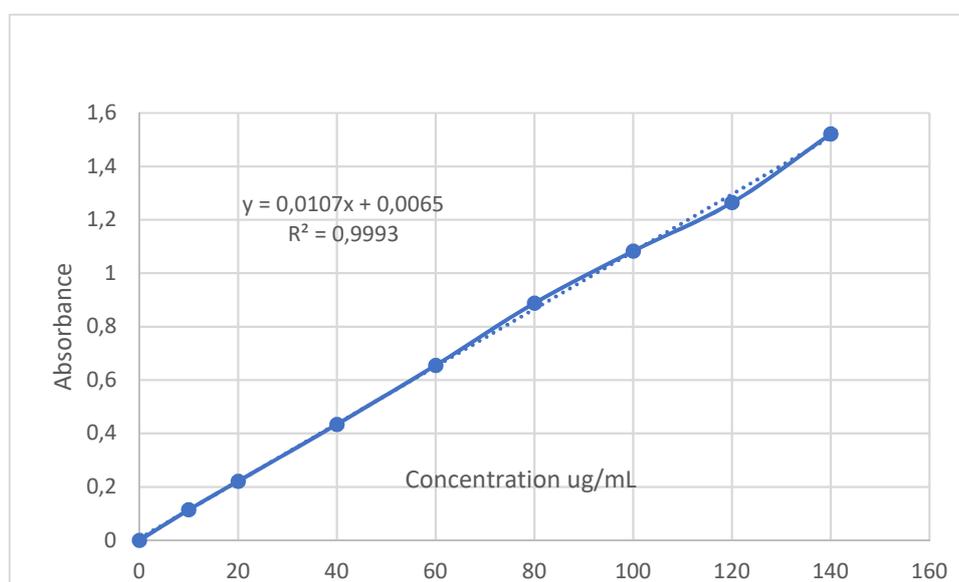


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

C. Evaluation de l'activité antioxydante

a. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres est mesurée en utilisant du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) selon la littérature ¹³⁰. Dans cette expérience, des solutions diluées de différents composés sont préparées en les mélangeant avec du méthanol à différentes concentrations (100, 200, 400, 600, 800 et 1000 µg/mL). Ensuite, 1 mL de chaque solution est mélangé avec 1 mL de solution méthanolique de DPPH (0,0048 %). Après 30 minutes dans l'obscurité à

température ambiante, l'absorbance de chaque solution est mesurée à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (OPTIZEN 3220). Le méthanol est utilisé comme contrôle négatif, le BHT (butylhydroxytoluène) et l'acide ascorbique sont utilisés comme contrôle positif. Le dosage est réalisé en triplicata et le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité de piégeage des radicaux} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: l'absorbance de la réaction de contrôle (contenant tous les réactifs à l'exception du composé à tester)

$A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du composé à tester.

La valeur IC_{50} est déterminée comme la concentration efficace à laquelle le radical DPPH a été balayé à 50 %. La droite d'équation linéaire $y=3.848x + 4.595$ représente les pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration en BHT (Figure 15).

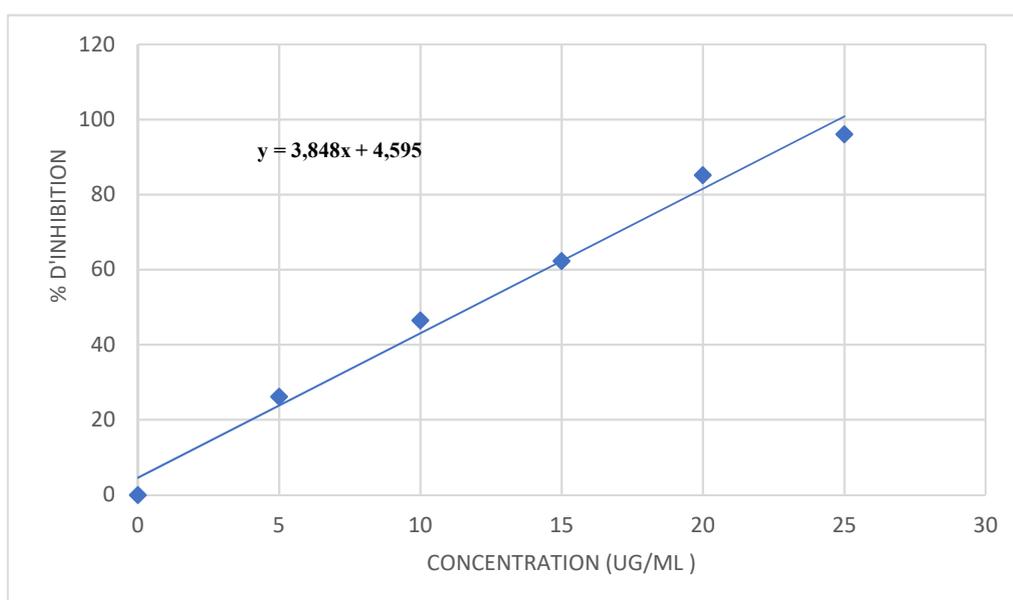


Figure 15 : Courbe des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration en BHT.

b. Pouvoir de réduction du Fer : FRAP

Le pouvoir réducteur des extraits de *P. Scoparia* est mesuré par la méthode rapportée par la littérature ¹³¹. 2.5 mL de différentes concentrations d'extrait méthanolique ou BHT (0.05, 0.2, 0.4 0.6, 0.8, 1.4, 1.6 mg/mL) sont mélangés avec 2,5 mL de tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 ml de (1%) (poids/volume) $K_3Fe(CN)_6$, le mélange est ensuite incubé à 50 °C pendant 20 min. Après refroidissement, 2.5 mL d'acide trichloracétique (10 %) sont ajoutés au mélange pour arrêter la réaction puis centrifugés à 3000 rpm (rotation par minute) pendant 10 min. Enfin, 2.5 mL de la solution surnageante est collectée et mélangée avec 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de chlorure ferrique (0.1 %) et l'absorbance est mesurée à 700 nm par rapport à un blanc préparé sans extrait. La concentration de l'extrait est calculée en traçant l'absorbance à 700 nm par rapport à la concentration d'extrait correspondante. Le dosage est réalisé en triplicata.

VI. Activités biologiques

1. Activité antimicrobienne

A. Souches microbiennes

Neuf souches sont utilisées, dont quatre bactéries Gram-positives : *Staphylococcus Aureus* ATCC 6538/P, *Bacillus Subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus Epidermidis* ATCC 12228 et *Sarcina Lutea*, trois bactéries Gram-négatives : *Enterobacter*, *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia Coli* ATCC 11105 et deux levures : *Saccharomyces Cerevisiae* ATCC 2601 et *Candida Albicans* ATCC 10231.

Les souches microbiennes appartenait à l'American Type Culture Collection (ATCC) à l'exception d'*Enterobacter* qui a été fournie par l'hôpital Frantz Fanon de Blida et l'Institution Pasteur d'Alger. L'activité antimicrobienne est réalisée au niveau du laboratoire pharmaceutique SAIDAL Antibiotique-Médéa.

B. Méthode de diffusion sur disque

L'activité antimicrobienne est déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur disque ¹³². Le test est réalisé en utilisant le milieu Soja Agar pour les germes bactériens et le milieu Sabouraud pour les germes fongiques. Les suspensions microbiennes sont ajustées à 10^6 UFC/mL (unités formant colonies) dans une solution saline stérile et sont striées sur la surface des plaques à l'aide d'un coton-tige stérile afin d'obtenir une croissance microbienne uniforme sur les plaques de test. Des disques de papier filtre stérile (6 mm de diamètre) sont ensuite imprégnés de (10 uL) d'huile essentielle. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 24h pour les souches de bactéries et 48 heures pour les souches de champignons. La pénicilline G, l'oxaline et l'amoxypen à 200 mg/mL sont utilisés comme antibiotiques standard. L'activité antimicrobienne est évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition en mm (diamètre du disque inclus). Les dosages sont effectués en triple.

Des contrôles négatifs sont préparés en utilisant des disques imprégnés des solvants utilisés pour la dilution des extraits.

C. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les échantillons présentant une activité antibactérienne sont sélectionnés pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice par microdilution en bouillon conformément aux directives du Comité national de Normalisation des Laboratoires Cliniques. Des dilutions en série de concentration 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 uL/mL sont réalisées à partir d'une solution initiale préalablement préparées dans du DMSO à une concentration de 1000 µg/mL. Chaque solution de l'extrait (0,5 ml) est ajoutée à un milieu d'agar (5 ml) (Soja Agar ou Sabouraud). Le mélange obtenu est versé dans des boîtes de Pétri qui sont inoculées avec des souches d'inocula de 10^6 CFU.mL⁻¹ et incubé immédiatement à 37°C pendant 24 heures pour les souches de bactéries et 48 heures pour les souches de champignons. Le DMSO a servi de contrôle négatif. Les tests sont effectués en triplicata.

La concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne est la concentration la plus faible d'un produit inhibant totalement la croissance bactérienne. Elle est déterminée à l'aide d'un antibiogramme.

2. Activités pharmacologiques

A. Animaux

Des souches de souris albinos des deux sexes, pesant (20-25 g) sont utilisées pour les études pharmacologiques. Les animaux ont été obtenus auprès du Service de Pharmacotoxicologie du laboratoire SAIDAL Antibiotique-Médéa, Algérie. Les animaux sont logés dans des cages dans des conditions de laboratoire standard (cycle lumière/obscurité de 12 heures à 25°C). Les animaux sont divisés en groupes de cinq et ont jeûné pendant 12 heures avant l'expérience.

B. Toxicité aiguë

Le test de toxicité aiguë est réalisé selon la méthode décrite par la littérature¹³³. Les souris sont divisées en plusieurs groupes de cinq. 0.5 mL de 2000 mg/kg des huiles essentielles sont administrés par voie orale. Le groupe témoin est traité de la même manière sans administrer d'huile essentielle. Les souris sont observées pendant 14 jours. Les souris décédées dans chaque groupe sont comptées pour la détermination de la dose provoquant 50% de mortalité dans la population (DL50).

C. Activité anti-inflammatoire

Le principe consiste à évaluer l'effet inhibiteur des extraits et de l'huile essentielle sur un œdème provoqué par l'injection de carragénine sur l'aponévrose plantaire de la patte d'une souris. Les étapes de cette activité sont mentionnées sur la figure 16.

Afin de contrôler l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle extraite par différentes méthodes, et la comparer avec celle du Clofenac nous nous sommes référés à la méthode rapportée par les auteurs⁷⁷. Cette méthode est adoptée par le laboratoire de pharmacotoxicologie du centre de développement et de recherche SAIDAL.

Après avoir constitué 14 lots de 5 souris chacun :

- Un lot témoin T1.
- Un lot témoin T2.
- Trois lots essais HD (huile essentielle extraite par hydrodistillation) : HD1, HD2, HD3.
- Trois lots essais MAE (huile essentielle extraite par micro-onde) : MAE1, MAE2, MAE3.
- Trois lots essais SD (huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur) : SD1, SD2, SD3.
- Trois lots essais (Clofenac) : C1, C2, C3.

Au temps T0 :

Nous avons administré aux souris des 14 lots les suspensions suivantes :

- Lot témoin T1 : chaque souris a reçu 0.5 ml d'eau distillée.
- Lot témoin T2 : chaque souris a reçu 0.5 ml de solution tween 80 à 1%.
- les lots essais des huiles essentielles : les souris des lots ont reçu respectivement 0.5 ml de l'huile essentielle diluée dans des solutions de tween 80 (1%) aux concentrations suivantes : 50, 100, 150 mg/kg.
- Lot essais C : les souris des lots C1, C2, C3 ont reçu respectivement 0.5 ml de Clofenac diluée dans de l'eau distillée aux concentrations suivantes : 50, 100, 150 mg/kg.

Au temps T0 + 30min :

Nous avons injecté 0.025 mL de la solution carragénine à 1% (diluée dans de l'eau physiologique à 0.9%) sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de toutes les souris mises en expérimentation.

Au temps T0 + 4h :

Après avoir sacrifié les souris, les pattes postérieures ont été coupées à hauteur de l'articulation puis pesées sur une balance analytique.

Expression des résultats :

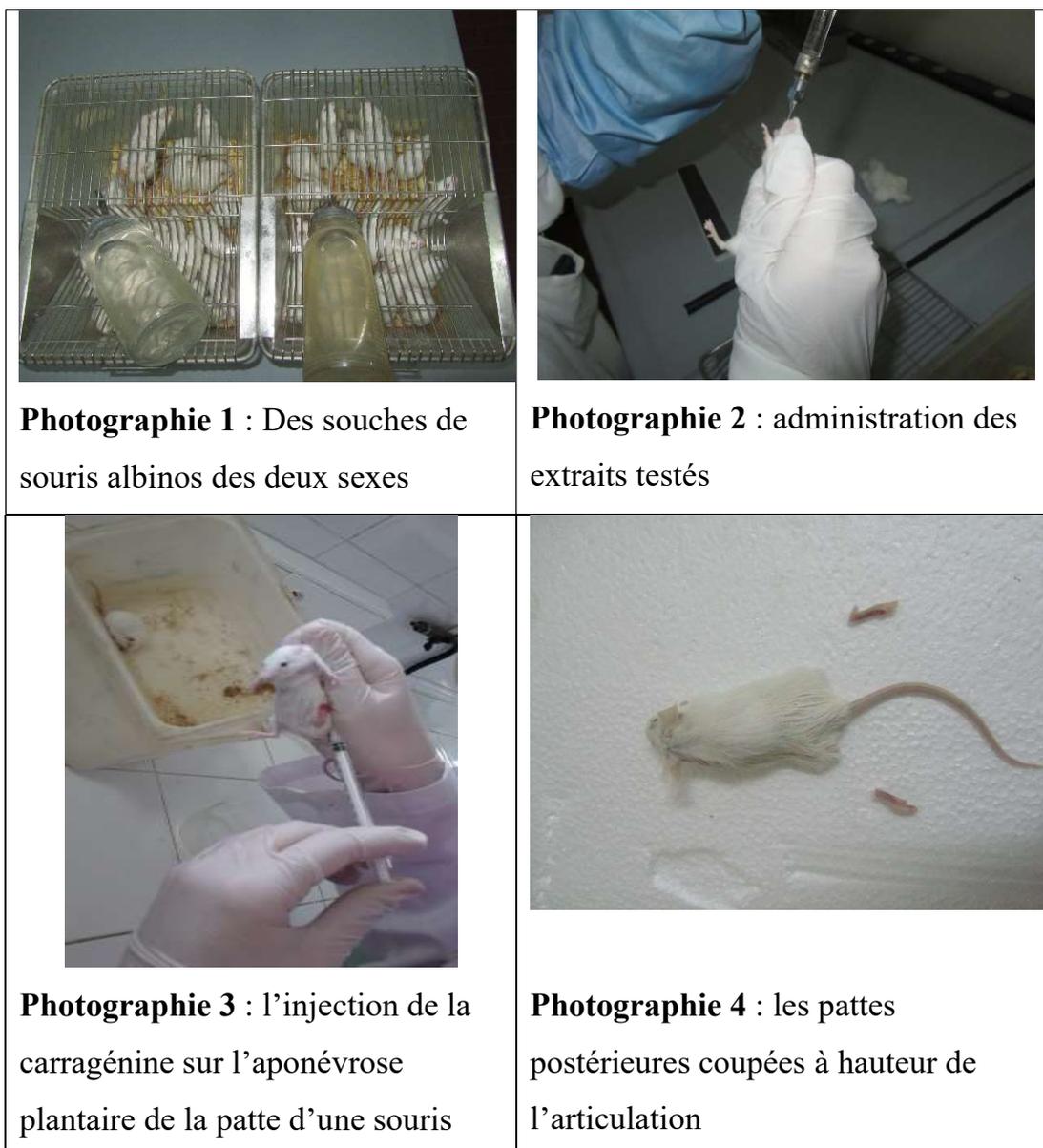


Figure 16 : Photographies montrant les étapes expérimentales de l'activité anti inflammatoire.

Nous avons calculé la moyenne des poids de pattes gauches et celle des pattes droites de chaque lot. Ensuite, nous avons calculé le pourcentage d'augmentation du poids de la patte gauche (% œdème) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = [(moyenne \text{ des poids des pattes gauches} - moyenne \text{ des poids des pattes droites}) / moyenne \text{ des poids des pattes droites}] * 100.$$

Après cela, le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Réduction de l'œdème (\%)} = [(\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}) / \% \text{ de l'œdème témoin}] * 100.$$

D. Activité analgésique

Dans cette partie la comparaison de l'activité antalgique est réalisée sur l'huile essentielle extraite par hydrodistillation, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux obtenu par décoction. La méthode de Vogel est utilisée pour évaluer l'activité antalgique¹³⁴. L'injection d'acide acétique dans la cavité abdominale (voie intra péritonéale) de souris provoque une douleur qui se manifeste par des mouvements de torsion abdominale et d'étirement des pattes postérieures (crampes). Ces réactions douloureuses peuvent être réduites par l'administration d'un produit antalgique.

Dans cette étude, nous avons comparé la capacité de réduction du nombre de crampes induites par l'injection de l'acide acétique chez la souris, après administration de doses équivalentes du produit antalgique testé et du produit de référence. La méthode utilisée consiste à observer et mesurer les mouvements de torsion de l'abdomen et l'étirement des pattes postérieures, qui sont des indicateurs de la douleur

Constituer 3 lots de 5 souris chacun

- Lot témoin T1.
- Lot essai 1 : HD (huile essentielle extraite par hydrodistillation).
- Lot essai 2 : EA (extrait aqueux préparé par décoction).
- Lot essai 3 : EM (extrait méthanolique).
- Lot essai 4 : l'acétylsalicylique.

Les souris sont mises à jeun de nourriture la veille du test.

Au temps T0 :

Administrer par voie orale aux quatre lots les suspensions suivantes :

Lot témoin T1 : chaque souris reçoit 0.5 ml d'eau physiologique mélangé avec la solution tween 80 (1%).

Lot essai 1 : chaque souris reçoit 0.5 ml d'huile essentielle dilué dans des solutions de tween 80 (1%) aux concentrations suivantes : 50, 150 mg/kg.

Lot essai 2 : chaque souris reçoit 0.5 ml de l'extrait méthanolique dilué dans de l'eau distillée aux concentrations suivantes : 50, 150 mg/kg.

Lot essai 3 : chaque souris reçoit 0.5 ml de l'extrait aqueux sous forme de décoction à 50, 150 mg/kg.

Lot essai 4 : chaque souris reçoit 0.5 ml de l'acétylsalicylique à 50 mg/kg.

Au temps T0 + 30 min :

Administrer une injection intra-péritonéale d'une solution d'acide acétique à une concentration de 1% à toutes les souris avec un volume de 0,2 ml par souris.

Au temps T0 + 35 min :

Le dénombrement des crampes est effectué en observant directement chaque souris individuellement dans sa propre cage pendant une période de 10 minutes.

Le syndrome douloureux est caractérisé par un étirement des pattes postérieures et torsion de la musculature dorso-abdominale.

L'effet des extraits, de l'huile essentielle et de l'acétylsalicylique sur les contorsions induites par l'acide acétique est observé par rapport au témoin. La torsion chez les animaux est produite par l'administration solution d'acide acétique à 1%.

Le pourcentage d'inhibition de la torsion (pourcentage de protection) est calculé selon la formule suivante :

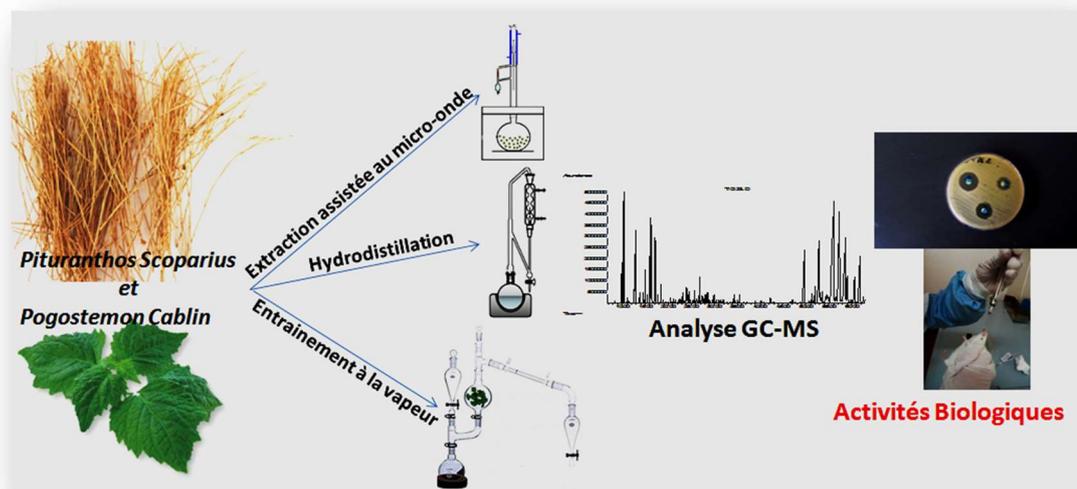
$$\% \text{ de protection} = [(\% \text{ contrôle moyen} - \% \text{ test moyen}) / \% \text{ contrôle moyen}] \times 100$$

VII. Analyses statistiques

Les données collectées sont exprimées en moyenne \pm écart type. Tous les tests sont effectués à l'aide d'IBM SPSS v 23. La comparaison entre les compositions chimiques est effectuée à l'aide d'une analyse de variance multivariée, soutenue par un test post hoc de Tukey, si elle est significative. L'étude de l'activité biologique est établie par les tests ANOVA ou Kruskal Wallis, soutenus par les tests de Tukey ou de Mann Whitney U, si elle est significative. Les différences sont considérées comme significatives lorsque ($p < 0.05$), hautement significatives lorsque ($p < 0.01$) et fortement significatives lorsque ($p < 0.001$).

CHAPITRE 4 :
RÉSULTATS & DISCUSSIONS

PARTIE 1 : COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES D'EXTRACTIONS DES HUILES ESSENTIELLES DE *PITURANTHOS SCOPARIUS* ET *POGOSTEMON CABLIN* : COMPOSITIONS CHIMIQUES ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES.



I. *Pituranthos Scoparius*

1. Influence de la méthode d'extraction sur le rendement des huiles essentielles de *P. Scoparius*

L'extraction des parties aériennes de *P. Scoparius* a produit des huiles essentielles de couleur jaune dont le rendement varie de 0.20 % à 0.53 % en fonction de la méthode d'extraction. Les résultats ont montré que la méthode d'extraction a une influence significative sur les rendements en huile essentielle de *P. Scoparius* ($p < 0.05$) (figure 17).

L'extraction par HD a fourni le rendement le plus élevé (0.53 %, 4h) par rapport à celui obtenu par SD (0.33 %, 4h), cependant le rendement le plus faible EST obtenu en utilisant MAE (0.20 %, 0.5h). Les résultats obtenus concordent avec ceux rapportés par plusieurs auteurs, les rendements de l'huile essentielle de *P. Scoparius* varient de 0.25 à 0.99 %^{87, 88, 91, 93-95}. Par ailleurs, les rendements en huile les plus élevés ont été obtenus dans différentes régions du Sahara algérien et qui sont rapportées par d'autres auteurs (1.0 à 2.8 %)^{88, 90}.

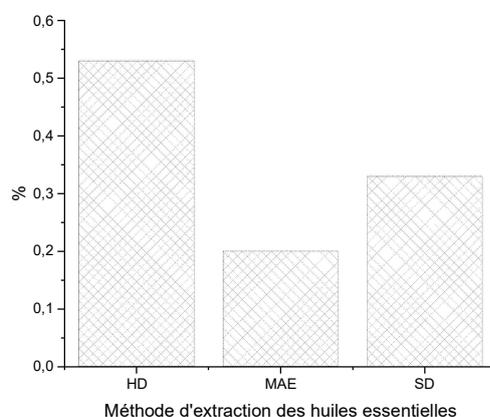


Figure 17 : Influence de la méthode d'extraction sur le rendement de l'huile essentielle de *P. Scoparius*.

2. Influence de la méthode d'extraction sur la composition chimique des huiles essentielles de *P. Scoparius*

Les analyses GC et GC-MS ont permis d'identifier soixante-trois composés représentant 82.45 %, 87.69 % et 88.94 % de la composition totale des huiles

essentielles de MAE, HD et SD respectivement. Comme le montre le tableau 6, une similitude qualitative notable est observée, mais avec des différences dans l'abondance des principaux composés. Les sesquiterpènes oxygénés sont avérés être le principal groupe chimique dans tous les échantillons 32.13 % pour HD, 45.99 % pour SD et 51.41 % pour MAE. La deuxième classe chimique la plus fréquemment identifiée dans l'échantillon de HE obtenue par HD est les monoterpènes hydrocarburés (30.16 %). Cette fraction est présente en quantités beaucoup plus faibles dans les échantillons obtenus par SD et MAE (13.94 et 3.59 %, respectivement). Les composés monoterpènes oxygénés sont présents en plus faibles quantités dans tous les échantillons (<10 %). Parmi les trois processus d'extraction, une observation importante a révélé que la MAE isole la quantité relative la plus élevée de sesquiterpènes oxygénés (51.41 %), par rapport à SD avec 45.99 % et HD avec 32.13 % (figure 18).

Ce résultat, qui indique que les huiles isolées par hydrodistillation assistée par micro-ondes sont caractérisées par une teneur plus élevée en composés oxygénés, a déjà été rapporté sur des huiles essentielles de trois espèces différentes (*Ocimum basilicum L.*, *Thymus vulgaris L.* et *Mentha crispa L.*)¹³⁵. Le même résultat est obtenu sur les huiles essentielles rapporté sur *Rosmarinus officinalis L.*^{26, 136-138}. Cela peut être dû à une augmentation de la température dans les effets hydrothermaux en HD, par rapport au MAE qui utilise une quantité d'eau plus faible et qui est rapidement chauffée^{135, 137}. A l'inverse, Lo Presti, M. et al. ont rapporté dans leur étude sur la même espèce (*Rosmarinus officinalis L.*) que les huiles essentielles produites par MAE et HD étaient caractérisées par des profils chimiques très similaires¹³⁹.

Alternativement, un résultat différent est précédemment publié, où la quantité de composés oxygénés était plus élevée dans l'huile essentielle hydrodistillée par rapport à l'huile isolée par hydrodistillation assistée par micro-onde à partir de *Cuminum cyminum L.* séché et de *Zanthoxylum bungeanum Maxim*¹⁴⁰. Cette contradiction dans les résultats est probablement due au fait que la quantité de composés oxygénés dans l'huile essentielle ne dépend pas seulement des

méthodes d'extraction, mais aussi de nombreux autres facteurs dont : les espèces utilisées, la maturité de la plante, la partie de la plante utilisée et le site de récolte^{141, 142}.

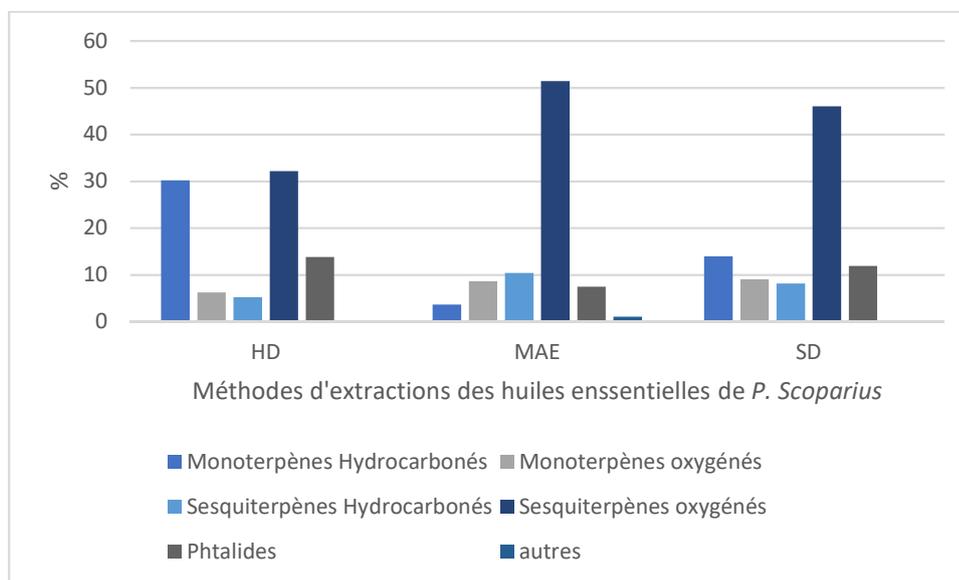


Figure 18 : Influence des méthodes d'extraction sur les classes chimiques des huiles essentielles de *P. Scoparius*.

Les principaux composés identifiés dans les trois huiles essentielles sont le Dillapiol, le β -Eudesmol, la Myristicine, le α -Pinène et le Butylidène phtalide Z, mais avec des différences significatives dans leurs proportions selon la méthode d'extraction utilisée (figure 19 et figure 20). Le Dillapiol, le composé principal dans tous les échantillons, est présent à (37.21 %) et (31.95 %), respectivement, pour MAE et SD, mais seulement à (16.38 %) pour HD. De la même manière, la Myristicine, le deuxième composé de l'huile obtenue par MAE (9.35 %), s'élève à (7.15 %) et (4.21 %) dans les échantillons SD et HD, respectivement. L'huile hydrodistillée contient la plus grande quantité d' α -Pinène (10.84 %), qui est présent en quantité beaucoup plus faible dans les autres huiles obtenues par SD et MAE (3.28 % et 0.48 %), respectivement. Les deux échantillons extraits par HD et SD contenaient des quantités importantes de Butylidène phtalide Z (7.15 % et 6.65 %, respectivement) et de *p*-Cymène (4.89 % et 4.02 %), respectivement. Ces composés ne représentent que (1.23-1.57 %) dans l'huile obtenue par MAE.

D'autres composés majeurs sont déterminés avec des quantités équivalentes dans les huiles extraites par HD, SD et MAE tels que le β -Eudesmol (9.19 %, 7.70 % et 7.10 %), respectivement, le Spathuléol (4.27, 4.23 et 5.23 %), respectivement et 3-n-Butyl phtalide (4.46 %, 2.86 % et 3.50 %), respectivement. A notre connaissance, le 3-n-Butyl phtalide n'a jamais été identifié dans les huiles essentielles de *P. Scoparius*.

Tableau 6 : Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *P. Scoparius* obtenue par différentes méthodes.

| No. | Composés ^a | RI ^b | RI ^c | HD | MAE | SD |
|-----|-------------------------------|-----------------|-----------------|-------|------|------|
| 1 | α -Thujène | 914 | 930 | 1.94 | - | 0.49 |
| 2 | α -Pinène | 925 | 939 | 10.84 | 0.48 | 3.28 |
| 3 | Camphène | 937 | 953 | 0.16 | - | tr |
| 4 | Sabinène | 967 | 976 | 0,88 | tr | 0.26 |
| 5 | β -Pinène | 971 | 979 | 2.63 | 0.27 | 1.19 |
| 6 | β -Myrcène | 989 | 990 | 0.38 | - | 0.14 |
| 7 | <i>l</i> -Phellandrène | 1003 | 1005 | 0.39 | tr | 0.18 |
| 8 | Δ -3-Carène | 1009 | 1011 | 1.08 | tr | 0.80 |
| 9 | α -Terpinène | 1015 | 1017 | 0.28 | tr | 0.25 |
| 10 | <i>p</i> -Cymène | 1025 | 1024 | 4.89 | 1.57 | 4.02 |
| 11 | Limonène | 1028 | 1029 | 3.16 | 0.77 | 1.73 |
| 12 | β -Ocimène Z | 1039 | 1040 | 2.70 | 0.32 | 1.00 |
| 13 | β -Ocimène E | 1047 | 1050 | 0.27 | - | tr |
| 14 | γ - Terpinène | 1057 | 1059 | 0.56 | 0.18 | 0.60 |
| 15 | <i>Cis</i> sabinène hydrate | 1064 | 1068 | 0.11 | tr | tr |
| 16 | α -Terpinolène | 1085 | 1088 | 0.24 | 0.19 | 0.38 |
| 17 | <i>Trans</i> sabinène hydrate | 1095 | 1097 | 0.22 | - | 0.13 |
| 18 | β -Thujone | 1113 | 1114 | 0.16 | - | 0.30 |
| 19 | α -Campholénal | 1117 | 1125 | - | 0.65 | - |
| 20 | Terpinène-1-ol | 1118 | - | 0.15 | - | - |
| 21 | α -Comphoaldehyde | 1123 | - | 0.37 | - | 0.53 |
| 22 | <i>Trans</i> Pinocarvéol | 1135 | 1139 | 0.69 | 0.92 | 0.57 |

| | | | | | | |
|-----------|--------------------------------|------|------|------|------|------|
| 23 | <i>Cis</i> Verbénol | 1138 | 1140 | 0.11 | 0.49 | - |
| 24 | <i>Trans</i> Verbénol | 1142 | 1144 | - | - | 0.27 |
| 25 | Penthyllbenzène | 1154 | 1156 | 0.14 | - | 0.27 |
| 26 | Pinocarvone | 1160 | 1162 | 0.55 | 0.52 | 0.30 |
| 27 | 4-Terpinéol | 1176 | 1177 | 1.04 | 1.10 | 1.36 |
| 28 | Crypton | 1179 | - | - | 0.22 | 0.26 |
| 29 | Cymèn-8-ol-para | 1183 | 1183 | 0.30 | 0.37 | 0.44 |
| 30 | α -Terpinéol | 1189 | 1189 | 0.18 | - | 0.29 |
| 31 | (-) <i>Myrtenal</i> | 1194 | 1193 | 0.44 | 0.37 | 0.24 |
| 32 | <i>Myrténol</i> | 1200 | 1200 | 0.48 | 0.36 | 0.25 |
| 33 | α -Phellandrène epoxide | 1204 | - | - | 0.67 | 0.70 |
| 34 | <i>I</i> -Verbénone | 1206 | 1205 | 0.21 | 0.32 | 0.34 |
| 35 | <i>Trans</i> Carveol | 1218 | 1216 | 0.30 | 0.56 | 0.41 |
| 36 | Propanal,2-méthyle-3-phényle | 1238 | - | - | - | 0.41 |
| 37 | <i>I</i> -Carvone | 1241 | 1242 | 0.13 | 0.24 | 0.15 |
| 38 | Carvotanacétone | 1245 | 1247 | tr | 0.14 | 0.12 |
| 39 | Phéllandral | 1273 | 1271 | 0.10 | - | 0.20 |
| 40 | Safranal | 1280 | - | - | 0.68 | - |
| 41 | <i>p</i> -Cymèn-7-ol | 1287 | 1290 | tr | 0.18 | 0.22 |
| 42 | Thymol | 1289 | 1290 | - | - | 0.15 |
| 43 | Carvacrol | 1300 | 1299 | 0.30 | 0.61 | 0.73 |
| 44 | α -Copaène | 1370 | 1376 | 0.11 | 0.18 | 0.22 |
| 45 | Methyleugénol | 1400 | 1401 | 0.25 | 0.61 | 0.37 |
| 46 | β -Selinène | 1481 | 1485 | 0.21 | 0.11 | 0.22 |
| 47 | Myristicine | 1523 | 1520 | 4.21 | 9.35 | 7.15 |
| 48 | α -Calacorène | 1533 | 1545 | tr | 0.11 | 0.18 |
| 49 | β -Calacorène | 1549 | - | 0.39 | - | - |
| 50 | Élémicine | 1556 | 1554 | 0.14 | 0.33 | 0.28 |
| 51 | 1,5-epoxysalvial-4(14)ène | 1560 | - | 0.62 | 0.60 | 0.66 |
| 52 | Spathuléol | 1575 | 1576 | 4.27 | 5.23 | 4.23 |
| 53 | Salvia-4 (14)-en-1-one | 1586 | - | 0.44 | 0.76 | 0.71 |

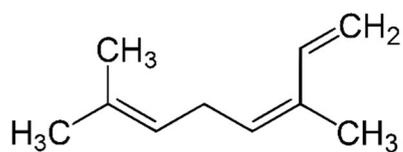
| | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|------|------|--------------|--------------|--------------|
| 54 | Caryophyllene oxide | 1600 | 1581 | 0.57 | - | 0.24 |
| 55 | Dillapiol | 1612 | 1622 | 16.38 | 37.21 | 31.95 |
| 56 | Isospathuléol | 1634 | - | 0.52 | 0.18 | 0.22 |
| 57 | β -eudesmol | 1645 | 1649 | 9.19 | 7.10 | 7.70 |
| 58 | Butylidène phtalide <i>Z</i> | 1668 | 1672 | 7.15 | 1.23 | 6.65 |
| 59 | Butylidène phtalide <i>E</i> | 1700 | 1718 | 1.86 | 2.72 | 2.20 |
| 60 | 3-n-Butyl phtalide | 1724 | 1739 | 4.46 | 3.50 | 2.86 |
| 61 | Butylidène dihydro- phtalide | 1777 | - | 0.33 | - | 0.14 |
| 62 | Hexahydrofarnesyl acétone | 1848 | - | - | 0.32 | - |
| 63 | Acide palmitique | 1947 | - | 0.21 | 0.73 | tr |
| Rendements | | | | 0.53 | 0.20 | 0.33 |
| Monoterpènes Hydrocarbonés | | | | 30.16 | 3.59 | 13.94 |
| Monoterpènes oxygénés | | | | 6.22 | 8.59 | 9.02 |
| Sesquiterpènes Hydrocarbonés | | | | 5.17 | 10.36 | 8.14 |
| Sesquiterpènes oxygénés | | | | 32.13 | 51.41 | 45.99 |
| Phtalides | | | | 13.8 | 7.45 | 11.85 |
| Autres | | | | 0.21 | 1.05 | tr |
| Total | | | | 87.69 | 82.45 | 88.94 |

^a Composés répertoriés selon leurs ordre d'élution sur colonne capillaire apolaire (HP5MSTM). ^b Indices de rétention sur colonne apolaire (HP5MS). ^c Indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire rapportés par Adams (2007)²⁹

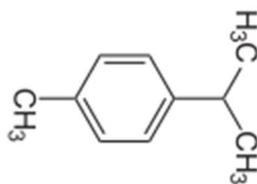
– : non détectés, tous les composants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des données publiées (Adams, 2007) et des spectres de masse avec les données de la littérature, la bibliothèque de MS (bibliothèque NIST et Wiley 7N)

L'analyse multivariée de la variance a montré un fort effet significatif des méthodes d'extractions sur les principaux composés des huiles essentielles ($p < 0.001$). La variation de la méthode d'extraction indique un effet significatif sur : Dillapiol, α -Pinène, Butylidène phtalide *Z*, β -Ocimène *Z*, β -pinène, α -Thujène, Myristicine, Limonène, *p*-Cymène, 3-n-Butyl phtalide, β -Eudesmol,

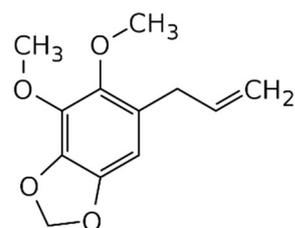
Spathuléol, Δ -3-Carène et Butylidène phtalide E ($p < 0.001$). Le 4-Terpinéol ($p = 0.002$). La comparaison moyenne entre les principaux composés est évaluée afin de choisir la meilleure méthode d'extraction pour chaque substance. Les résultats illustrés sur la figure 20 montrent une différence considérable entre les méthodes pour la plupart des composés, à l'exception du 4-Terpinéol, pour lequel les résultats n'indiquent aucune différence dans SD vs MAE ($p = 0.074$), ainsi que Spathuléol, pour lequel les résultats n'indiquent aucune différence dans SD vs HD ($p = 0.887$).



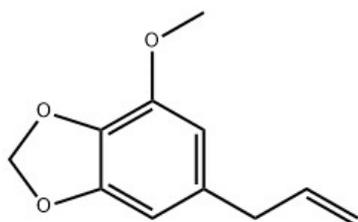
(z)-β-Ocimène



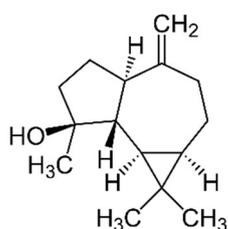
p-Cymène



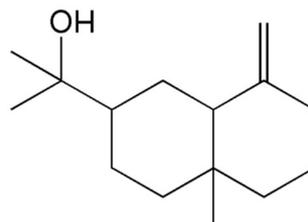
Dillapiol



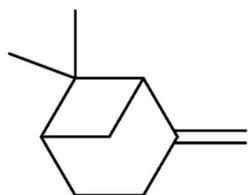
Myristicine



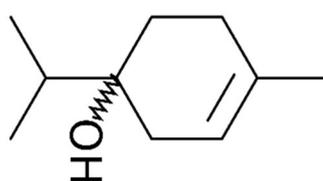
Spathuléol



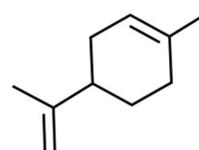
β-Eudésmol



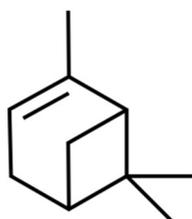
β-Pinène



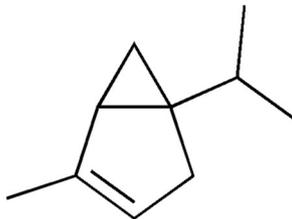
4-Terpinéol



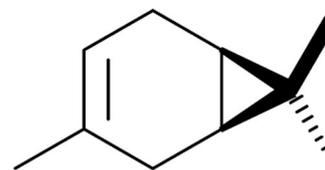
α-Limonène



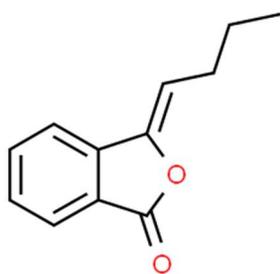
α-Pinène



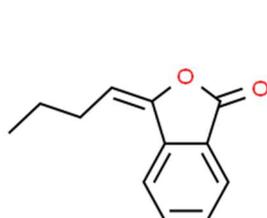
α-Thujène



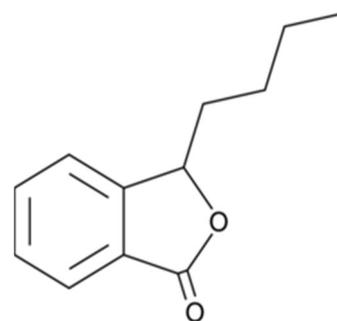
Δ-3-Carène



Butylidène phtalide Z



Butylidène phtalide E



3-n-Butyl phtalide

Figure 19 : Composés majoritaires de *P. Scoparius*.

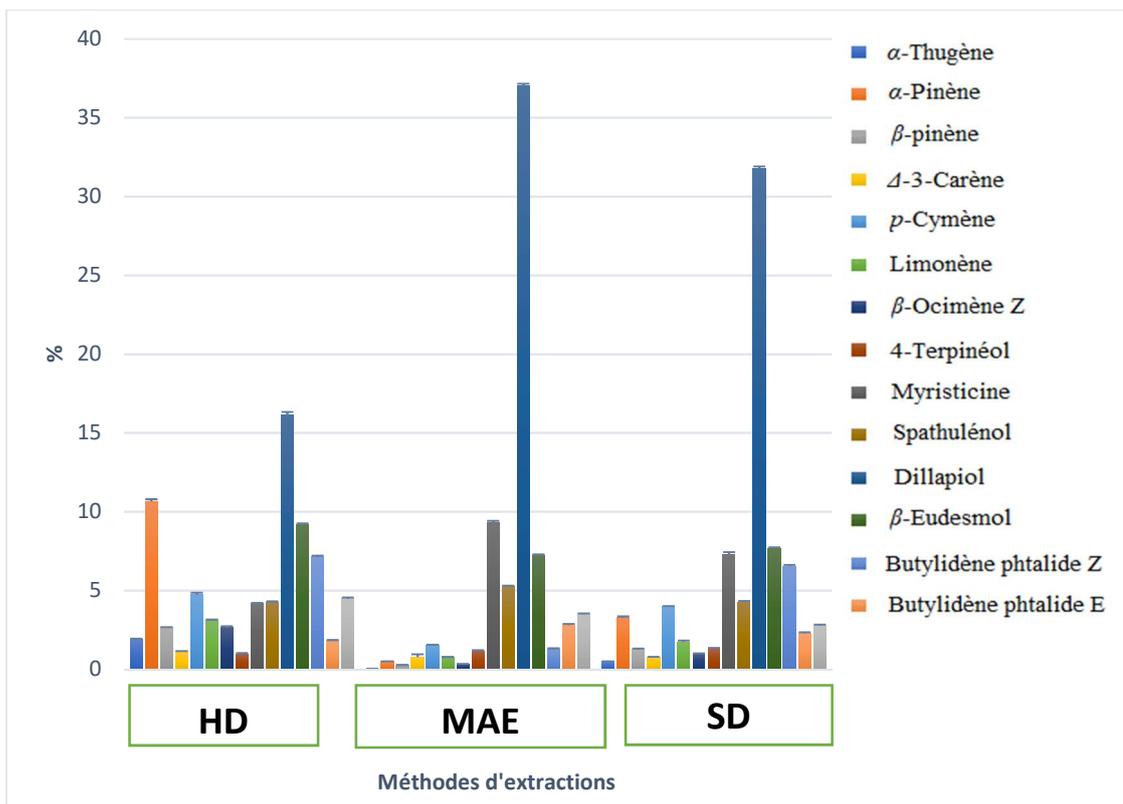


Figure 20 : Comparaison entre les principaux composants des huiles essentielles de *P. Scoparius* extraites par hydrodistillation, hydrodistillation assistée par micro-ondes et entrainement à la vapeur.

3. Influence de la méthode d'extraction sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P. Scoparius*

En réponse à la résistance croissante aux antibiotiques de synthèse, de nombreux travaux sont menés pour explorer les propriétés antimicrobiennes des produits naturels, tels que les huiles essentielles de plantes. Dans cette étude, l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P. Scoparius* est évaluée.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est déterminée contre sept souches bactériennes et deux levures en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Cette activité est estimée à partir du diamètre des zones d'inhibition.

Les résultats sont présentés dans tableau 7 pour différentes méthodes d'extraction. Nos données ont montré que les huiles essentielles de *P. Scoparius* possédaient généralement une activité faible à modérée contre les levures (zone d'inhibition

de $7.1 \pm 0,1$ à 13.6 ± 0.4 mm) ainsi que les bactéries à Gram positif (zone d'inhibition de $8.2 \pm 0,1$ à 21.8 ± 0.3 mm).

Tableau 7 : Activité antimicrobienne de *P. Scoparius* des huiles essentielles extraites par trois méthodes différentes.

| Microorganismes | Zone d'inhibition (mm) | | | | | |
|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|------|------|
| | Huiles essentielles | | | Antibiotiques standards | | |
| | HD | MAE | SD | Pen | Oxa | Am |
| Bactérie Gram | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | $8.2 \pm 0.1^{b,F}$ | $8.2 \pm 0.1^{b,D}$ | $11.1 \pm 0.1^{a,B}$ | 40 | 40.6 | 38 |
| <i>S. lutea</i> | $21.8 \pm 0.3^{a,A}$ | $19.8 \pm 0.7^{a,A}$ | $14.7 \pm 0.6^{b,A}$ | >45 | >45 | >45 |
| <i>B. subtilus</i> | $11.2 \pm 0.2^{a,D}$ | $9.1 \pm 0.6^{b,D}$ | $9.5 \pm 0.1^{b,C}$ | 35 | 40 | 34 |
| <i>S. epidermidis</i> | $12.4 \pm 0.3^{a,C}$ | $10.4 \pm 0.2^{a,C}$ | $12.1 \pm 0.6^{a,AB}$ | 14.6 | 21.8 | 17.6 |
| Bactérie Gram - | | | | | | |
| <i>Enterobacter</i> | - | - | - | 12 | 25 | 26 |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - | - | - | 17 | 19 |
| <i>E. coli</i> | - | - | - | 31 | 16.9 | 40 |
| Levures | | | | | | |
| <i>S. cerevisiae</i> | $13.6 \pm 0.4^{a,C}$ | $7.1 \pm 0.1^{b,E}$ | $12.0 \pm 0.1^{a,A}$ | - | - | - |
| <i>C. albicans</i> | $11.5 \pm 0.3^{b,D}$ | $11.3 \pm 0.2^{b,B}$ | $13.4 \pm 0.2^{a,A}$ | - | - | - |

Pen: Pénicilline G, Oxa : Oxaline, Am : Amoxypène.

Les valeurs sont des moyennes \pm écart type, zone d'inhibition en mm \pm écart type, le diamètre du disk est compris (6 mm), les données dans la même colonne ayant des lettres majuscules différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$) parmi les différents micro-organismes, les données dans la même rangée ayant des lettres minuscules différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$) parmi les différentes méthodes d'extraction d'huiles essentielles, les résultats sont classés par ordre croissant ; $a > b$; $A > B > C > D > E > F$, - : pas d'action.

S. lutea est la plus touchée par les huiles essentielles de *P. Scoparius* ; l'huile essentielle extraite par HD a montré la plus grande zone d'inhibition (zone d'inhibition = 21.8 ± 0.3 mm) par rapport à celles obtenues par MAE (zone

d'inhibition = 19.8 ± 0.7 mm) et par SD (zone d'inhibition = 14.7 ± 0.6 mm). De même, les huiles essentielles testées présentent une faible activité contre *S. aureus* (zone d'inhibition : 8.2 ± 0.1 - 11.0 ± 0.1 mm) et *B. subtilis* (zone d'inhibition : 9.1 ± 0.6 - 11.2 ± 0.2 mm), tandis que *S. epidermidis* est plus affectée par les huiles obtenues par HD et SD (zone d'inhibition ≈ 12.7 mm).

Le Dillapiol n'a eu aucun effet contre *S. aureus*¹⁴³. Dans une autre étude le Dillapiol n'a eu aucun effet contre les bactéries de gram-négatives et un faible effet contre les bactéries de gram-positives¹⁴⁴. Cet effet limité des huiles essentielles de *P. Scoparius* contre *S. aureus* pourrait être dû alors à leur teneur élevée en Dillapiol. Ces résultats sont précédemment rapportés par Ksouri, A. et al. sur *B. bastilus* qui était très résistante à l'huile essentielle de *P. Scoparius* (zone d'inhibition = 8.3 ± 1.1 mm) tandis que *S. aureus* était moins résistante à cette huile (zone d'inhibition = 20.0 ± 3.0 mm)⁹⁴. Kiram, A. et al. *P. Scoparius* de Biskra (Sud-Est d'Algérie) a aussi rapporté une forte activité de l'huile essentielle de *P. Scoparius* contre *S. aureus*¹⁴⁵.

Alternativement, les huiles essentielles de *P. scoparius* n'ont montré aucune activité (zone d'inhibition = 0 mm) contre les bactéries de gram-négatives : *Enterobacter*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Contrairement aux bactéries de gram-positives, il est connu que les bactéries de gram-négatives ont une très haute résistance aux huiles essentielles du fait que leurs paroi soit constituée d'une seconde barrière externe^{26, 146}. Les mêmes résultats sont obtenus par d'autres auteurs qui ont rapporté que les huiles essentielles de *P. Scoparius* présentaient généralement une activité limitée contre *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Enterobacter*^{94, 143}.

Nos résultats ont montré une différence fortement significative contre *S. aureus* et *S. cerevisiae* pour les huiles essentielles obtenues par MEA et SD ($p < 0.001$), et aucune différence significative entre HD et MEA contre toutes les souches ($p > 0.05$), à l'exception de *B. subtilis* et *S. cerevisiae*. La comparaison de HD vs SD a montré que la méthode d'extraction influence l'activité antimicrobienne sauf

pour *S. epidermidis* et *S. cerevisiae* ($p < 0.05$). Cela pourrait être dû à la teneur élevée en monoterpène hydrocarboné puisque l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle pourrait être liée à la présence de α -pinène¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, bien que des composés minoritaires puissent également produire une activité antibactérienne, contribuant à l'activité des huiles essentielles²⁶.

4. Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *P. Scoparius* extraite par HD

Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *P. Scoparius* extraite par hydrodistillation (CMI) pour les bactéries et champignons varient de 100 à 900 uL/mL (tableau 8). *S. lutea* est l'espèce la plus sensible à l'huile essentielle de *P. Scoparius* avec une CMI de 200 uL/mL. De même pour *S. cerevisiae* avec une CMI de 200 uL/mL. Suivi par *S. aureus* avec une CMI moyenne de 900 uL/mL, par ailleurs les espèces les plus résistantes à l'huile essentielle de *P. Scoparius* sont *P. aeruginosa*, *Enterobacter* et *E. coli* dont l'huile n'a montré aucune activité contre elles. Une faible valeur de la CMI correspond à une forte activité antimicrobienne¹⁵⁰.

Tableau 8 : Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *P. Scoparius* extraite par hydrodistillation (CMI).

| Microorganismes | Huile essentielle (HD) | |
|-----------------------|---------------------------|--------------|
| | Zone d'inhibition (mm) | CMI uL/mL |
| <i>S. aureus</i> | 8.2±0.1 | 900 |
| <i>S. épidermidis</i> | 12.4±0.3 | 100 |
| <i>S. lutea</i> | 21.8±0.3 | 200 |
| <i>B. subtilus</i> | 11.2±0.2 | 300 |
| <i>Enterobacter</i> | - | - |
| <i>E. coli</i> | - | - |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - |
| <i>C. albicans</i> | 11.5±0.3 | 600 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 13.6±0.4 | 200 |

5. Activité antimicrobienne des extraits de *P. Scoparius*

L'extrait méthanolique et l'extrait aqueux obtenu par décoction sont étudiés pour évaluer leur activité antibactérienne contre les bactéries, quatre souches de bactéries de gram positives (*S. aureus*, *S. épidermidis*, *S. lutea*, *B. subtilus*), trois souches de bactéries de gram négatives (*Enterobacter*, *E.coli*, *P. aeruginosa*) et deux levures (*C. albicans*, *S. cerevisiae*) sont utilisés. L'activité antibactérienne est estimée à partir du diamètre des zones d'inhibitions à l'aide de méthode de diffusion sur disque. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de cette plante est enregistrée dans le tableau 9. Les résultats ont révélé que tous les extraits n'étaient pas efficaces contre les souches utilisées à l'exception de l'extrait obtenu par décoction qui était potentiellement efficace contre *S. lutea* avec une zone d'inhibition de 41 ± 0.00 mm et une CMI de 4 ug/ml.

Tableau 9 : Activité antimicrobienne de *P. Scoparius* de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux obtenu par décoction.

| Microorganismes | ^d Décoction 10mg/ml | | ^b Extrait méthanolique 200mg/ml | Méthanol |
|-----------------------|-----------------------------------|--------------|--|------------------------------|
| | Zone d'inhibition (mm) | CMI ug/ml | Zone d'inhibition (mm) | Zone d'inhibition (mm) |
| <i>S. aureus</i> | - | - | 6.96 ± 0.07 | 7 |
| <i>S. épidermidis</i> | - | - | 7.1 ± 0.14 | - |
| <i>S. lutea</i> | 41 ± 0.00 | 4 | n.t | n.t |
| <i>B. subtilus</i> | - | - | 7.7 | 8.5 |
| <i>E.coli</i> | - | - | - | 7.3 |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - | - | - |
| <i>Enterobacter</i> | - | - | - | - |
| <i>C. albicans</i> | - | - | - | 7 |
| <i>S. cerevisiae</i> | - | - | - | 7 |

a % (v/v) eau distillée

b (p/v) méthanol

n.t : n'a pas été testé (zone d'inhibition très grande)

Une puissance antibactérienne limitée de certaines plantes suggère qu'il n'y a pas d'accord complet entre les utilisations traditionnelles des plantes médicinales sous forme brute pour le remède des maladies infectieuses. Cependant une étude plus approfondie est toujours justifiée pour explorer leur efficacité à inhiber la croissance des parasites, des virus et/ou des champignons. Une autre possibilité de la puissance antibactérienne limitée de certaines plantes peut être due à la méthode d'extraction par percolation à froid et à l'utilisation d'extraits bruts.

6. Test de toxicité aiguë

L'administration orale des huiles essentielles de *P. Scoparius* à des doses de 2000 mg/kg (dose limitée) n'a entraîné aucune mortalité chez les souris traitées pendant 14 jours. Selon l'échelle de Hodge et Sterner¹³³, l'huile essentielle de *P. Scoparius* peut être classée comme non toxique.

7. Influence de la méthode d'extraction sur l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de *P. Scoparius*

Dans la présente étude, l'activité anti-inflammatoire de Diclofénac et des huiles essentielles de *P. Scoparius* extraites par HD, MAE et SD est déterminée sur la base du test d'œdème induit par la carraghénine. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Effets des huiles essentielles de *P. Scoparius* sur l'œdème induit par la carraghénine.

| Doses (mg/kg) | Inhibition (%) | | | |
|------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | HD | MAE | SD | Diclofenac |
| 150 | 55.68±1.30 ^{b, A} | 48.15±2.82 ^{c, A} | 51.09±3.68 ^{bc, A} | 69.01±1.00 ^{a, A} |
| 100 | 27.75±0.53 ^{b, B} | 44.36±2.30 ^{a, A} | 33.76±4.33 ^{b, B} | 63.32±1.83 ^{a, B} |
| 50 | 25.31±0.85 ^{c, C} | 40.64±2.36 ^{a, A} | 31.37±3.38 ^{b, B} | 42.69±3.04 ^{a, C} |

Les valeurs sont des moyennes ± écart type.

Les données dans la même colonne ayant des lettres majuscules différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$) entre les différentes concentrations.

Les données de la même ligne ayant des lettres minuscules différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$) entre les différentes méthodes d'extraction d'huile essentielle.

Nos résultats ont montré que tous les échantillons étudiés présentent une activité anti-inflammatoire de manière dose-dépendante. En effet, la concentration a eu un effet significatif sur les méthodes d'extractions ($p < 0.05$) à l'exception de l'huile essentielle obtenue MAE ($p = 0.308$). Les groupes traités avec des huiles essentielles à la dose de 50 mg/kg ont montré les plus faibles pourcentages d'inhibition de l'œdème induit par la carraghénine (25.31 ± 0.85 - 40.64 ± 2.36 %) par rapport aux groupes traités avec des doses de 100 mg/kg (27.75 ± 0.53 - 44.36 ± 2.30 %).

L'activité maximale est observée à 150 mg/kg pour tous les échantillons (48.15 ± 2.82 - 55.68 ± 1.30 %). Le pourcentage d'inhibition du Diclofénac (50, 100 et 150 mg/kg) pris comme médicament standard, est également passé de 42.69 ± 3.04 % à 69.01 ± 1.00 %, avec l'augmentation de la dose. A la dose de 50 mg/kg, HD est moins efficace que l'échantillon obtenu par SD (25.31 ± 0.85 vs 31.37 ± 3.38 %). Cependant, en utilisant MAE, l'huile essentielle a montré le pourcentage d'inhibition le plus élevé (40.64 ± 2.36 %). La dernière valeur est comparable à celle obtenue avec le Diclofénac (42.69 ± 3.04 %) et n'a pas de différence significative avec le médicament standard ($p = 0.743$). Le même ordre est observé en utilisant des échantillons à la dose de 100 mg/kg (27.75 ± 0.53 , 33.76 ± 4.33 % et 44.36 ± 2.30 %) pour HD, SD et MAE respectivement (figure 21). Les résultats ont montré que l'activité anti-inflammatoire de HD vs SD à la dose de 100 mg/kg n'a montré aucune différence significative ($p = 0.66$). Il en est de même pour le MEA et le Diclofénac ($p = 0.099$). En revanche, à la dose de 150 mg/kg, l'activité maximale est obtenue avec HD (55.68 ± 1.30 %) et n'a présenté aucune différence significative par rapport à SD ($p = 0.147$).

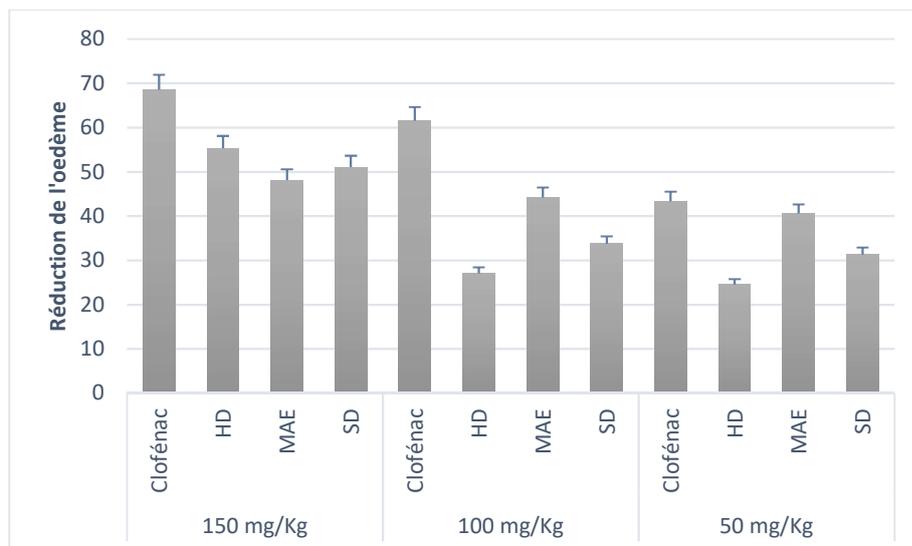


Figure 21 : Activité anti-inflammatoire de Diclofénac et des huiles essentielles et de *P. Scoparius* extraites par HD, MAE et SD

Sur la base de ces résultats, on peut affirmer que les huiles essentielles de *P. Scoparius* ont une activité anti-inflammatoire, avec une différence significative selon la méthode d'extraction utilisée. Cette importante activité anti-inflammatoire des huiles essentielles de *P. Scoparius* peut être attribuée à leur teneur en Dillapiol, β -Eudesmol, Myristicine, Butylidène phthalide Z et α -Pinène. Ces résultats valident l'utilisation de *P. Scoparius* comme anti-inflammatoire en médecine traditionnelle algérienne.

8. Activité analgésique

Le tableau 11 a montré que le pourcentage de protection augmente avec l'augmentation des concentrations pour les tous les échantillons : l'extrait aqueux obtenu par décoction, l'extrait de méthanol, l'huile essentielle et l'acide acétylsalicylique (médicament de référence). A la concentration de 50 mg / kg, nous avons remarqué qu'il y avait une différence significative entre les trois échantillons par rapport à l'acétylsalicylique ($p < 0.05$).

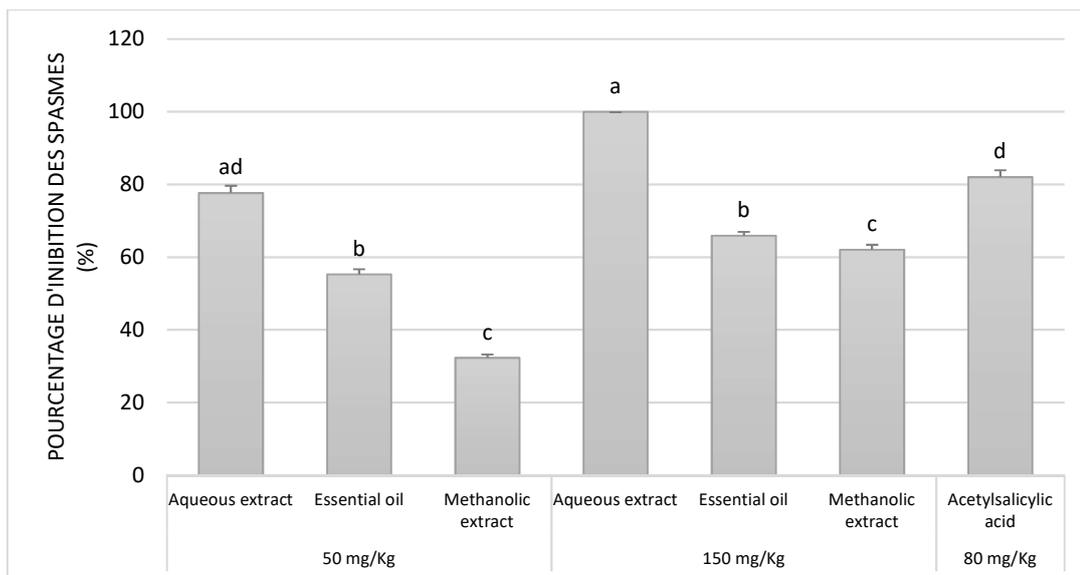
Tableau 11 : Activité analgésique de l'huile essentielle et des extraits de *P. Scoparius*

| Extraits | Concentrations | Activité Analgésique (% de Protection) |
|--------------------------------|----------------|---|
| Extrait méthanolique | 50 mg/Kg | 33.33±0.90 ^c |
| | 150 mg/ Kg | 62..28±2.36 ^c |
| HD | 50 mg/ Kg | 55.26±2.00 ^b |
| | 150 mg/ Kg | 66.66±2.90 ^b |
| Extrait aqueux | 50 mg/ Kg | 78.00±4.05 ^{ad} |
| | 150 mg/ Kg | 100.00±0.00 ^a |
| Acide Acétylsalicylique | 80 mg/ Kg | 82.45±3.25 ^d |

Moyennes ± écart-type (n=5).

Les données dans la même colonne ayant des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0.05$).

De plus, aucune différence significative entre l'extrait aqueux et l'acétylsalicylique n'est indiquée, le pourcentage de protection de l'animal avec l'extrait aqueux à 150 mg / kg était de 100%. Les souris n'ont montré aucune torsion causée par une injection intra-péritonéale de l'acide acétique au cours de cette expérience (figure 22). Cet extrait offre une meilleure protection que le médicament de référence (acétylsalicylique) avec un Pourcentage d'inhibition des spasmes à 82.45 ± 3.25 %, ce qui confirme ce que Hammich V. et al. ont rapporté sur l'infusion et la décoction des parties aériennes de *P. Scoparius* qui sont utilisées dans le traitement contre les difficultés digestives¹⁵¹. Les différentes concentrations de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique ont une activité analgésique minimale car elle est inférieure à 70%¹⁵². La douleur causée par l'acide acétique est due à la libération de médiateurs, ces médiateurs induisent une perméabilité vasculaire. L'activité analgésique peut être liée à la présence de certains composés chimiques tels que les flavonoïdes, les saponines ou les composés phénoliques dans l'extrait¹⁵³.



Les colonnes ayant des lettres différentes sont significativement différentes à ($p < 0.05$)

Figure 22 : Pourcentage d'inhibition des spasmes de l'huile essentielle et des extraits de *P. Scoparius*.

II. *Pogostemon Cablin*

1. Influence de la méthode d'extraction sur le rendement et la composition des huiles essentielles de *P. Cablin*

L'extraction des parties aériennes de *P. Cablin* a produit des huiles essentielles de couleur jaune foncé. Cette huile a une odeur distincte de camphre qui vient principalement du composé majoritaire de cette plante le Patchouli alcool « patchoulol »¹⁵⁴. Le rendement varie en fonction de la technique d'extraction. 0.50 ± 0.12 % pour l'extraction par micro-onde (MAE), 0.77 ± 0.02 % pour l'extraction par entraînement à la vapeur (SD) et 0.70 ± 0.01 % pour l'extraction par hydrodistillation (HD) (figure 23). Nous remarquons que le rendement le plus élevé est celui obtenu par SD. Selon la littérature même s'il y a de nombreuses techniques d'extractions, l'entraînement à la vapeur reste la technique la plus utilisée par les fabricants pour extraire l'huile essentielle de patchouli¹⁵⁵.

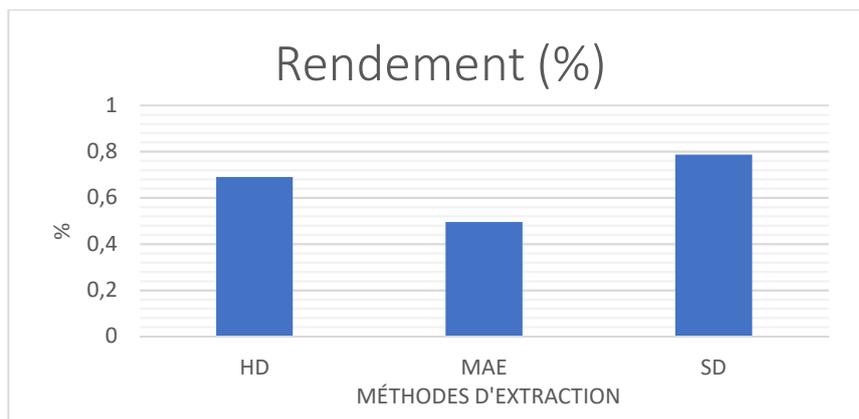


Figure 23 : Influence de la méthode d'extraction sur le rendement de l'huile essentielle de *P. Cablin*

Le pourcentage moyen d'huile dans les feuilles séchées de *P. cablin*, tel que rapporté par plusieurs auteurs varie entre 0,54 – 5,2 %¹⁰⁹. Ce chiffre n'est pas précis car il dépend du matériel végétal exact utilisé (cultivation, âge, sol et conditions de croissance), du pourcentage de tiges ainsi que des matières étrangères (sol, autres espèces végétales comme les mauvaises herbes)¹⁵⁶, du séchage et/ou de la fermentation, le stockage, le pourcentage final d'eau et la technique d'extraction (les conditions et la durée).

2. Influence de la méthode d'extraction sur la composition chimique des huiles essentielles de *P. Cablin*

L'huile essentielle de la partie aérienne de *Pogostemon cablin*, est extraite par trois méthodes : hydrodistillation (HD), hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAE) et entraînement à la vapeur (SD) et analysée par chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Quarante-huit composés sont identifiés représentant environ 87.71 %, 75.53 % et 86.20 % des huiles essentielles obtenues par HD, MAE et SD respectivement (tableau 12). Quel que soit la méthode d'extraction utilisée de l'huile essentielle de patchouli, la répartition des classes terpéniques a montré une forte prédominance de sesquiterpènes oxygénés 66.91 %, 56.95 % et 61.52 % pour HD, MAE et SD respectivement suivis par les sesquiterpènes hydrocarbonés 12.74 %, 15.79 % et 16.57 % pour HD, MAE et

SD respectivement, contrairement aux monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés qui étaient relativement en minorité par rapport aux sesquiterpène oxygénés (figure 24).

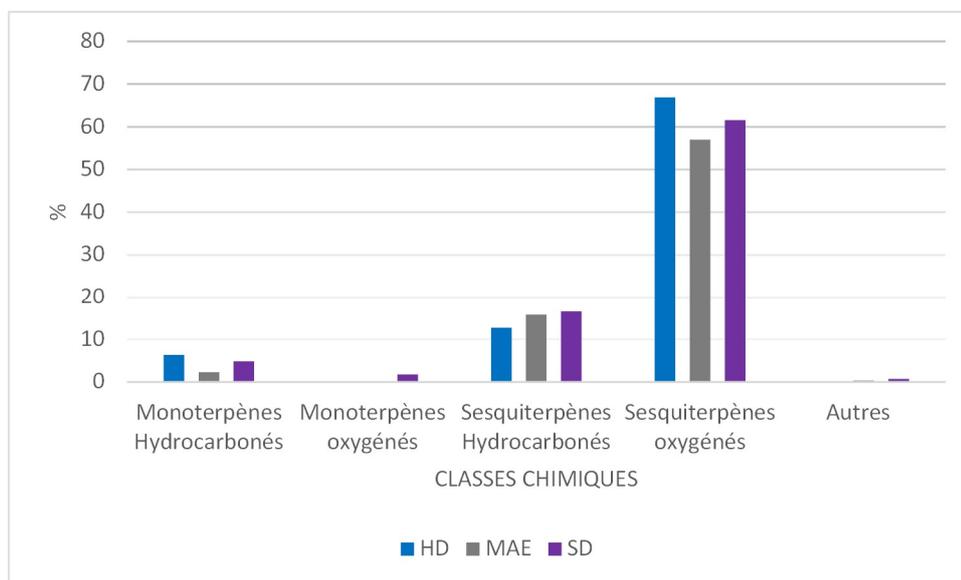


Figure 24 : Influence des méthodes d'extraction sur les classes chimiques des huiles essentielles de *P. Cablin*.

Les substances sesquiterpéniques ont moins de solubilité et un point d'ébullition plus élevé par rapport aux composés monoterpènes, comme c'est le cas des substances présentes dans les huiles de *P. cablin*. Par conséquent, il est possible de favoriser une augmentation de la teneur en matière de substances volatiles (monoterpènes) en début d'extraction et de substances moins volatiles (sesquiterpènes) en fin d'extraction. Un autre facteur pouvant affecter les concentrations des composés volatils est l'hydrodiffusion, c'est-à-dire une plus grande solubilité de certaines molécules dans l'eau, favorisant le plus grand pouvoir d'extraction des composés oxygénés et enrichissement conséquent de ces composés.

Les résultats obtenus ici montrent l'influence des méthodes d'extractions sur la composition chimique. Bien que les huiles essentielles de *P. Cablin* aient l'apparition simultanée des principaux composants : Patchouli alcohol (38.10-52.71) %, Pogostone (1.71-10.64 %), α -Curcumène (5.76-6.62 %), Pogostol (0-

6.45 %), Caryophyllène oxide (3.90-4.14 %), Norpatchoulène (0.58-4.03 %) et α -guaiène (1.02-3.42 %) (figure 25), ces quantités varient selon la technique d'extraction utilisée (dans des proportions raisonnables), selon le tableau. Pour les huiles essentielles obtenues par HD, nous avons trouvé que cette extraction fournit une plus grande quantité de monoterpènes hydrocarbonés 6.33% contre 2.29 % pour MAE. En général, dans l'extraction des huiles essentielles, la technique de l'hydrodistillation privilégie l'enrichissement des composés monoterpéniques, tandis que la méthode de d'entraînement à la vapeur fournit une augmentation dans la teneur en sesquiterpènes. Dans notre cas l'extraction par SD nous a donné 61.52 % de sesquiterpène oxygénés et 16.57 % de sesquiterpènes hydrocarbonés contre 56.95 % et 15.79 % pour MAE respectivement.

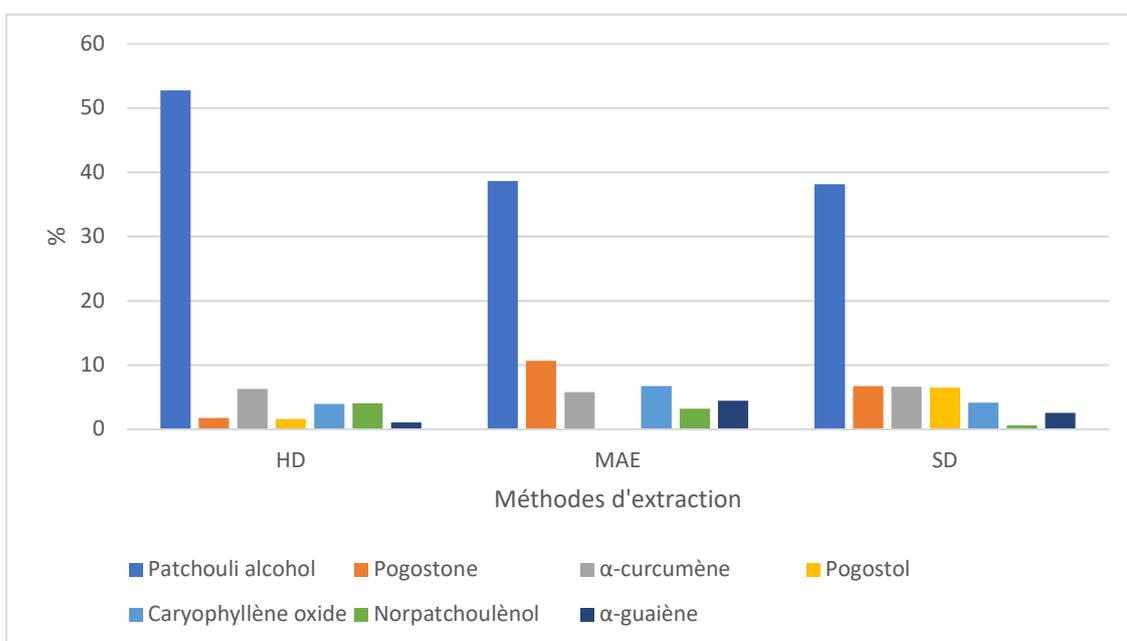


Figure 25 : Comparaison entre les principaux composants des huiles essentielles de *P. Cablin* extraites par hydrodistillation, hydrodistillation assistée par micro-ondes et entraînement à la vapeur.

Dans cette étude nous avons remarqué que la plante étudiée a donné une huile essentielle riche en composés oxygénés 66.91 % pour HD et 57.14 % pour MAE et des composés hydrocarbonés en faible quantité 19.07 % pour HD et 18.24 % pour MAE. Et ce à cause de la forte prédominance du patchouli alcool

(sesquiterpène oxygéné) présent en 66.91 % et 56.95 % des huiles extraites par HD et MAE respectivement. Des résultats similaires sont obtenus dans l'huile essentielle de *P. Cablin* extraite par HD ou le pourcentage des composés oxygénés était plus important que celui des hydrocarbonés¹⁵⁷. D'autres ont trouvé le contraire^{158, 159}. Les auteurs ont rapporté que le pourcentage du Patchouli alcool seul peut varier de 11 % à 72 % en conséquent le rapport entre les composés oxygénés et hydrocarbonés peut dépendre du pourcentage de Patchouli alcool¹⁰⁹.

Une importante variation des composés Pogostol et Pogostone a été mise en évidence dans la comparaison des méthodes, celles-ci étant de 0 %/1.59 % / 6.45 % et 1.71 % / 10.64 % / 6.68 %, par HD/MAE/SD, respectivement. Une variation similaire a été rapporté dans la littérature concernant le Pogostol (0.2-6.2) % et Pogostone (0.1-27.7) %¹⁰⁹.

Tableau 12 : Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *P. Cablin* obtenue par différentes méthodes.

| N° | Noms ^a | RI ^c | RI ^b | HD % | MAE % | SD % |
|----|-----------------------|-----------------|-----------------|------|-------|------|
| 1 | α -Thujène | 930 | 948 | 0.18 | 0.17 | 0.17 |
| 2 | α -Pinène | 939 | 951 | 2.13 | 1.15 | 0.77 |
| 3 | Camphène | 954 | 960 | - | 0.08 | - |
| 4 | Sabinène | 976 | 977 | 0.20 | 0.11 | 0.17 |
| 5 | β -Pinène | 979 | 979 | 0.37 | 0.24 | 0.35 |
| 6 | β -Myrcène | 989 | 992 | 0.13 | | 0.12 |
| 7 | Δ -3-Carene | 1011 | 1008 | 1.15 | 0.08 | 1.09 |
| 8 | <i>p</i> -Cymène | 1024 | 1021 | 0.95 | 0.15 | 0.97 |
| 9 | Limonène | 1029 | 1025 | 0.88 | 0.19 | 0.68 |
| 10 | 1,8-cinéole | 1030 | 1031 | - | - | 0.55 |
| 11 | β -Ocimène Z | 1037 | 1037 | 0.34 | 0.12 | 0.35 |
| 12 | β -Ocimène E | | 1042 | - | - | 0.09 |
| 13 | α -Terpinolène | 1088 | 1075 | - | - | 0.10 |
| 14 | Linalool | 1090 | 1087 | - | - | 0.05 |
| 15 | α -Thujone | 1102 | 1100 | - | - | 0.29 |

| | | | | | | |
|----|---|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 16 | Camphor | 1146 | 1143 | - | - | 0.73 |
| 17 | 4-Terpinéol | 1163 | 1158 | - | - | 0.14 |
| 18 | <i>p</i> -methylacétophénone | 1170 | 1162 | - | 0.13 | 0.08 |
| 19 | Naphtalène | 1181 | 1172 | 0.15 | 0.18 | - |
| 20 | Pulegone | 1237 | 1230 | - | 0.08 | - |
| 21 | Carvone | 1243 | 1239 | - | 0.06 | - |
| 22 | Carvacrol | 1299 | 1292 | - | 0.05 | - |
| 23 | β -Patchoulène | 1381 | 1373 | 0.41 | 0.37 | 0.34 |
| 24 | β -Elemene | 1390 | 1389 | - | 0.11 | 0.11 |
| 25 | γ -Curcumène | 1405 | 1394 | 0.18 | 0.26 | 0.17 |
| 26 | Cycloseychellelle | 1407 | 1396 | 0.22 | - | 0.25 |
| 27 | β -Caryophyllène | 1419 | 1408 | 0.68 | 0.96 | 0.75 |
| 28 | α -Guaiene | 1439 | 1426 | 1.02 | 3.42 | 2.51 |
| 29 | Seychellène | 1446 | 1430 | 2.46 | 1.00 | 2.36 |
| 30 | α -Patchoulène | 1456 | 1440 | 0.94 | 1.21 | 1.14 |
| 31 | β - Guaiene | - | 1443 | 0.57 | 0.65 | 0.62 |
| 32 | α -Curcumène | 1480 | 1475 | 6.26 | 5.76 | 6.62 |
| 33 | Δ - Guaiene | - | 1482 | - | 2.05 | 1.70 |
| 34 | Asaricin | 1495 | 1492 | - | - | 0.62 |
| 35 | Aciphyllene | 1501 | 1486 | 0.32 | - | 0.30 |
| 36 | α -Bulnésène | 1509 | 1492 | 1.26 | - | 0.14 |
| 37 | Italicene ether | 1536 | 1525 | 0.43 | 0.43 | 2.94 |
| 38 | Pogostol | 1553 | 1578 | 1.59 | - | 6.45 |
| 39 | Norpatchoulenol | 1555 | 1541 | 4.03 | 3.17 | 0.58 |
| 40 | Caryophyllène oxide | 1583 | 1573 | 3.90 | 3.68 | 4.14 |
| 41 | ar-Turmérol | 1583 | 1581 | 1.36 | - | 1.00 |
| 42 | humulène 1,2-epoxide | 1608 | 1599 | 0.53 | | 0.51 |
| 43 | Caryophylla- 4(12),8(13)-dien-5 α - ol | 1640 | 1630 | 0.35 | - | 0.33 |
| 44 | Veridiflorol | - | 1635 | - | - | 0.36 |
| 45 | Patchouli alcohol | 1658 | 1647 | 52.71 | 38.63 | 38.10 |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|---|-------------|------------------|------------------|------------------|
| 46 | 1,4-cis-1,7-trans-acorenone | - | 1667 | 0.30 | 0.40 | 0.23 |
| 47 | Pogostone | - | 1711 | 1.71 | 10.64 | 6.68 |
| 48 | Iso-alpha-cedren-15-al | - | 1734 | - | - | 0.20 |
| Rendements | | | | 0.70±0.01 | 0.50±0.12 | 0.77±0.02 |
| Monoterpènes Hydrocarbonés | | | | 6.33 | 2.29 | 4.86 |
| Monoterpènes oxygénés | | | | - | 0.19 | 1.76 |
| Sesquiterpènes Hydrocarbonés | | | | 12.74 | 15.79 | 16.57 |
| Sesquiterpènes oxygénés | | | | 66.91 | 56.95 | 61.52 |
| Autres | | | | 0.15 | 0.31 | 0.70 |
| Total | | | | 87.71 | 75.53 | 86.2 |

^a Composés répertoriés selon leur ordre d'éluion sur colonne capillaire apolaire (HP5MSTM). ^b Indices de rétention sur colonne apolaire (HP5MS). ^c Indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire rapportés par Adams (2007)²⁹,

– : non détectés, tous les composants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des données publiées (Adams, 2007) et des spectres de masse avec les données de la littérature, la bibliothèque MS (bibliothèque NIST et Wiley 7N)

3. Influence de la méthode d'extraction sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P. Cablin*

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est déterminée sur sept souches bactériennes et deux levures en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Cette activité est estimée à partir du diamètre des zones d'inhibition. Les résultats sont présentés dans le tableau 13 pour différentes méthodes d'extraction.

Nos données ont montré que les huiles essentielles de *P. Cablin* possèdent généralement une activité faible à modérée contre les levures (zone d'inhibition de 9.66±0.28 à 22.5±3.53 mm) ainsi que les bactéries de gram positif (zone d'inhibition de 10.86±0.32 à 21±0.00 mm).

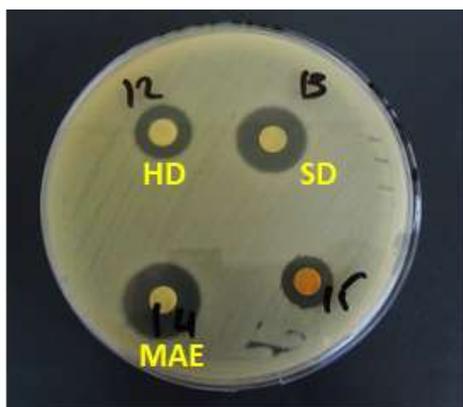
Tableau 13 : Activité antimicrobienne de *Pogostemon Cablin* des huiles essentielles extraites par trois méthodes différentes.

| Microorganismes | Zone d'inhibition (mm) | | |
|------------------------|------------------------|------------|------------|
| | Huiles essentielles | | |
| | HD | MAE | SD |
| Bactérie Gram + | | | |
| <i>S. aureus</i> | 17±0.00 | 18.95±1.48 | 16.95±0.07 |
| <i>S. epidermidis</i> | 13.75±0.68 | 19.75±1.06 | 16.95±0.63 |
| <i>S. lutea</i> | 21±0.00 | 18.2±0.91 | 17.05±0.07 |
| <i>B. subtilus</i> | n.t | 10.86±0.32 | 17.4±0.14 |
| Bactérie Gram - | | | |
| <i>Enterobacter</i> | - | - | - |
| <i>E. coli</i> | - | - | 9.9±1.27 |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - | - |
| Levures | | | |
| <i>C. albicans</i> | 9.66±0.28 | 19.9±1.27 | 22.5±3.53 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 9.66±0.28 | 12.75±1.06 | 12±1.00 |

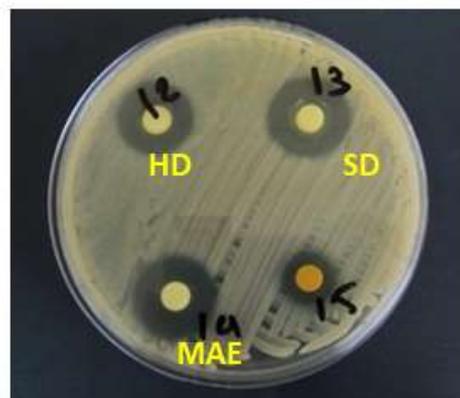
n.t : n'a pas été testé

- : pas d'action

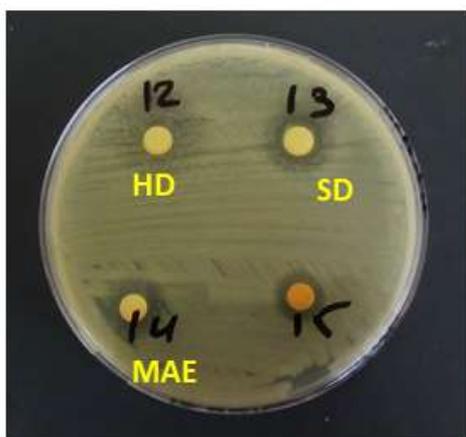
L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P. Cablin* varie en fonction des méthodes d'extraction et des souches testées, l'huile essentielle de patchouli est inhibitrice pour les bactéries à gram positif et levures mais pas pour les bactéries à gram négatif, *C. albicans* est le microorganisme le plus sensible vis-à-vis de l'huile obtenue par SD avec une zone d'inhibition estimé à 22.5±3.53. Trois microorganismes c'est-à-dire : *S. epidermidis*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* sont plus sensibles au MAE et SD qu'au HD, *S. aureus*, est plus sensible au MAE et HD qu'au SD. *S. lutea* est sensible à toutes les huiles quel que soit la méthode d'extraction. La zone d'inhibition la plus important que nous avons obtenue est celle de HD 21±0.00 (figure 26).



Staphylococcus Epidermidis



Staphylococcus Aureus



Bacillus Subtilis



Candida Albicans

Figure 26 : Photographies montrant les zones d'inhibitions des huiles essentielles de *P. Cablin* extraites par trois méthodes différentes.

Il a été signalé que les composés phénoliques de l'huile essentielle ont le plus fort pouvoir antimicrobien suivi des aldéhydes, des cétones et des alcools. Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles extraites par différentes procédures pourraient conduire à l'obtention d'huiles essentielles avec des caractéristiques sensorielles différentes et aussi des activités antimicrobiennes différentes, qui sont étroitement liées à la composition du produit final¹⁶⁰.

La composition chimique des huiles essentielles de cette plante a montré qu'elle contient des composés oxygénés tels que le Patchouli alcool et Pogostone comme composants majeurs. Ces composés sont connus pour posséder de puissantes propriétés antibactériennes¹⁶¹. Ceci suggère que l'activité des huiles peut être attribuée à la teneur principalement en Patchouli alcool et Pogostone.

Dans cette étude, le composant majeur Patchouli alcool est observé en plus grande quantité dans HD que dans le MAE et SD. Par contre une forte teneur de pogostone est observée dans MAE principalement suivi par SD. Cela pourrait être la raison pour laquelle l'huile obtenue par MAE est plus active que celle obtenue par HD contre la majorité des microorganismes testés, mais pour d'autres microorganisme HD est meilleur. En conclusion il est très difficile d'attribuer l'activité antibactérienne d'une huile essentielle totale à un ou quelques principes actifs, car une huile essentielle contient toujours un mélange de différents composés. En plus des composés majeurs, des molécules mineures peuvent avoir une contribution importante à l'activité biologique. Par conséquent, l'activité antibactérienne des huiles de cette plante pourraient être dues aux activités combinées des divers composés principaux et mineurs des huiles essentielles¹⁶².

4. Activité antimicrobienne des extraits de *P. Cablin*

Les zones d'inhibitions des extraits méthanoliques et aqueux contre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lutea*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. albicans* et *S. cerevisiae* sont présentées dans le tableau 14. Les extraits méthanoliques et aqueux (obtenu par décoction) n'ont montré aucune activité antimicrobienne pour toutes les souches testées à l'exception de *S. lutea* qui a montré une forte sensibilité à l'extrait obtenue par décoction avec une zone de diamètre 39 ± 0.00 mm. Les auteurs ont rapporté que l'extrait éthanolique de *P. cablin* présentait une faible activité contre *S. aureus*. Les extraits aqueux et éthanolique n'ont montré aucune activité contre *P. aeruginosa* et *C. albicans*¹⁶³. Dans un autre rapport *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* n'ont montré aucune sensibilité aux extraits aqueux et méthanoliques¹⁶⁴. Plusieurs classes de métabolites secondaires telles que les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les anthraquinones, les coumarines, les saponines, les tanins, les triterpènes et les stéroïdes sont actives sur les microorganismes pathogènes^{165, 166}.

Tous les extraits sont riches en métabolites secondaires ; cependant, l'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de l'existence de métabolites

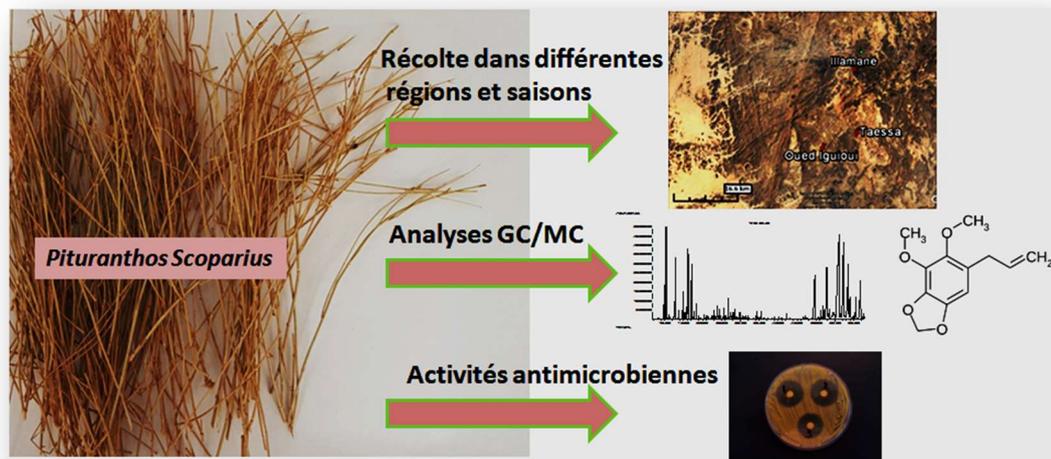
secondaires dans les extraits de plantes, mais aussi de leur concentration et de l'interaction possible avec d'autres composants¹⁶⁷.

Tableau 14 : Activité antimicrobienne de *P. Cablin* de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux obtenu par décoction.

| Microorganismes | Zone d'inhibition (mm) | |
|------------------------|--|--------------------------------|
| | ^b Extrait méthanolique 200mg/ml | ^d Décoction 10mg/ml |
| Bactérie Gram + | | |
| <i>S. aureus</i> | - | - |
| <i>S. epidermidis</i> | - | - |
| <i>S. lutea</i> | - | 39±0.00 |
| <i>B. subtilus</i> | - | - |
| Bactérie Gram - | | |
| <i>Enterobacter</i> | - | - |
| <i>E. coli</i> | - | - |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - |
| Levures | | |
| <i>C. albicans</i> | - | - |
| <i>S. cerevisiae</i> | - | - |

a % (v/v) eau distillée, *b* (p/v) méthanol, *a* % (p/v) eau distillée, - : pas d'action

PARTIE 2 : VARIABILITÉ DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES ET DES ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES DE *PITURANTHOS SCOPARIUS* COLLECTÉE DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS ET SAISONS



I. Etude des composés volatiles

1. Composition chimique des huiles essentielles de *P. Scoparius* collectée dans différentes régions et saisons

Les huiles essentielles de l'espèce *Pituranthos Scoparius* recueillies dans trois stations Oued iguioui (Ou), Taessa (Ta) et Illamane (Il) et durant deux saisons (été et printemps) sont étudiées. La composition chimique des huiles essentielles de *Pituranthos Scoparius* est établie dans le tableau 15. Les rendements obtenus par hydrodistillation sont aussi mentionnés sur le tableau 15 et sont compris entre (0.53-0.85 %). Le meilleur rendement calculé est obtenu à partir de la région Oued Iguioui au printemps et la région Illamane en été. Cependant, dans les rapports précédents, les rendements en huiles essentielles chez *P. Scoparius* de différentes régions sont rapportés dans une fourchette de 1.0 à 3.5 %. Le pourcentage minimum en huile essentielle est trouvé dans l'échantillon Ta* tandis que le contenu en huile essentielle le plus élevé est trouvé dans Ou*. La région de Ou a présenté un rendement plus important au printemps contrairement à Il qui a présenté un rendement plus élevé en été. La région de Ta a pratiquement donné un rendement similaire dans les deux saisons (figure 27). Cette différence s'explique principalement par l'influence des conditions climatiques de la saison estivale et printanière mais aussi de la zone de récolte.

Tableau 15 : Rendements des huiles essentielles de *P. Scoparius* récoltée dans différentes régions et durant deux saisons (printemps et été).

| Saisons | Rendement (%) | | |
|---------|----------------|-----------|-----------|
| | Ou* | Ta* | Il* |
| Mars | 0.85 | 0.53-0.53 | 0.63% |
| | | | |
| Juillet | Ou | Ta | Il |
| | 0.56-0.53-0.64 | 0.55-0.62 | 0.78-0.80 |

Ou : Région de Oued Iguioui.

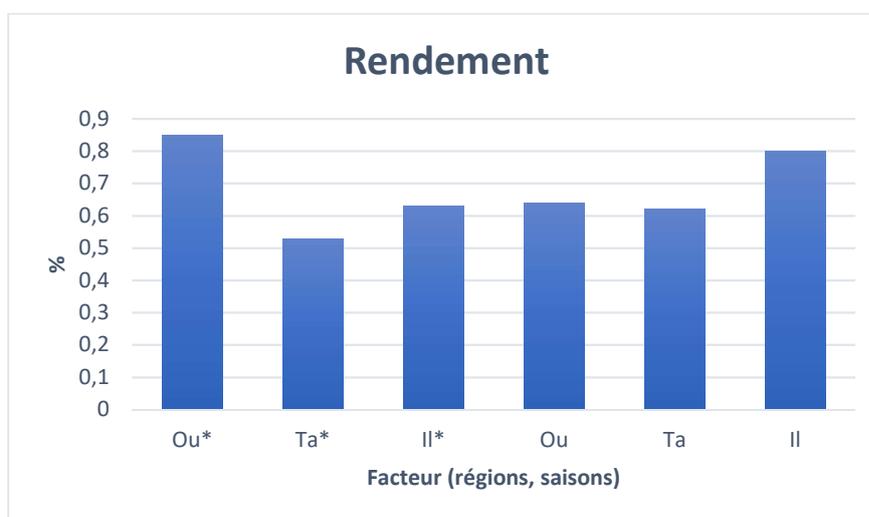
Ta : Région de Taissa.

Il : Région d'Illamane.

* : Echantillons récoltés au printemps.

La GC/MS a montré une variation marquée dans les principaux ingrédients des huiles obtenues à partir de ces trois régions et saisons, en été et au printemps, respectivement.

Un total de 68 composés volatils sont identifiés par GC-MS et leurs pourcentages correspondent à 91.91 % pour Ta, 81.25 % pour Il, 83.93 % pour Ou, 92.04 % pour Ta*, 85.27 % pour Il* et enfin 83.23 % pour Ou*. Les échantillons avec la mention « * » représentent les échantillons récoltés en mois de mars 2012. Les échantillons sans la mention « * » représentent les échantillons récoltés en mois de juillet 2012 (Figure 27).



* représentent les échantillons récoltés en mois de mars 2012

Figure 27 : Rendements des huiles essentielles de *P. Scoparius* récoltée dans différentes régions et durant deux saisons.

La composition des huiles essentielles diffère quantitativement selon le moment et la région de la collecte. Une analyse comparative détaillée de toutes les huiles avec différentes régions a été enregistrée dans le tableau 16.

La composition quantitative des trois échantillons prélevés en juillet et mars a prouvé que la région, le climat et la température ont une influence sur la composition chimique des huiles essentielles.

Les différents échantillons n'ont pas la même teneur en classe chimique. Les monoterpènes hydrocarbonés (4.19-41.57 %), les sesquiterpènes hydrocarbonés (5.18-15.84 %), les sesquiterpènes oxygénés (19.23-49.70 %) et les phtalides

(1,19-13,81 %) voir la figure 28. Quel que soit la région ou la saison de récolte, le composé majoritaire de la plupart des huiles essentielles est le Dillapiol (44.79) %, sauf pour la région de Oued iguioui ou le pourcentage du Dillapiol est 4.02% durant la saison estivale. Le Dillapiol est le composé majoritaire identifié dans l'huile essentielle *P. Scoparius* de la région Djelfa 47 %⁹⁰ et de dans l'huile essentielle des graines de *P. Scoparius* récoltées à Ghardaia 12.2 %⁹¹. L'huile essentielle contient également des monoterpènes oxygénés (6.60-12.51 %) et des hydrocarbures sesquiterpéniques (5.18-15.84 %). Les composés prédominants sont le α -Pinène (0.1-15.47 %), la Myristicine (4.21-15.33) %, le β -Eudesmol (2.52-9.15) %, le *p*-Cymène (1.77-8.35 %), le Butylidène phtalide (0.89-7.15 %), le β -Pinène (0.12-5.04) %, le 3-n-Butyl phtalide (0-4.46 %), le Limonène (0.67-4.37 %), le Spathulénol (1.45-4.27 %), le Δ -3-Carène (0.13-3.64 %). Voir la figure 29. La variation saisonnière de la composition chimique des huiles essentielles pourrait être due aux différentes altitudes, les conditions environnementales et le stade/saison du développement des matières végétales, ce qui est en accord avec les résultats rapportés précédemment¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

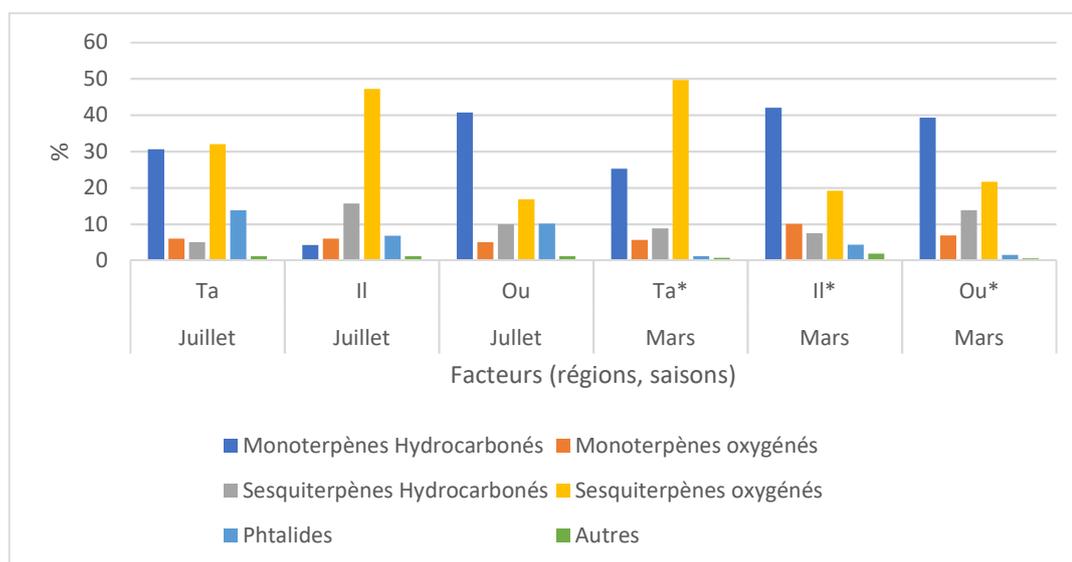


Figure 28 : Comparaison entre les classes chimiques des huiles essentielles de *P. Scoparius* récoltée dans différentes régions et durant deux saisons.

La variation des pourcentages des principaux composés d'huile essentielle des échantillons de *P. Scoparius* étudiés a confirmé la présence de deux chémotypes

(Dillapiol et α -Pinène). Des résultats similaires sont rapportés par les auteurs ^{88, 90}. Les métabolites secondaires des plantes, comme les métabolites des huiles essentielles, sont connus pour jouer un rôle clé dans l'adaptation de la plante à son environnement. Ils sont impliqués dans des fonctions essentielles de résistance aux facteurs biotiques et abiotiques tels que les phytopathogènes, les herbivores, les UV, la température, etc. Lorsque la plante est soumise à des conditions de stress hydrique et de température élevée, les terpènes s'évaporent et provoquent un flux d'air qui refroidit la plante et réduit sa transpiration. Cela entraîne une production accrue de terpènes et d'huiles essentielles. Les conditions climatiques telles que la température et l'humidité ainsi que les facteurs édaphiques tels que l'altitude et les caractéristiques du sol peuvent également affecter la composition et le rendement en huile essentielle.

Les principaux constituants de l'huile essentielle étaient la Myristicine (24.1%), le α -Pinène (17.4%), le Phellandrène (15.6%) et le Sabinène (7.5%)^{91, 171}. Les auteurs ont rapporté que les différences constatées entre la composition des huiles essentielles d'une même espèce peuvent être attribuées à la variation de certains facteurs climatiques tels que la température et les précipitations^{91, 146}. Il est important de souligner que nos résultats ont montré la présence de 3-n-butyl phtalide dans certains échantillons, un composé qui n'est pas rapporté dans les travaux antérieurs menés sur les huiles de *P. Scoparius*.

Tableau 16 : Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *P. Scoparius* obtenue à partir de différentes régions et saisons.

| N°. | Composés ^a | RI ^b | RI ^c | Juillet | | | Mars | | |
|-----|------------------------|-----------------|-----------------|---------|------|-------|------|-------|-------|
| | | | | Ta | Il | Ou | Ta* | Il* | Ou* |
| 1 | α -Thujène | 914 | 930 | 1.94 | 0.05 | 2.54 | 0.63 | 2.90 | 3.66 |
| 2 | α -Pinène | 925 | 939 | 10.84 | 0.10 | 13.42 | 7.79 | 12.80 | 15.46 |
| 3 | Thuja-2,4(10) diene | - | - | 0.04 | 0.02 | - | - | 0.11 | 0.11 |
| 4 | Camphène | 937 | 953 | 0.16 | - | 0.27 | 0.24 | 0.29 | 0.29 |
| 5 | Verbenène | 943 | 967 | 0.06 | 0.06 | - | 0.12 | 0.20 | 0.20 |
| 6 | Sabinène | 967 | 976 | 0.88 | 0.13 | 1.79 | 0.72 | 0.39 | 0.83 |

| | | | | | | | | | |
|----|--|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 7 | β -Pinène | 971 | 979 | 2.63 | 0.17 | 4.86 | 2.36 | 5.05 | 4.50 |
| 8 | β -Myrcène | 989 | 990 | 0.38 | 0.08 | 0.72 | 0.32 | 0.60 | 0.42 |
| 9 | 1-Phellandrène | 1003 | 1005 | 0.39 | 0.08 | 0.11 | 0.18 | 0.21 | 0.26 |
| 10 | Δ -3-carène | 1009 | 1011 | 1.08 | 0.13 | 1.33 | 0.23 | 3.64 | 2.25 |
| 11 | α -Terpinène | 1015 | 1017 | 0.28 | 0.08 | - | 0.17 | 0.36 | 0.23 |
| 12 | <i>p</i> -Cymène | 1025 | 1024 | 4.89 | 1.77 | 5.81 | 7.61 | 8.35 | 5.27 |
| 13 | Limonène | 1028 | 1029 | 3.16 | 0.67 | 4.37 | 3.06 | 3.82 | 3.08 |
| 14 | β -Ocimène Z | 1039 | 1040 | 2.70 | 0.81 | 3.85 | 1.08 | 1.57 | 1.70 |
| 15 | β -Ocimène E | 1047 | 1050 | 0.27 | 0.07 | 1.20 | 0.34 | 0.44 | 0.32 |
| 16 | γ -Terpinène | 1057 | 1059 | 0.56 | - | 0.19 | 0.32 | 0.82 | 0.51 |
| 17 | Cis sabinène hydrate | 1064 | - | 0.11 | 0.05 | 0.12 | - | 0.23 | 0.10 |
| 18 | α -Terpinolène | 1085 | 1088 | 0.24 | - | 0.09 | 0.11 | 0.25 | 0.17 |
| 19 | Trans sabinène hydrate | 1095 | - | 0.22 | 0.08 | 0.26 | - | 0.27 | |
| 20 | 3-Méthylène-3,5-hepten-2-one | 1102 | - | 0.10 | 0.12 | - | 0.14 | - | 0.15 |
| 21 | β -Thujone | 1113 | 1114 | 0.16 | 0.14 | 0.17 | - | 0.05 | 0.41 |
| 22 | Terpinène-1-ol | 1118 | - | 0.15 | - | 0.14 | - | 0.30 | |
| 23 | Alpha camphoaldéhyde | 1123 | 1125 | 0.37 | - | 0.35 | 0.66 | - | 0.66 |
| 24 | 2.3.3-triméthyl-3-cyclopentène-2-one | 1130 | - | - | 0.33 | - | - | 0.91 | - |
| 25 | Pinocarveol (trans) | 1135 | 1139 | 0.69 | 0.45 | 0.42 | 0.63 | 1.07 | 0.92 |
| 26 | Verbenol | 1138 | 1140 | 0.11 | 0.42 | 0.36 | 0.51 | 0.55 | 0.35 |
| 27 | Ethanone-1-(1,4-triméthyl-3-cyclohexen-1-yl) | 1147 | 1157 | 0.16 | 0.11 | 0.09 | - | - | - |
| 28 | Pentylbenzène | 1154 | 1156 | 0.14 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.11 | 0.04 |
| 29 | Pinocarvone | 1160 | 1162 | 0.55 | 0.10 | 0.18 | 0.26 | 0.74 | |
| 30 | <i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol | 1165 | - | - | - | - | 0.51 | - | - |
| 31 | 4-Terpinéol | 1176 | 1177 | 1.02 | 1.90 | 1.25 | 0.95 | 1.91 | 1.17 |
| 32 | <i>p</i> -Cymen-8-ol | 1183 | 1183 | 0.30 | 0.58 | 0.32 | - | 0.55 | 0.44 |
| 33 | α -Terpinéol | 1189 | 1189 | 0.18 | 0.29 | 0.23 | - | 0.39 | 0.31 |
| 34 | (-)-Myrténal | 1194 | 1193 | 0.44 | 0.30 | 0.21 | 0.27 | 0.42 | 0.37 |

| | | | | | | | | | |
|----|--------------------------------|------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 35 | Myrténol | 1200 | 1200 | 0.48 | 0.14 | 0.12 | 0.28 | 0.48 | 0.49 |
| 36 | I-verbénone | 1206 | 1205 | 0.21 | 0.19 | 0.13 | 0.16 | 0.68 | 0.59 |
| 37 | Carvéol (trans) | 1218 | 1216 | 0.30 | 0.40 | 0.25 | 0.40 | 0.84 | 0.59 |
| 38 | Carvéol cis | 1220 | - | - | - | - | - | 0.16 | - |
| 39 | β -Citronellol | 1229 | 1228 | 0.14 | - | 0.18 | - | - | - |
| 40 | <i>I</i> -Carvone | 1241 | 1242 | 0.13 | 0.15 | 0.09 | 0.20 | 0.29 | 0.11 |
| 41 | Carvotanacétone | 1245 | 1247 | 0.05 | 0.18 | - | 0.06 | 0.11 | - |
| 42 | Phéllandral | 1273 | 1271 | 0.10 | 0.09 | - | - | 0.16 | - |
| 43 | <i>p</i> -Cymène-7-ol | 1287 | 1290 | 0.09 | - | - | 0.06 | 0.21 | - |
| 44 | Carvacrol | 1300 | 1299 | 0.30 | 0.67 | 0.41 | 0.74 | 0.81 | 0.49 |
| 45 | 1.4- <i>p</i> -Menthadien-7-ol | 1325 | 1333 | 0.05 | - | - | - | 0.05 | - |
| 46 | Acétophénone | 1351 | 1348 | 0.10 | - | 0.19 | - | 0.06 | - |
| 47 | α -copaène | 1370 | 1376 | 0.11 | 0.09 | 0.10 | 0.05 | 0.07 | 0.05 |
| 48 | Methyleugénol | 1400 | 1401 | 0.25 | 0.25 | 0.90 | 0.34 | 0.73 | 0.22 |
| 49 | α -Amorphène | 1472 | 1484 | 0.08 | 0.05 | - | - | - | - |
| 50 | D-Germacrène | 1476 | 1485 | 0.05 | - | - | 0.07 | - | - |
| 51 | β -selinène | 1481 | 1485 | 0.21 | 0.18 | 0.09 | 0.04 | 0.04 | - |
| 52 | α -Murolène | 1496 | 1500 | 0.02 | - | - | - | - | - |
| 53 | Myristicine | 1523 | 1520 | 4.21 | 15.33 | 9.83 | 8.70 | 7.41 | 13.76 |
| 54 | α -Calacorène | 1533 | 1545 | 0.09 | 0.06 | - | - | 0.05 | - |
| 55 | β -Calacorène | 1549 | - | 0.39 | - | - | - | - | - |
| 56 | Élémicine | 1556 | 1554 | 0.14 | 0.22 | - | 0.13 | 0.06 | 0.08 |
| 57 | 1.5-Epoxysalvial-4(14)ene | 1560 | - | 0.62 | 0.72 | 0.41 | 0.14 | 0.19 | - |
| 58 | Spathulénol | 1575 | 1576 | 4.27 | 3.81 | 4.06 | 2.11 | 2.34 | 1.45 |
| 59 | Salvia-4(14)-en-1-one | 1586 | - | 0.44 | 0.44 | 0.29 | 0.14 | 0.29 | 0.15 |
| 60 | Caryophyllene oxide | 1600 | 1581 | 0.57 | 0.50 | - | - | - | - |
| 61 | Dillapiol | 1612 | 1622 | 16.38 | 32.88 | 4.02 | 44.79 | 12.00 | 16.43 |
| 62 | Isospathulenol | 1634 | - | 0.52 | 0.15 | 0.23 | - | 0.14 | - |
| 63 | β -eudesmol | 1645 | 1649 | 9.19 | 8.75 | 7.81 | 2.52 | 4.28 | 3.66 |
| 64 | Butylidène phtalide Z | 1668 | 1672 | 7.15 | 4.82 | 4.98 | 0.81 | 2.88 | 1.33 |
| 65 | Butylidène phtalide E | 1700 | 1718 | 1.86 | 0.94 | 0.96 | 0.14 | 0.46 | 0.28 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|------|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 66 | 3-n-Butyl phtalide | 1724 | 1739 | 4.46 | - | 4.19 | 0.24 | 1.01 | - |
| 67 | Butylidène dihydro-phtalide | 1777 | | 0.33 | 1.11 | - | - | - | - |
| 68 | Acide palmitique | 1947 | | 0.21 | 0.07 | - | 0.09 | 0.06 | 0.07 |
| Monoterpènes Hydrocarbonés | | | | 30.62 | 4.24 | 40.68 | 25.27 | 42.04 | 39.34 |
| Monoterpènes oxygénés | | | | 6.00 | 6.07 | 5.07 | 5.71 | 10.05 | 6.90 |
| Sesquiterpènes Hydrocarbonés | | | | 5.08 | 15.66 | 10.02 | 8.86 | 7.56 | 13.85 |
| Sesquiterpènes oxygénés | | | | 31.98 | 47.24 | 16.82 | 49.70 | 19.23 | 21.68 |
| Phtalides | | | | 13.81 | 6.86 | 10.13 | 1.19 | 4.34 | 1.60 |
| Autres | | | | 1.18 | 1.18 | 1.22 | 0.74 | 1.92 | 0.57 |
| Total | | | | 88.67 | 81.25 | 83.94 | 91.46 | 85.16 | 83.91 |

^aComposés répertoriés selon leur ordre d'éluion sur colonne capillaire apolaire (HP5MSTM). ^bIndices de rétention sur colonne apolaire (HP5MS). ^cIndices de rétention de la littérature sur colonne apolaire rapportés par Adams (2007)²⁹. * échantillon du mois de mars (printemps)

– : non détectés. Tous les composants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des données publiées (Adams, 2007) et des spectres de masse avec les données de la littérature. La bibliothèque MS (bibliothèque NIST 11 et Wiley 7N)

Il existe une différence fortement significative pour tous les principaux composés de l'huile essentielle de *pituranthos scoparius* selon les saisons (P <0.001) à l'exception de la Myristicine (P = 0.12). Ainsi qu'une différence fortement significative entre les différentes régions sélectionnées pour cette étude. L'interaction entre les deux saisons et les trois régions est très significative (P <0.001) sauf pour le 4-Terpinéol où il existe une interaction significative (P = 0.25).

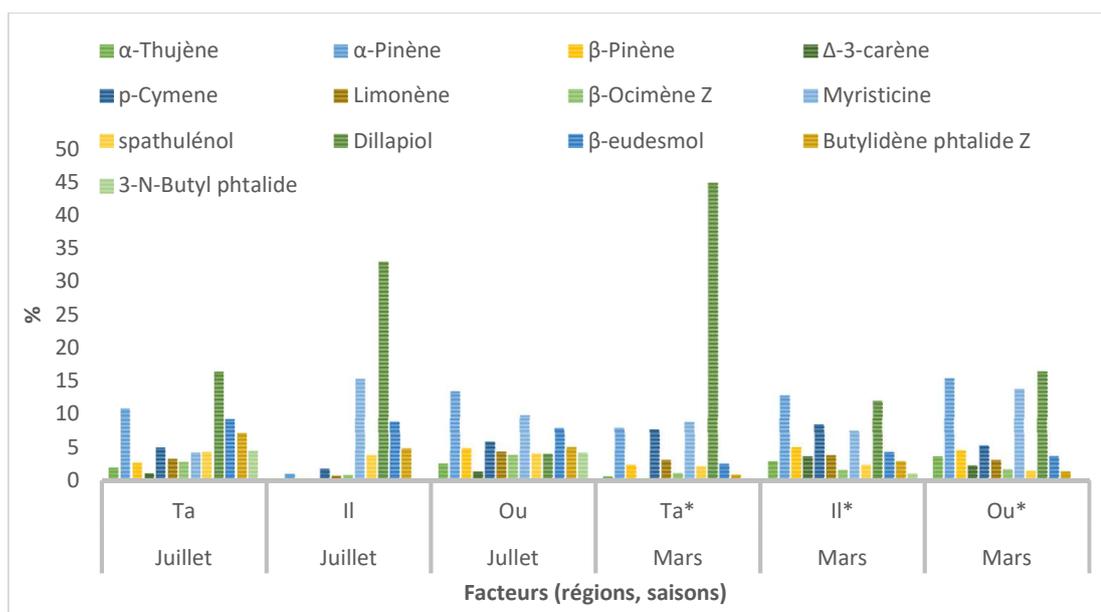


Figure 29 : Comparaison entre les principaux composants des huiles essentielles de *P. Scoparius* récoltée dans différentes régions et deux saisons.

2. Activité Antimicrobienne des huiles essentielles de *P. Scoparius* collectés dans différentes régions et saisons

L'activité antimicrobienne in vitro des huiles de *P. Scoparius* estimées par le diamètre des zones d'inhibition varie selon le site de collecte, saisons et les souches utilisées (tableau 17). L'évaluation antibactérienne des huiles essentielles a illustré une activité inhibitrice modérée contre les souches bactériennes à gram-positives et des levures tandis que les bactéries à gram négative se sont avérées résistantes (figure 30).

En se basant sur les valeurs du diamètre des zones d'inhibition. Ta, Ta*, Il, Il*, Ou, Ou* ont montré une faible activité (zone d'inhibition ≤ 10 mm) contre *S. aureus*. *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *C. albican* et *S. cerevisiae* ont montré une faible sensibilité pour Ta* (10.1 ± 0.28 mm) mais présentent une sensibilité modérée pour Ta, Il, Il*, Ou, Ou* ($15 \text{ mm} \geq \text{zone d'inhibition} \geq 11 \text{ mm}$).

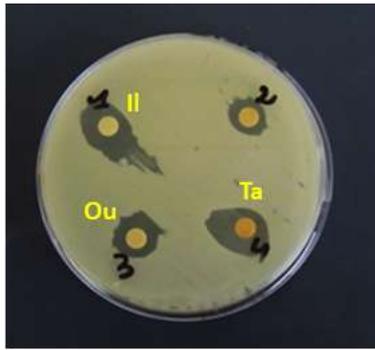
La souche *S. lutea* est inhibée par les huiles essentielles de toutes les régions du mois de juillet. Les échantillons de la saison estivale ont montré une activité antibactérienne plus élevée pour *S. lutea*, par rapport à la saison du printemps.

Indépendamment de l'effet inhibiteur des huiles essentielles, une seule souche, à savoir *E. coli* est marquée comme sensible à l'échantillon de la saison du printemps de la région de Illamane, mettant en évidence une zone d'inhibition de 10.4 ± 0.55 mm. Ta* est l'échantillon le moins efficace contre les souches testées probablement à cause de sa teneur élevée de sesquiterpènes oxygénés.

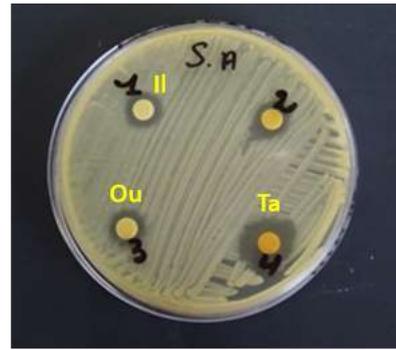
Tableau 17 : Activité Antimicrobienne des huiles essentielles de *Pituranthos Scoparius* collectés dans différentes régions et saisons.

| Souches | Juillet | | | Mars | | |
|------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | Ou | Ta | II | Ou* | Ta* | II* |
| Bactérie Gram + | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 8.7±0.84 | 8.3±1.00 | 9.75±0.35 | 10.7±0.35 | 7.6±0.90 | 10.9±1.27 |
| <i>S. epidermidis</i> | 12.6±0.26 | 12.7±0.60 | 13.13±1.05 | 13.7±1.38 | 10.1±0.28 | 14.2±1.83 |
| <i>S. lutea</i> | 22.5±0.70 | 22±2.82 | 25±1.35 | 14.1±1.26 | 17±1.05 | 12.5±1.00 |
| <i>B. subtilus</i> | 13.8±1.46 | 11±1.41 | 12.10±0.52 | 11.5±0.70 | 9.5±0.95 | 13.7±0.10 |
| Bactérie Gram - | | | | | | |
| <i>Enterobacter</i> | 7.7±0.91 | - | - | - | - | - |
| <i>E. coli</i> | - | - | - | 8.1±1.55 | - | 10.4±0.55 |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - | - | - | - | - |
| Levures | | | | | | |
| <i>C. albicans</i> | 15.1±1.00 | 11.5±1.40 | 12±1.41 | 13.3±0.35 | 9.65±0.21 | 15.2±1.62 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 11.6±1.41 | 13.8±1.54 | 11.8±1.06 | 16.8±1.13 | 9±1.32 | 15.2±1.62 |

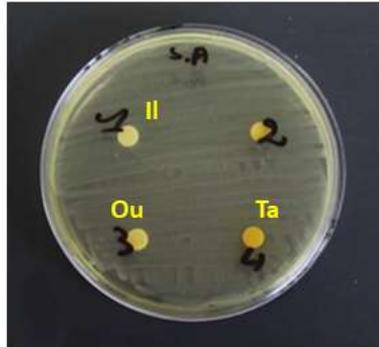
Les valeurs sont des moyennes ± écart type, zone d'inhibition en mm ± écart type au-delà du diamètre du disk (6 mm), - : pas d'action.



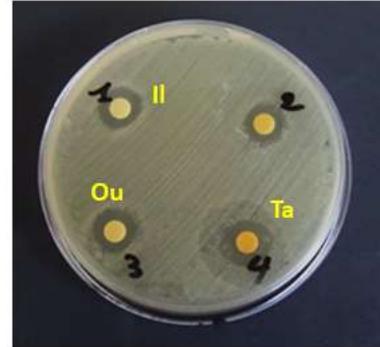
Staphylococcus Epidermidis



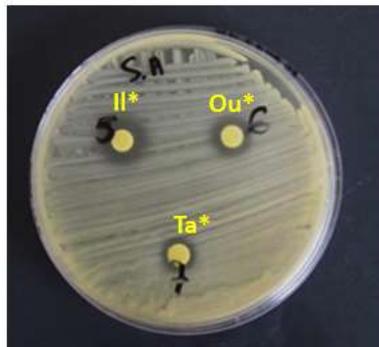
Staphylococcus Aureus



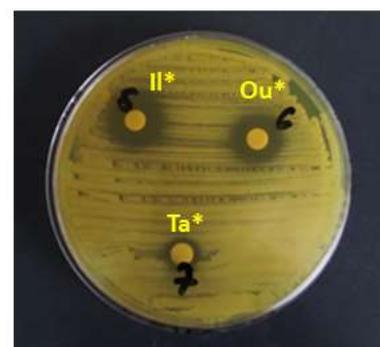
Escherichia Coli



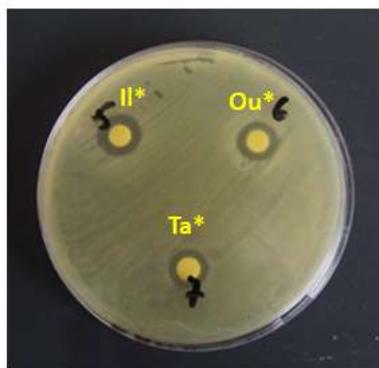
Bacillus Subtilis



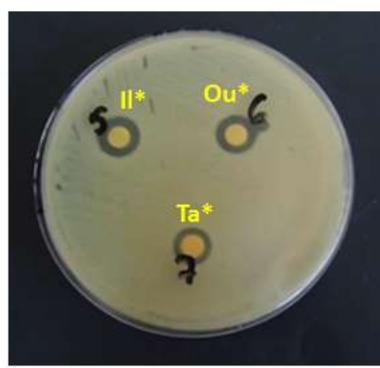
Staphylococcus Aureus



Candida Albicans



Bacillus Subtilis



Staphylococcus Epidermidis

* échantillon du mois de mars

Figure 30 : Photographies montrant les zones d'inhibitions des huiles essentielles de *P. Scoparius* collectés dans différentes régions et saisons.

II. Etude des composés lourds

1. Influence des solvants sur l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits de *P. Scoparius*

A. Activité antioxydante

L'effet des différents extraits organiques de *P. Scoparius* sur la capacité de piégeage des radicaux DPPH est évalué par la détermination des valeurs IC_{50} puis comparé à BHT et l'acide ascorbique utilisés comme témoins positifs. Les propriétés d'élimination des radicaux DPPH de différentes extractions par solvant de *P. Scoparius* sont présentées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Dosage antioxydant des extraits de *Pituranthos Scoparius*.

| Extraits | IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) DPPH |
|---------------------------|-------------------------------------|
| Extrait méthanolique | 142.77 \pm 1.41 |
| Acétone | 83.14 \pm 1.01 |
| Extrait éthanolique | 119.95 \pm 1.79 |
| Extrait d'Acétate d'éthyl | 155.00 \pm 2.26 |
| Infusion | 81.19 \pm 1.03 |
| Décoction | 90.09 \pm 1.06 |
| Macération avec Ultrason | 89.70 \pm 1.59 |
| Macération à froid | 69.73 \pm 0.61 |
| BHT | 9.14 \pm 1 |
| Ascorbic acid | 1.16 \pm 0.02 |

IC_{50} : concentration minimale de l'échantillon qui réduit l'absorbance de 50 %.

Moyenne \pm SD ($n = 3$).

Les résultats ont indiqué l'influence possible du solvant d'extraction sur l'activité antioxydante totale. La valeur de concentration en BHT et en acide ascorbique pour 50% d'inhibition est respectivement de $9.14 \pm 1 \text{ ug / ml}$ et $1.16 \pm 0.02 \text{ ug / ml}$. L'extrait aqueux (macération) a donné l'activité antioxydante totale la plus élevée avec $IC_{50} = 69.73 \pm 0.61 \text{ ug / ml}$. Ce résultat correspond à celui trouvé par H. Adida et al qui ont trouvé que l'extrait aqueux de la partie aérienne de *P. Scoparius* présentait la meilleure activité antiradicalaire avec une $IC_{50} = 45 \text{ } \mu\text{g /}$

ml. Les IC₅₀ des différentes extractions par solvant de la plante et le standard ont diminué dans l'ordre suivant : (macération à froid 69.73 µg / m)> (infusion 81.19 µg / ml)> (acétone 83.14 µg / ml)> (macération avec ultrason 89.70 µg / ml) > (décoction 90.09 µg / ml)> (extrait éthanolique 119.95 µg / ml)> (extrait méthanolique 142.77 µg / ml)> (acétate d'éthyle 155.00 µg / ml). Comparativement. L'activité d'élimination des radicaux DPPH est inférieure à celle des antioxydants synthétiques comme l'acide ascorbique et le BHT.

B. Teneur totale en phénols et flavonoïdes

L'influence des différents extraits organiques de *P. Scoparius* sur Teneur totale en phénols et flavonoïdes est évaluée. L'estimation quantitative des CPT des extraits de *P. Scoparius* (tableau 19) a montré qu'ils sont supérieurs à leurs teneurs en CFT. La teneur de ces métabolites secondaires dépend du type de solvant utilisé pour l'extraction avec une polarité variable.

Le contenu total des composés phénoliques dans différents extraits est déterminé à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage ($y = 0.107x + 0.0065$) en utilisant l'essai de Folin-Ciocalteu et exprimé en équivalents d'acide gallique GAE. L'extrait qui a donné une meilleure teneur en polyphénols est (extrait d'acétone 157.93 mg d'acide gallique / g)> (décoction 108.23 mg d'acide gallique / g)> (infusion 104.52 mg d'acide gallique / g)> (macération avec ultrason 96.45 mg d'acide gallique / g)> (macération à froid 96.40 mg d'acide gallique / g)> (éthanol 95.43 mg d'acide gallique / g)> (acétate 93.62 mg d'acide gallique / g)> (extrait méthanolique 63.77 mg d'acide gallique / g) (Tableau 19).

Tableau 19 : Teneur totale en phénols et flavonoïdes des extraits de *P. Scoparius*.

| Extraits | CPT mg Gallic Acid/g | CFT mg Quercetin/g |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Extrait méthanolique | 67.77±1.55 | 8.54±0.42 |
| Acétone | 157.93±1.42 | 14.75±0.57 |
| Extrait éthanolique | 95.43±1.18 | 10.04±0.10 |
| Extrait d'Acétate d'éthyl | 93.62±0.08 | 7.40±0.10 |

| | | |
|---------------------------------|-------------|-----------|
| Infusion | 104.52±1.72 | 5.54±0.66 |
| Décoction | 108.23±1.64 | 4.38±0.06 |
| Macération avec ultrason | 96.45±1.16 | 5.93±0.34 |
| Macération à froid | 96.40±1.66 | 5.16±0.85 |

Moyenne ± SD (n = 3).

Le contenu total des composés flavonoïdes dans différents extraits est déterminé à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage $y = 33.73x + 0.009$ et exprimé en équivalents de quercétine QE. La quantité de contenu total en flavonoïdes varie de (4.38-14.75) en équivalent quercétine (QE mg / g) respectivement (tableau 19). En comparant tous les extraits de *P. Scoparius*. L'extrait qui a donné une teneur plus élevée en polyphénol et en flavonoïdes est l'extrait d'acétone 157.93 mg Acide gallique / g et 14.75 mg de quercétine / g respectivement.

Discussion

Les antioxydants sont des éléments essentiels pour protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif causé par les radicaux libres. L'étude menée sur la fraction non volatile a permis de mettre en évidence l'impact des solvants et des méthodes d'extraction sur la quantité totale de composés phénoliques et de flavonoïdes, ainsi que sur l'activité antioxydante de *P. Scoparius* (figure 31).

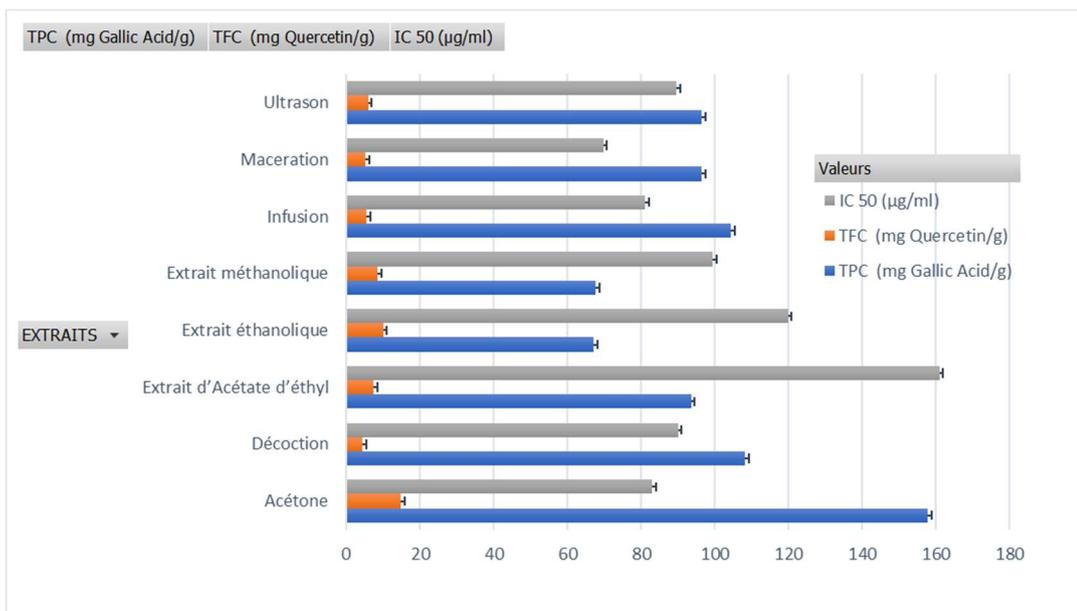


Figure 31 : Influence des solvants et des techniques d'extraction sur la teneur en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante de *P. Scoparius*.

Les différents extraits utilisés dans cette étude n'ont montré aucune corrélation entre la méthode du piégeage des radicaux libres DPPH et la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux. Il est connu que différents composés phénoliques ont des réponses différentes dans la méthode de Folin-Ciocalteu. De même, la réponse antioxydante des composés phénoliques varie remarquablement en fonction de leur structure chimique¹⁷². De plus, il peut y avoir des interférences provenant d'autres composants chimiques présents dans l'extrait, tels que les sucres ou l'acide ascorbique¹⁷³.

2. Influence de la région et période de récolte sur l'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits de *P. Scoparius*

A. Activité antioxydante

Les résultats de l'activité de piégeage des radicaux DPPH ainsi que les rendements des extraits méthanoliques de différentes régions et saisons sont présentés dans le tableau 20.

Les valeurs l'IC₅₀ variaient entre 66.89±0.56 et 327.72±2.10 µg/ml, et la meilleure activité est observée dans l'extrait méthanolique de la région d'Illamane du mois de juillet avec un IC₅₀= 66.89±0.56 (II). L'activité de piégeage la plus faible est enregistrée dans l'extrait de la région de Oued iguioui du mois de juillet avec un IC₅₀= 327.72±2.10 µg/ml (Ou). Tous les extraits de *P. Scoparius* ont donné une activité antioxydante plus faible que celle de l'acide ascorbique et le BHT avec un IC₅₀ 1.16±0.02 et 9.14±0.50 respectivement.

Tableau 20 : Activité antioxydante et teneur des extraits méthanoliques de *P. Scoparius* obtenus à partir de différentes régions et saisons.

| Saisons | (%) | Sites | IC ₅₀ (µg/ml) DPPH |
|-----------------|------|-------|----------------------------------|
| Juillet | 11.8 | Ou | 327.72±2.10 |
| | 5.8 | Ta | 142.77±1.41 |
| | 4.1 | Il | 66.89±0.56 |
| Mars | 7.2 | Ou* | 206.56±2.36 |
| | 4.4 | Ta* | 310.4±3.71 |
| | 8 | Il* | 150.62±1.66 |
| Control positif | | BHT | 9.14±0.50 |
| | | A | 1.16±0.02 |

A : Acide ascorbique

B. Teneur totale en phénols et flavonoïdes

Comme on peut l'observer, les quantités de phénols totaux varient entre les espèces de 38.70±1.01 à 119.61±0.15 Gallic Acid/g. L'échantillon ayant la valeur totale de phénol la plus élevée est Ou suivit par Il. D'autre part, l'échantillon ayant la plus faible teneur totale en phénols était Ta* suivi de Ou*. Les extraits méthanoliques obtenus durant la saison estivale ont donné une meilleure teneur en polyphénols que les extraits obtenus durant la saison printanière.

Tableau 21 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits méthanoliques de *P. Scoparius* obtenues à partir de différentes régions et saisons.

| Saisons | Sites | CPT mg Gallic Acid/g | CFT mg Quercetin/g |
|----------------|-------|----------------------|--------------------|
| Juillet | Ou | 119.61±0.15 | 12.2±0.23 |
| | Ta | 67.77±2.55 | 8.54±0.42 |
| | Il | 113.2±0.2 | 11.93±0.6 |
| Mars | Ou* | 38.73±0.19 | 8.65±0.13 |
| | Ta* | 38.70±1.01 | 8.49±0.31 |
| | Il* | 82.84±0.71 | 9.41±0.5 |

Moyenne ± SD (n = 3).

Chez les plantes, les principaux composés à activité antioxydante sont les phénols, car ils possèdent un cycle aromatique qui permet la stabilisation et la relocalisation des électrons non appariés de leur structure, facilitant ainsi le don d'atomes d'hydrogène et d'électrons à partir de leurs groupes hydroxyle¹⁷⁴. La teneur totale en phénol varie en fonction de l'espèce végétale, du tissu végétal, du stade de développement et des facteurs environnementaux, tels que le stress hydrique, la température et les conditions d'éclairage¹⁷⁵.

C. Dosage du pouvoir réducteur ferrique

Dans le dosage du pouvoir réducteur, la couleur jaune de la solution d'essai passe au vert en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon d'essai (figure 32). La figure 33 montre les courbes dose-réponse pour les pouvoirs réducteurs de tous les extraits de *P. Scoparius* (0- 1.6 mg/mL). Nous avons constaté que le pouvoir réducteur augmente avec la concentration de chaque échantillon. L'ordre de classement pour la réduction de puissance était Ta* > Il* > Ou* > Ta > Il > Ou. Un pouvoir réducteur plus élevé (1,11 ± 0,14 à 1.6 mg/mL) est évident dans la fraction Ta*. Les extraits méthanoliques obtenus durant la saison printanière ont donné un meilleur pouvoir réducteur ferrique que les extraits obtenus durant la saison estivale.

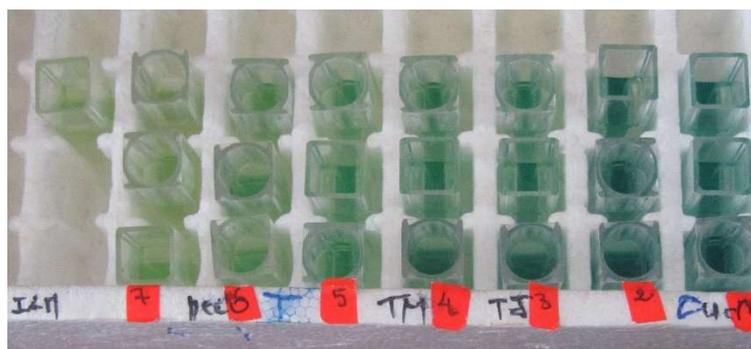
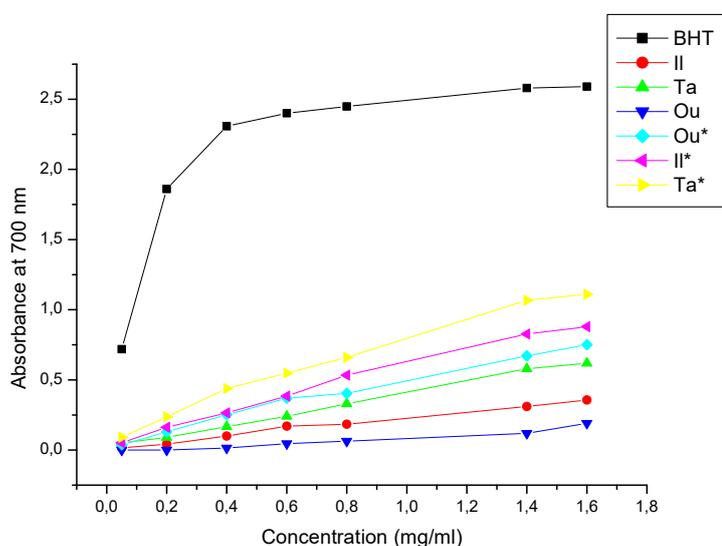


Figure 32 : La couleur jaune de la solution d'essai qui passe au vert en fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon.



*Illamane (II). Oued Iguioui (Ou) et Taessa (Ta) à différentes concentrations. BHT utilisé comme témoin positif. (n = 3. Valeur = moyenne ± SD). *: Mars*

Figure 33 : Pouvoir réducteur ferrique des extraits méthanoliques de *P. Scoparia* obtenus à partir de trois zones et deux saisons.

La présence des réducteurs dans la solution provoque la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanure à la forme ferreuse. Par conséquent, Fe^{2+} peut être contrôlé par mesure d'absorbance à 700 nm. Des rapports antérieurs ont suggéré que les propriétés réductrices exerçaient une action antioxydante en donnant un atome d'hydrogène pour briser la chaîne des radicaux libres¹⁷⁶. L'augmentation de l'absorbance à 700 nm indique une augmentation de la capacité de réduction. Les antioxydants présents dans les fractions de *P. Scoparius* ont provoqué leur

réduction du complexe Fe³⁺/ferricyanure à la forme ferreuse, et ont ainsi prouvé le pouvoir réducteur.

Discussion

Les résultats obtenus dans les tests ont clairement démontré que l'interaction d'un antioxydant avec le DPPH dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et de la nature des antioxydants. Il existe des composés qui réagissent rapidement avec le radical DPPH, tandis que d'autres ne le font pas. Athaména et al. ont également trouvé une différence selon le test utilisé¹⁷⁷. Ce qui peut expliquer la différence de résultats obtenus. En outre, il convient de noter que dans le test FRAP, toutes les substances réduites, et pas seulement les composés phénoliques, réagissent dans le milieu réactionnel¹⁷⁸.

Le niveau de corrélation entre la teneur en phénols et l'activité antioxydante sont intéressants, mais il faut prendre en compte le fait que les composés phénoliques peuvent réagir différemment selon leur nombre de groupes phénoliques, et que la teneur totale en phénols ne prend pas nécessairement en compte tous les antioxydants présents dans un extrait. Malgré les différentes combinaisons réalisées dans cette étude, il a été observé une absence de corrélation entre les deux techniques, ce qui est également un résultat communément rapporté dans la littérature scientifique¹⁷⁹. Il est largement admis que ce n'est pas nécessairement la teneur élevée en polyphénols qui présente une puissante activité antioxydante¹⁸⁰.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La recherche des activités biologiques dans les huiles essentielles a connu un essor considérable ces dernières années. Les populations se tournent vers les solutions naturelles en matière de santé et de beauté. Cette thèse a pour objectif de valoriser les plantes médicinales *Pituranthos Scoparius* et *Pogostemon Cablin*, en étudiant leurs effets thérapeutiques.

En raison des inconvénients que représentent les méthodes d'extraction traditionnelles comme l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur, l'extraction par microonde a été utilisée. Cette alternative aux procédures d'extraction conventionnelles peut augmenter l'efficacité de la production et contribuer à la protection de l'environnement en réduisant l'utilisation de solvants et d'énergie.

Les effets des méthodes d'extractions sur les compositions d'huiles essentielles de *P. Scoparius* et *P. Cablin* et leurs activités biologiques sont étudiés ici. Les compositions chimiques des huiles essentielles obtenues sont qualitativement similaires, mais avec des différences significatives dans l'abondance des composés majeurs. Les huiles essentielles de *P. Scoparius* sont non toxiques et présentent une activité anti-inflammatoire importante et une faible activité antibactérienne. La méthode d'extraction a affecté de manière significative les activités anti-inflammatoires et antibactériennes. Dans cette étude, nous nous sommes aussi concentrés sur l'activité analgésique de *P. Scoparius*. Nos résultats ont montré que la décoction de cette plante souvent utilisée dans le sud avait un excellent effet analgésique. Ces données pharmacologiques montrent la place que pourrait occuper cette plante dans la consolidation de notre santé, en particulier dans la prise en charge de l'inflammation et la douleur.

Les huiles essentielles de *P. Cablin* ont montré une forte prédominance de sesquiterpènes oxygénés pour toutes les méthodes utilisées suivis par les sesquiterpènes hydrocarbonés, contrairement aux monoterpènes hydrocarbonés

et oxygénés qui étaient relativement en minorité par rapport aux sesquiterpène oxygénés

Plusieurs facteurs dont le moment de la récolte de la plante aromatique, les conditions climatiques et agronomiques, le développement végétatif de la plante, la partie végétale utilisée, le type d'extraction utilisé peuvent être considérés comme responsables des fluctuations de leurs compositions chimiques. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'étudier l'influence des méthodes d'extractions, de la période et région de récolte et des solvants utilisés sur les compositions des extraits volatiles et non volatiles ainsi que leurs activités biologiques. Il est très important de continuer cette recherche afin de trouver une corrélation entre les techniques d'extraction, période, zone de la collecte et leurs effets sur la composition chimique et les activités biologiques. En outre, cette thèse vise à attirer l'attention de la communauté scientifique sur le large éventail d'applications des huiles essentielles et des extraits. Ils peuvent fournir pour développer de nouveaux médicaments à partir de produits naturels. Ainsi, les huiles essentielles et leurs constituants peuvent, espérons-le, être pris en compte à l'avenir pour davantage d'évaluations cliniques et d'éventuelles applications.

Les résultats obtenus sur *P. Scoparius* sont encourageants mais beaucoup reste à faire en Algérie pour développer cette filière vue la diversité de la flore.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ekor, M., The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology* **2014**, *4*, 177.
2. Firenzuoli, F.; Gori, L., Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evid Based Complement Alternat Med* **2007**, *4*, 37-40.
3. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. L., Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol* **2012**, *3*, 12.
4. *européenne, 7e édition. strasbourg : conseil de l'europe* 2010.
5. Tisserand, R.; Young, R., Essential Oil Safety. *A Guide for Health Care Professionals* **2014**, 5-22.
6. LuisRíos, J., Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Chapter 1 - Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. *Academic press* **2016**, 3-10.
7. Meyer-Warnod, B., Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer & Flavorist* **1984**, *9*, 93-104.
8. J., C., Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, **1928**, *17*, 345-349.
9. Rai, R.; Suresh, B., *Indian Journal of Traditional Knowledge* **2004**, *3*.
10. Vian, M. A.; Fernandez, X.; Visinoni, F.; Chemat, F., Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *J Chromatogr A* **2008**, *1190*, 14-7.
11. Sankarikutty, B.; Narayanan, C. S., *Essential oil : Isolation and Production*. 2 ed.; Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition 2003.
12. Ganzler, K.; Salgo, A.; Valko, K., Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *J Chromatogr* **1986**, *371*, 299-306.
13. Lane, D.; Jenkins, S. W. D., Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. . *Jenkins, Chemical Characterisation Carcinogenic 9th International Symposium* **1986**, 437-449.
14. Bousbia, N.; Vian, M. A.; Ferhat, M. A.; Petitcolas, E.; Meklati, B. Y.; Chemat, F., Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 355-362.
15. Paré, J., Microwave assisted process for extraction and apparatus therefore. CA patent, 2. **1992**.
16. Mengal, P.; Mompon, B., Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. *Brevet Européen, EP, B1* **1996**.
17. Chemat, F.; Lucchesi, M.; Smadia, J., Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. *Google Patents* **2004**.
18. Chemat, F.; Vian, M.; Visioni, F., Microwave hydrodiffusion for isolation of natural products. *European Patent EP* **2008**, *1*, 749.
19. Arnould-Taylor, W. E., *Aromatherapy for the Whole Person*. UK: Stanley Thornes, 1981; p 22-26.
20. Belliardo, F.; Bicchi, C.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B., Headspace-solid-phase microextraction in the analysis of the volatile fraction of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatographic Science* **2006**, *44*, 416-429.
21. Paolini, J.; Nasica, E.; Desjobert, J.; Muselli, A.; Bernardini, A.; Costa, J., Essential oil composition and volatile constituents of *Adenostyles briquetii* Gamisans (syn. *Cacalia briquetii*). *Phytochemical analysis* **2008**, 266-276.

22. Benyelles, B.; Allali, H.; Dib, M. E. A.; Djabou, N.; Tabti, B.; Costa, J., Essential oil from *Rhaponticum acaule* L. roots: comparative study using HS-SPME/GC/GC–MS and hydrodistillation techniques. *Journal of Saudi Chemical Society* **2014**, *18*, 972–976.
23. Burt, S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *international journal of food microbiology* **2004**, *94*, 223-253.
24. Périno-Issartier, S.; Ginies, C.; Cravotto, G.; Chemat, F., A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1305*, 41-47.
25. Herzi, N.; Bouajila, J.; Camy, S.; Romdhane, M.; Condoret, J. S., Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food Chem* **2013**, *141*, 3537-45.
26. Okoh O.O.; Sadimenko A. P.; Afolayan A. J., Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry* **2010**, *120*, 308-312.
27. Hebbache, Z. Y.; Foudil-Cherif, Y.; Mohammedi, H.; Belfadel, O.; Fodili, M., Comparison of different extraction methods for the determination of *Pituranthos Scoparius* essential oils : Chemical composition, antimicrobial and antiinflammatory activities *Carpathian Journal of Food Science and Technology* **2021**, *13*, 158-172.
28. Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto, E.; Cordero, C.; Bicchi, C., Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour Fragrance journal* **2010**, *25*, 282-290.
29. Adams, R. P., *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th ed.; Allured Pub. Corp.: Carol Stream, Ill., 2007; p viii, 804 p.
30. Moghaddam, M.; Mehdizadeh, L., Chapter 13 : Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. *Soft Chemistry and Food Fermentation, Handbook of Food Bioengineering* **2017**, 379-419.
31. Radulović, N., Toxic effects of essential oils and their constituents. *Food and Chemical Toxicology* **2020**.
32. Juliano, C.; Mattana, A.; Usai, M., Composition and in vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus herba-barona* Loisel Growing Wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* **2000**, *12*, 516-522.
33. Burt, S. A.; Reinders, R. D., Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in applied microbiology* **2003**, *36*, 162-167.
34. Yadav, R. K. P.; Papatheodorou, E. M.; Karamanoli, K.; Constantinidou, H. I. A.; Vokou, D., Abundance and diversity of the phyllosphere bacterial communities of Mediterranean perennial plants that differ in leaf chemistry. *Chemoecology* **2008**, *18*, 217-226.
35. Derwich, E.; Benziane, Z.; Boukir, A., GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **2010**, *6*, 191-198.
36. Tassou, C. C.; Koutsoumanis, K.; Nychas, G. J. E., Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* on nutrient both by mint essential oil. *Food Research International* **2000**, *48*, 273-280.
37. Denyer, S. P.; Hugo, W. B., Mechanisms of antibacterial action—a summary. In: Denyer SP, Hugo WB, editors. Mechanisms of action of chemical biocides. *Oxford: Blackwell Scientific Publications* **1991**, 331-334.

38. Amorati, R.; C Foti, M.; Valgimigli, L., Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 10835–10847.
39. Salud Pérez, G.; Miguel Zavala, S.; Lucina Arias, G.; Miguel Ramos, L., Anti-inflammatory Activity of Some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research* **2011**, *23*, 38-44.
40. Moran, A.; Martin, M. L.; Montero, M. J.; Ortiz de Urbina, A. V.; Sevilla, M. A.; San Roman, L., Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Artemisia caerulescens* subsp. *gallica*. *J Ethnopharmacol* **1989**, *27*, 307-17.
41. Sayyah, M.; Saroukhani, G.; Peirovi, A.; Kamalinejad, M., Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytother Res* **2003**, *17*, 733-6.
42. Mishra, D.; Bisht, G.; Mazumdar, P. M.; Sah, S. P., Chemical composition and analgesic activity of *Senecio rufinervis* essential oil. *Pharm Biol* **2010**, *48*, 1297-301.
43. Chen, Y.; Zhao, Y. Y.; Wang, X. Y.; Liu, J. T.; Huang, L. Q.; Peng, C. S., [GC-MS analysis and analgesic activity of essential oil from fresh rhizoma of *Cyperus rotundus*]. *Zhong Yao Cai* **2011**, *34*, 1225-9.
44. de Cassia da Silveira, E. S. R.; Lima, T. C.; da Nobrega, F. R.; de Brito, A. E. M.; de Sousa, D. P., Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*.
45. Mancianti, F.; Ebani, V. V., Biological Activity of Essential Oils. *Molecules* **2020**, *25*.
46. Alu'datt, M. H.; Rababah, T.; Alhamad, M. N.; Al-Mahasneh, M. A.; Almajwal, A.; Gammoh, S.; Ereifej, K.; Johargy, A.; Alli, I., A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chem* **2017**, *218*, 99-106.
47. Xu, C. C.; Wang, B.; Pu, Y. Q.; Tao, J. S.; Zhang, T., Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin J Nat Med* **2017**, *15*, 721-731.
48. Khoddami, A.; Wilkes, M. A.; Roberts, T. H., Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **2013**, *18*, 2328-75.
49. Lapornik, B.; Prošek, M.; Wondra, A. G., Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **2005**, *71*, 214-222.
50. Naczk, M.; Shahidi, F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* **2006**, *41*, 1523-42.
51. Jin, D.; Mumper, R. J., Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*, 731-7352.
52. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* **1999**, *299*, 152-178.
53. Hagerman, A. E.; Butler, L. G., Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology* **1989**, *15*, 1795-810.
54. Caridi, D.; Trenerry, V. C.; Rochfort, S.; Duong, S.; Laughler, D.; Jones, R., Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* **2007**, *105*, 691-699.
55. Avello, M. A.; Pastene, E. R.; Bustos, E. D.; Bittner, M. L.; Becerra, J. A., Variation in phenolic compounds of *ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. *The Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2013**, *23*, 44-50.

56. Singh, B.; Singh, J. P.; Kaur, A.; Singh, N., Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Res Int* **2017**, *101*, 1-16.
57. Shi, B. B.; Zhang, W. N.; Li, X.; Pan, X. J., Seasonal variations of phenolic profiles and antioxidant activity of walnut (*Juglans sigillata* Dode) green husks. *International Journal of Food Properties* **2018**, *20*, S2635-S2646.
58. Xie, G. F.; Xu, X. Y.; Zhou, X. L.; Liu, Y. L.; Zhao, Z. B., Changes in phenolic profiles and antioxidant activity in rabbiteye blueberries during ripening. *International Journal of Food Properties* **2019**, *22*, 320-329.
59. Ortega-Ramirez, L. A.; Rodriguez-Garcia, I.; Leyva, J. M.; Cruz-Valenzuela, M. R.; Silva-Espinoza, B. A.; Gonzalez-Aguilar, G.; Siddiqui, W.; Ayala-Zavala, J. F., Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. *Journal of Food Science* **2014**, *79*, R129–R137.
60. Daglia, M., Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* **2012**, *23*, 174-181.
61. Ozcan, T.; Akpinar-Bayazit, A.; Yilmaz-Ersan, L.; Delikanli, B., Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* **2014**, *5*, 393-396.
62. Sehwal, S.; Das, M., Antioxidant Activity: An Overview. *Research & Reviews: Journal of Food Science & Technology* **2013**, *2*, 1-11.
63. Miguel, M. G., Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal* **2010**, *25*, 291-312.
64. Miguel, M. G., Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* **2010**, *15*, 9252-9287.
65. Joshi, S. C.; Verma, A. R.; Mathela, C. S., Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Journal of Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 37-40.
66. CLSI, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. CLSI document M44-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2004.
67. Jorgensen, J. H.; Ferraro, M. J., Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases* **2009**, *49*, 1749–1755.
68. Hausdorfer, J.; Sompek, E.; Allerberger, F.; Dierich, M. P.; Rusch-Gerdes, S., E-test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* **1998**, *2*, 751-5.
69. Valgas, C.; De Souza, S. M.; Smânia, E. F. A.; Smânia, A. J., Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* **2007**, *38*, 369–380.
70. Pfaller, M. A.; Sheehan, D. J.; Rex, J. H., Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microbiol Rev* **2004**, *17*, 268-80.
71. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K., Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2016**, *6*, 71-79.
72. Larsen, G. L.; Henson, P. M., Mediators of inflammation. *Annual Review of Immunology* **1983**, *1*, 335-359.
73. Santangelo, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Di Benedetto, R.; Filesi, C.; Masella, R., Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali-istituto Superiore di Sanita* **2007**, *43*, 394.
74. Beirith, A.; Santos, A. R.; Calixto, J. B., Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research* **2002**, *924*, 219-228.

75. Salvemini, D.; Wang, Z. Q.; Wyatt, P. S.; Bourdon, D. M.; Marino, M. H.; Manning, P. T.; Currie, M. G., Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* **1996**, *118*, 829-38.
76. Sdayria, J.; Rjeibi, I.; Feriani, A.; Ncib, S.; Bouguerra, W.; Hfaiedh, N.; Elfeki, A.; Allagui, M. S., Chemical Composition and Antioxidant, Analgesic, and Anti-Inflammatory Effects of Methanolic Extract of *Euphorbia retusa* in Mice. *Pain Res Manag* **2018**, *2018*, 4838413.
77. Levy, L., Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sciences* **1969**, *8*, 601-606.
78. Januario, J. P.; de Souza, T. B.; Lavorato, S. N.; S., M. T. C.; Domingos, O. S.; Baldim, J. L., Design and synthesis of new benzophenone derivatives with in vivo anti-inflammatory activity through dual inhibition of edema and neutrophil recruitment. *Molecules* **2018**, *23*, pii: E1859.
79. Moreno-Quiros, C. V.; Sanchez-Medina, A.; Vazquez-Hernandez, M.; Hernandez Reyes, A. G.; Garcia-Rodriguez, R. V., Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Ternstroemia sylvatica* Schltdl. & Cham. *Asian Pac J Trop Med* **2017**, *10*, 1047-1053.
80. Quézel, P.; Santa, S., *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Éditions du Centre national de la recherche scientifique: Paris,, 1962; p v.
81. Ozenda, P., *Flore et végétation du Sahara*. 3e éd. mise à jour et augm. ed.; Editions du Centre national de la recherche scientifique: Paris, 1991; p 662 p.
82. Karbab, A.; Mokhnache, K.; Ouhida, S.; Charef, N.; Djabi, F.; Arrar, L.; Mubarak, M. S., Anti-inflammatory, analgesic activity, and toxicity of *Pituranthos scoparius* stem extract: An ethnopharmacological study in rat and mouse models. *J Ethnopharmacol* **2020**, *258*, 112936.
83. Benmekhbi, L.; Kabouche, A.; Kabouche, Z.; Ait-Kaki, B.; Touzani, R.; C. Bruneau, C., Five glycosylated flavonoids from the antibacterial butanolic extract of *Pituranthos scoparius*. *Chemistry of Natural Compounds* **2008**, *44*, 639-641.
84. Adida, H.; Benariba, N.; Benariba, N.; Bechiri, A.; Chekroun, E.; Djaziri, R., Phytochemical study and evaluation of the antiradical activity of extracts of *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie* **2015**, *14*, 207-212.
85. Chikhoun, A.; Damjan Pavleca, J.; Shashkov, M.; Berroua, Z.; Chebbi, K.; Bougherra, H.; Zeroual, B.; Aliane, K.; Gagaoua, M.; Boudjellal, A.; Vovk, A.; Križman, M., Antioxidant effect induced by the essential oil of *Pituranthos scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion. *Journal of Food Processing and Preservation* **2017**, *41*, 1-12.
86. Boudjelal, A.; Henchiri, C.; Sari, M.; Sarri, D.; Hendel, N.; Benkhaled, A.; Ruberto, G., Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): an ethnopharmacology survey. *J Ethnopharmacol* **2013**, *148*, 395-402.
87. Attia, S.; Grissa, K. L.; Lognay, G.; Heuskin, S.; Mailleux, A. C.; Hance, T., Chemical composition and acaricidal properties of *Deverra scoparia* essential oil (Araliales: Apiaceae) and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* **2011**, *104*, 1220-8.
88. Lograda, T.; Ramdani, M.; Kiram, A.; Chalard, P.; Figueredo, G., Variation of essential oils composition of *Pituranthos Scoparius* in Algeria. *Global journal of research on medicinal plants and indigenous medicine* **2013**, *2*, 1-9.
89. Vernin, G.; Ghiglione, C.; Mostafa, D.; Parkanyi, C., GC/MS Analysis of volatile constituents of essential oils of *Pituranthos Scoparius*. *Journal of essential oil research* **1999**, *11*, 673-676.
90. Gourine, N.; Merrad, B.; Yousfi, M.; Stocker, P.; Gaydou, E. M., Chemical composition of the essential oil of *Pituranthos scoparius*. *Nat Prod Commun* **2011**, *6*, 1151-4.

91. Vérité, P.; Nacer, A., Composition of seeds and stems and essential oils of Pituranthos Scoparius (Coss. & Dur.). *Schinz. Flavour and Fragrance Journal* **2003**, *19*, 562-564.
92. Smaili, T.; Zellagui, A.; Gherraf, N.; Flamini, G.; Cioni, P. L., Essential oil content of the flowers of Pituranthos Scoparius in Algeria Medicinal plant. *International Journal of Phytomedicines and Related Industries* **2011**, *3*, 177-179.
93. Malti, C. E. W.; Boussaid, M.; Belyagoubi, L.; Paoli, M.; Gibernau, M.; Tomi, F.; Atik Bekkara, F.; Bekhechi, C., Chemical Variability of the Essential Oil of Pituranthos scoparius from Algeria. *Chem Biodivers* **2018**, *15*, e1800149.
94. Ksouri, A.; Dob, T.; Belkebir, A.; Dahmane, D.; Nouasri, A., Volatile compounds and biological activities of aerial parts of Pituranthos Scoparius (Coss and Dur) Schinz (Apiaceae) from Hoggar, southern Algeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **2017**, *16*, 51-58.
95. Hammoudi R.; Dehak K.; Hadj Mahammed M.; M., D. O., Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de Deverra Scoparia Coss. & Dur. (Apiaceae). *Lebanese Science Journal* **2015**, *16*, 27-36.
96. Belgacem, D.; Kalla, A.; Rouabhi, R.; Amara, D., Effect of Pituranthos Scoparius essential oils on reducing metganogenesis in cheep: in vitro Study. *Environmental Science and Indian Journal* **2016**, *12*, 118-126.
97. Malti, C. E. W.; Boussaid, M.; El haci, I. A.; Tomi, P.; Tomi, F.; Bekhchi, C., Biological activities of Pituranthos scoparius essential oil from Algeria. *Journal of Natural Product Research and Application* **2021**, *1*, 1-14.
98. Boutaghane, N.; Nacer, A.; Kabouche, Z.; Ait-kaki, B., Comparative antibacterial activities of the essential Oils of stems and seeds of Pituranthos scoparius From algerian septentrional sahara. *Chemistry of Natural Compounds* **2004**, *40*, 606-607.
99. Karbab, A.; Charef, N.; Arrar, L., Phenolic contents, In Vitro antioxidant, and In Vivo anti-inflammatory studies of aqueous extract from Pituranthos scoparius (Coss. & Dur.) growing in Algeria. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* **2019**, *17*, 1-7.
100. Kumar, A.; Gauniyal, A. K.; Virmani, O. P., Cultivation of Pogostemon cablin for its oil. *Current research on medicinal and aromatic plants* **1986**, *8*, 79-86.
101. Angadi, S. P.; Vasanthakumar, T., *Patchouli. In Advances in Horticulture: Medicinal and Aromatic Plants; Chadha. Malhotra Publishing House: New Delhi, India, 1995.*
102. Guo, J.; Yuan, Y.; Liu, Z.; Zhu, J., Development and structure of internal glands and external glandular trichomes in Pogostemon cablin. *PLoS One* **2013**, *8*, e77862.
103. Chakrapani, P.; Venkatesh, K.; Singh, B. C. S.; Jyothi, B. A.; Kumar, P.; Amareshwari, P.; Roja, A. R., Phytochemical, pharmacological importance of Patchouli (Pogostemon cablin (Blanco) Benth) an aromatic medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2013**, *21*, 7-15.
104. A. A. Farooqui; B. S. Sreeramu, Cultivation of Medicinal and Aromatic Crops. *Universities Press (India) Ltd., Hyderabad* **2001**, 424.
105. V. Shankaranarayan, Patchouli constituents and its usage in perfumery. *Indian Perfumer* **2002**, *46*, 313-314.
106. A. Y. Leung, Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics. *John Wiley and Sons, Inc.* **1980**, 261.
107. Ramya, H. G.; Palanimuthu, V., patchouli spent charge in special reference to its use in incense sticks production. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal* **2013**, *15*, 154-158.
108. Kumara Swamy, M.; Sinniah, U. M., A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Pogostemon cablin Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. *molecules* **2015**, *20*.

109. Teris van Beek, A.; Joulain, D., The essential oil of patchouli, *Pogostemon cablin*: A review. *Flavour and Fragrance Journal* **2017**, 1-46.
110. Li, W.; Wei, G.; Pan, C. M.; Liu, X. X.; Huang, S.; Xiu, H. H., [Investigation on the influential factors of the volatile oil and main constituent content in *Pogostemon cablin*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2004**, 29, 28-31.
111. Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H., *Preparation, Properties and Used Common Fragrance and Flavour Materials*. Weinheim, Germany, 1997.
112. Donelian, A.; Carlson, L. H. C.; Lopes, T. J.; Machado, R. A. F., Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, 48, 15–20.
113. Ramya, H. G.; Palanimuthu, V.; Rachna, S., An introduction to Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.)—A medicinal and aromatic plant: It's importance to mankind. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal* **2013**, 15, 243-250.
114. Ramya, H. G.; Palanimuthu, V.; Rachna, S., An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) a medicinal and aromatic plant: it's importance to mankind. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal* **2013**, 15, 243–250.
115. Shah, K. A.; Bhatt, D. R.; Desai, M. A.; Jadeja, G. C.; Parikh, J. K., Extraction of essential oil from patchouli leaves using hydrodistillation: parametric studies and optimization. *Indian Journal of Chemical Technology* **2017**, 24, 405-410.
116. Kusuma, H. S.; Altway, A.; Mahfud, M., The application of face-centered central composite design for the optimization of patchouli oil extraction from *Pogostemon cablin* Benth dried leaves using microwave hydrodistillation method. *Journal of Chemical Technology Metallurgy* **2019**, 54, 787-792.
117. Donelian, A.; Carlson, L. H. C.; Lopes, T. J.; Machado, R. A. F., Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *Journal of Supercritical Fluids* **2009**, 48, 15-20.
118. Donelian, A.; De Oliveira, P. F.; Rodrigues, A. E.; Mata, V. G.; Machado, R. A. F., Performance of reverse osmosis and nanofiltration membranes in the fractionation and retention of patchouli essential oil. *Journal of Supercritical Fluids* **2016**, 107, 639–648.
119. Hamidi, N., Extraction of essential oils from patchouli plant using advanced techniques of microwave assisted hydrodistillation. *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences* **2016**, 11, 796-799.
120. Kusuma, H. S.; Altway, A.; Mahfud, M., A preliminary study of patchouli oil extraction by microwave air-hydrodistillation method. *Korean Chemical Engineering Research* **2017**, 55, 510–513.
121. Purti, D. K. Y.; Kusuma, H. S.; Syahputra, M. E.; Parasandi, D.; Mahfud, M., The extraction of essential oil from patchouli leaves (*Pogostemon cablin* Benth) using microwave hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods. *Earth and Environmental Science* **2017**, 101.
122. Fitri, N.; Yandi, N.; Julianto, T. S., A comparative study of water-steam distillation with water-bubble distillation techniques to increase the quality of patchouli essential oil. *American Institute of Physics* **2017**, 1823.
123. Galovicová, L.; Borotová, P.; Valková, V.; Dúranová, H.; Štefániková, J.; Vukovic, N. L.; Vukic, M.; Kacániová, M., Biological Activity of *Pogostemon cablin* Essential Oil and Its Potential Use for Food Preservation. *Agronomy* **2022**, 12, 2-20.
124. Das, P.; Dutta, S.; Begum, J.; Anwar, M. N., Antibacterial and Antifungal Activity Analysis of Essential Oil of *Pogostemon cablin*. *Bangladesh Journal of Microbiology* **2013**, 30, 7-10.
125. *Council of Europe, Pharmacopée Européenne*. 7 ed.; Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe: Strasbourg, France, 2010.

126. Beoletto, V. G.; De las Mercedes Oliva, M., Marioli, J. M., ; Carezzano, M. E.; Demo, M. S., Antimicrobial Natural Products Against Bacterial Biofilms. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches, Antibiotic resistance 2016; pp 291–307.
127. Pushpangadan, P.; George, V., *Handbook of herbs and spices*. 2nd ed.2012.
128. Singleton V. L.; Orthofer R.; Lamuela-Raventós R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology*. Elsevier **1999**, 152-178.
129. Menaceur F.; Benchabane A.; Hazzit M.; Baaliouamer A., Chemical composition and antioxidant activity of Algerian Juniperus phoenicea L. extracts. *Journal of Biologically Active Products from Nature* **2013**, 3, 87-69.
130. Brand-Williams W, C. M.-E., Berset C. , Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology* **1995**, 28, 25-30.
131. Y. Pan; K. Wang; S. Huang; H. Wang; X. Mu, C.; He, X. J.; J. Zhang; F. Huang, Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (Dimocarpus Longan Lour.) peel. *Food Chemistry* **200**, 106, 1264-1270.
132. *National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997.*
133. Hodge, H. C.; Sterner, J. H., Determination of substance acute toxicity by LD50. *American Industrial Hygiene Association Journal* **1943**, 9, 93-96.
134. Vogel H. G.; Vogel W. H., *Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assays. Berlin, Germany: Springer. 1997.*
135. Lucchesi, M. E.; Chemat, F.; Smadja, J., Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J Chromatogr A* **2004**, 1043, 323-7.
136. Elyemni, M.; Louaste, B.; Nechad, I.; Elkamli, T.; Bouia, A.; Taleb, M.; Chaouch, M.; Eloutassi, N., Extraction of Essential Oils of Rosmarinus officinalis L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *ScientificWorldJournal* **2019**, 2019, 3659432.
137. Karakaya, S.; El, S. N.; Karagozlu, N.; Sahin, S.; Sumnu, G.; Bayramoglu, B., Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary. *J Food Sci Technol* **2014**, 51, 1056-65.
138. Moradi, S.; Fazlali, A.; Hamed, H., Microwave-Assisted Hydro-Distillation of Essential Oil from Rosemary: Comparison with Traditional Distillation. *Avicenna J Med Biotechnol* **2018**, 10, 22-28.
139. Lo Presti M.; Ragusa S.; Trozzi, A.; Dugo P.; Visinoni F.; Fazio A.; Dugo G.; Mondello L., A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil. *Journal of Separation Science*. **2005**, 28, 273-280.
140. Wang, Z.; Ding, L.; Li, T.; Zhou, X.; Wang, L.; Zhang, H.; Liu, L.; Li, Y.; Liu, Z.; Wang, H.; Zeng, H.; He, H., Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried Cuminum cyminum L. and Zanthoxylum bungeanum Maxim. *J Chromatogr A* **2006**, 1102, 11-7.
141. Mohammedi H.; Mecherara-Idjeri S.; Foudil-Cherif Y.; Hassani H., Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian daucus carota L. subsp. carota aerial parts. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* **2015**, 18, 873-883.
142. Mohammedi H.; Mecherara-Idjeri S.; Hassani H., Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of Ruta montana L. collected from different geographical regions in Algeria. *Journal of essential oil research* **2016**, 32, 88-101.

143. Ferreira R. G. C.; Monteiro M. C.; Da Silva J. K. R.; Maia J. G. S., Antifungal Action of the Dillapiole-rich Oil of *Piper aduncum* against Dermatomycoses Caused by Filamentous Fungi. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research* **2016**, *15*, 1-10.
144. Eftekhari, F.; Yousefzadi, M.; Azizian, D.; Sonboli, A.; Salehi, P., Essential oil composition and antimicrobial activity of *Diplotaenia damavandica*. *Z Naturforsch C J Biosci* **2005**, *60*, 821-5.
145. Kiram, A.; Ramdani, M.; Zerai, A., Etude Phytochimique et de L'activité Antimicrobienne des Huiles Essentielles de *Pituranthos Scoparius* de la Region de Biskra (Sud-Est Algérien). *Tunisian Journal of Medecinal Plants and Natural Products* **2013**, *10*, 1-6.
146. Dhouioui M.; Boulila A.; Chaabane H.; Saïd Zina M.; Casabianca, H., Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L. ssp. *paucinervis* Batt. (Aristolochiaceae) roots and its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products* **2016**, *83*, 301-306.
147. Bourkhiss M.; Ouhssine M.; Hnach M., S. B.; A., F., Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bulletin of the Bordeaux Pharmacy Society* **2007**, *146*, 75-84.
148. Abi-Ayada F. Z.; Abi Ayad M.; A., L. H.; Rebiahi, S.; Bessiere A., Antibacterial Activity of Essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master from Algeria flora. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* **2011**, *1*, 1-6.
149. Amarti F.; Satrani, B.; M., G.; Farah A.; Aafi A.; Aarab L.; El Ajjouri M.; Chaouch A., Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment / Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2010**, *14*, 141-148.
150. Couliadiati, T. H.; Millogo-Kone, H.; Lamien-Meda, A.; Lamien, C. E.; Lompo, M.; Kiendrebeogo, M.; Bakasso, S.; Yougbare-Ziebrou, M.; Millogo-Rasolodimby, J.; Nacoulma, O. G., Antioxidant and antibacterial activities of *Combretum niroense* Aubrev. ex Keay (Combretaceae). *Pak J Biol Sci* **2009**, *12*, 264-9.
151. Hammiche V.; Maiza K., Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol* **2006**, *105*, 358-67.
152. Brownlee G., Effect of deoxycortone and ascorbic acid on formaldehyde induced arthritis in normal and adrenalectomised rats. *The Lancet* **1950**, *268*, 157-159.
153. Shojaii A.; Motaghinejad M.; Norouzi S.; Motevalian M., Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of the Extract and Fractions of *Astragalus hamosus* in Animal Models. *Iran J Pharm Res* **2015**, *14*, 263-9.
154. Daryono, E. D.; Hudha, M. I., Determinating patchouli alcohol of patchouli oil using distillation technique. *International Journal of ChemTech Research* **2016**, *9*, 7-16.
155. Preeti, L. B.; Sanjaykumar, R.; Patel Meghal, A., Patchouli oil: an overview on extraction method, composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research* **2021**, 1-11.
156. Mahanta, J. J.; Chutia, M.; Sarma, T. C., Study on weed flora and their influence on patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) oil and patchoulol. *Journal of Plant Sciences* **2007**, *2*, 96-101.
157. Murugan, R.; Mallavarapu, G. R.; Padmashree, K. V.; Rao, R. R.; Livingstone, C., Volatile oil composition of *Pogostemon heyneanus* and comparison of its composition with patchouli oil. *Nat Prod Commun* **2010**, *5*, 1961-4.
158. Kusuma, H. S.; Mahfud, M., GC-MS analysis of essential oil of *Pogostemon cablin* growing in Indonesia extracted by microwave-assisted hydrodistillation. *International Food Research Journal* **2016**, *24*, 1525-1528.

159. Kusuma, H. S.; Mahfud, M., Microwave-assisted Hydrodistillation for Extraction of Essential Oil from Patchouli (*Pogostemon cablin*) Leaves. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* **2017**, *61*, 82-92.
160. Ozcan, M.; Erkmen, O., Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology* **2001**, *212*, 658-660.
161. Yanga, X.; Zhang, X.; Yanga, S. P.; Liu, W. Q., Original Article Evaluation of the Antibacterial Activity of Patchouli Oil. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2013**, *12*, 307-316.
162. Okoh, O. O.; Sadimenko, A. P.; J., A. A., Antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydro-distillation and solvent free microwave extraction. *African Journal of Biotechnology* **2011**, *10*, 4207.
163. Bhanuz, D.; Pimnapa, R.; Sukrita, P.; Khwanchanok, M.; Jitpisute, C., Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *Journal of Botany* **2017**, *2*, 1-6.
164. Pullagummi, C.; Rao, N. B.; Singh, B. C. S.; J., B.; Kumar, P.; Venkatesh, K.; Rani, A. R., Comparative studies on antibacterial activity of Patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth] and Geranium (*Pelargonium graveolens*) aromatic medicinal. *African Journal of Biotechnology* **2014**, *13*, 2379-2384.
165. Cowan, M. M., Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 564-582.
166. Kuete, V., *Medicinal plant research in Africa : pharmacology and chemistry*. First edition. ed.; Elsevier: Amsterdam ; Boston, 2013; p xxv, 890 pages.
167. Dzatam, J. K.; Touani, F. K.; Kuete, V., Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. *BMC Complement Altern Med* **2016**, *16*, 9.
168. Kulevanova, S.; Risti'c, M.; Stafilov, T.; Dorevski, K.; Ristov, T., Essential oil analysis of some taxa of genera *Thymus* L.-environment influences. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia* **1996**, *15*, 33-38.
169. Lohani, H.; Andola, H. C.; Chauhan, N.; Bhandari, U. J., Variations of Essential oil composition of *Acorus calamus*: From Uttarakhand Himalaya. *Journal of Pharmacy Research* **2012**, *5*, 1246-1247.
170. Ebrahimi, S. N.; Hadian, J.; Mirjalili, M. H.; Sonboli, A.; Yousefzadi, M., Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry* **2008**, *110*, 927-931.
171. Smaili, T.; Zellagui, A.; Gherraf, N.; Flamini, G.; Cioni, P. L., Teneur en huile essentielle des fleurs de *Pituranthos scoparius* en Algérie. *Plantes médicinales - Revue internationale des phytomédicaments et des industries connexes* **2011**, *3*, 177-179.
172. Satue-Gracia, M. T.; Heinonen, M.; Frankel, E. N., Antioxidant activity of anthocyanin in LDL and lecithin liposome systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 3362-3367.
173. Singleton, V. L.; Rossi, J. A., Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, 144-158.
174. Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G., Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **1997**, *2*, 152-159.
175. Zlatic, N.; Jakovljevic, D.; Stankovic, M., Temporal, Plant Part, and Interpopulation Variability of Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of *Inula helenium* L. *Plants (Basel)* **2019**, *8*.

176. Saeed, N.; Khan, M. R.; Shabbir, M., Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med* **2012**, *12*, 221.
177. Athamena, S.; Chalghem, I.; Kassah-Laouar, A.; Laroui, S.; Khebri, S., Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal* **2010**, *11*, 69-81.
178. Rojo, L. E.; Benites, J.; López, J., Antioxidant capacity and polyphenolic content of twelve traditionally used herbal medicinal infusions from the South American Andes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* **2009**, *8*, 498–508.
179. Sun, T.; Powers, J.; Tang, J., Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry* **2007**, *105*, 101-106.
180. Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D., Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* **2001**, *72*, 145-171.



COMPARISON OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS FOR THE DETERMINATION OF *PITURANTHOS SCOPARIUS* ESSENTIAL OILS: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES

Zahida Yasmina Hebbache^{1✉}, Foudil-Cherif Yazid², Hichem Mohammedi², Ouahiba Belfadel², Fodili Mokhtar¹

¹Laboratory of Organic Chemistry and Natural Substances, University Ziane Achour, City 05 July Road of Moudjbara, BP 3117, Djelfa, Algeria.

²Laboratory of Functional Organic Analysis, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Sciences and Technology Houari Boumediene (USTHB), El Alia, BP 32, Bab Ezzouar, Algeria.

✉hebbachezahidayasmina@gmail.com

<https://doi.org/10.34302/crpjfst/2021.13.3.13>

Article history:

Received:

15 June 2021

Accepted:

12 August 2021

Keywords:

Pituranthos Scoparius;
Hydrodistillation, Microwave;
assisted extraction;
Steam distillation;
Anti-inflammatory activity;
Antimicrobial activity.

ABSTRACT

The essential oils of *Pituranthos Scoparius* obtained by hydrodistillation (HD), microwave assisted extraction (MAE) and steam distillation (SD) were investigated for their chemical components, oil yield diversity and microbial activity. As a result of this investigation, the anti-inflammatory activity of the essential oils is reported here for the first time. The essential oils extracted from *P. Scoparius* were analyzed by GC/MS. Sixty-three compounds were identified, representing (87.69 %) in HD, (82.45 %) in MAE, and (88.94 %) in SD of the essential oils' total compositions. The predominant compounds identified were Dillapiol (16.38-37.21%), α -Pinene (0.48-10.84%) and Myristicin (4.21-9.37%). The antimicrobial activity of the essential oils was Identified using the disk diffusion method against seven bacteria strains and two yeasts. An appreciable antimicrobial activity was observed against *sarcina lutea*, and weak activity was observed against *staphylococcus epidermidis*, *saccharomyces cerevisiae* and *candida albicans*. The anti-inflammatory activity of the essential oils was Identified using the carrageenan induced edema method. The essential oils extracted by HD, MEA and SD showed an anti-inflammatory activity comparable to Diclofenac. The results reveal that the method of extraction of *P. scoparius* influences the chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils.

1. Introduction

The genus *Pituranthos* is a member of the Apiaceae family and consists of more than 20 species (Ozenda, 2004). *P. Scoparius* (Coss & Dur) Benth & Hook is a plant endemic to the Saharan region of North Africa (Quezel and Santa, 1962) known as "Tattayet" in Tamahaq (Tuareg language) and "Guezzah" in Arabic.

P. Scoparius is a perennial aphyllous plant. The stems are 40-80 cm tall. The flowers, often with peduncle, white petals and marrow veins,

are bunched in lateral umbels that are fairly spread out. However, due to the high temperature of the Central Sahara from which the plants used in this experiment were obtained, the species used did not contain leaves, flowers, or seeds (Quezel and Santa, 1962). *P. Scoparius* is used in traditional Algerian medicine for many purposes. In infusion, the aerial part is used as a remedy for digestive difficulties, diabetes, hepatitis, asthma and rheumatic diseases (Ould el hadj *et al.*, 2003; (Hammiche

and Maiza, 2006) and also as an additive flavoring (Boukef, 1986; Benchelah et al, 2000). The powdered stems are used against reptile bites (Benchelah et al., 2000; Abdellah and Sahki, 2004).

Previous research has shown that *P. Scoparius* is an important source of essential oils, with a considerable variation in major compounds depending on the part used, the plant maturity, the climate conditions and the extraction methods employed (Vernin *et al.*, 1999; Vérité and Nacer, 2003; Smaili *et al.*, 2011; Gourine *et al.*, 2011; Lograda *et al.*, 2013; Hammoudi *et al.*, 2015; Belkacemi *et al.*, 2015; Chikhouné *et al.*, 2016; Ksouri *et al.*, 2017; Malti *et al.*, 2018, Attia *et al.*, 2011). In addition, Sabinene and α -pinene were identified as major compounds of most of *P. Scoparius* essential oils (Smaili *et al.*, 2011; Lograda *et al.*, 2013; Chikhouné *et al.*, 2016; Malti *et al.*, 2018; Attia *et al.*, 2011). However, α -pinene was not identified in samples from some Algerian Saharan regions (Ghardaïa, Bechar and Tamenrasset) (Belkacemi *et al.*, 2015; Ksouri *et al.*, 2017; Malti *et al.*, 2018) and Sabinene had not been reported in other studies on the same species (Vernin *et al.*, 1999; Vérité and Nacer, 2003; Gourine *et al.*, 2011; Hammoudi *et al.*, 2015; Belkacemi *et al.*, 2015; Ksouri *et al.*, 2017). Alternatively, samples from Ghardaïa, Laghouat, Bechar, Tamenrasset and Batna were characterized by very high contents of limonene (Gourine *et al.*, 2011; Ksouri *et al.*, 2017; Malti *et al.*, 2018). Bornyl Acetate was the dominant component of *P. Scoparius* essential oils from the Oum El Bouaghi and Tamenrasset regions (Vernin *et al.*, 1999; Hammoudi *et al.*, 2015). Other compounds were reported only in some samples and with appreciable amounts, such as: 7-methoxy-3-methyl-1-H-isichromen-1-one and methyl propene in *P. Scoparius* from Ghardaïa (Belkacemi *et al.*, 2015), 6- methoxyelemicine in samples from Ghardaïa, Bechar and Batna (Malti *et al.*, 2018), Apiol in samples from Oum El Bouaghi (Vernin *et al.*, 1999) and Δ -3-Carene only in the Tunisian essential oil (Attia *et al.*, 2011). Other essential oils were also characterized by a high presence of Myristicin

(Vérité and Nacer, 2003; Smaili *et al.*, 2011; Gourine *et al.*, 2011; Malti *et al.*, 2018). These reported results confirmed the existence of different chemotypes in *P. Scoparius* essential oils.

Several studies reported the significant effect of the extraction methods on the yields and the chemical compositions of essential oils (Lucchesi *et al.*, 2004; Elyemni *et al.*, 2019; Lo Presti *et al.*, 2005). Our work was based on the chemical variability of *P. Scoparius* essential oil as well as the antimicrobial and the anti-inflammatory activities depending on the extraction methods. To the best of our knowledge, this is the first study Dedicated to extractions using the microwave assisted hydrodistillation is reported here for the first time. In addition, no pharmacological studies on the anti-inflammatory activity of essential oils were previously conducted. The aim of our work is to check the variation of the chemical composition, antimicrobial and anti-inflammatory activities of the essential oils using three extraction methods (hydrodistillation, micro-wave and steam distillation).

2. Materials and methods

2.1. Samples

The aerial parts of *P. Scoparius* were collected from the Algerian Sahara (Taessa, Tamanrasset) in July of 2012. The harvested plants were washed and then allowed to dry in the shade in a dry and ventilated place. Global Positioning System (GPS) technology was used to record the location: latitude (23°05'64" N), longitude (5°30'79,7" E) and altitude (1748 m). Identification of plant was performed in the Botany laboratory of the National Forest Research Institute in Tamanrasset (NFRI).

2.2. Essential oils

2.2.1. Hydro-distillation (HD)

(200 g) of plant were placed in a flask. The flask was then filled with (4L) of water. The flask containing the plant and water was brought to a boil for 4hours using Clevenger-type apparatus (Council of Europe, 2010). The

essential oil-laden water vapors then passed through the refrigerant, condensed and fell into a separating funnel. The water and oil separated by density difference. All samples were collected and subsequently stored (sealed brown vial) at 4°C in the dark for further experimentation. The yield, based on the dry weight of the sample, was calculated.

2.2.2. Microwave-assisted extraction (MAE)

Microwave-assisted extraction was used at atmospheric pressure at (850 W, 2450 MHz) power for 50 minutes (Beoletto *et al.*, 2016), using a laboratory microwave for extracting the essential oil (M937, Samsung, United Kingdom). (100 g) of aerial part was placed in a (1L) flask with (100 ml) of water and connected to the Clevenger-type apparatus located outside the microwave. The essential oil was collected in the same way as mentioned in the HD process. The yield, based on dry weight of the sample, was calculated.

2.2.3. Steam distillation (SD)

The steam was passed through a (5L) flask containing (200 g) of plant for 4 h. The steam was then passed through a coiled tube where it was condensed. The distillate was collected. Finally, the essential oil obtained was separated through decantation using a separating funnel (Pushpangadan *et al.*, 2012). The essential oil was collected in the same way as mentioned in the HD process. The yield, based on dry weight of the sample, was calculated.

2.3. Gas chromatography (GC) and Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) analysis

Analyses of the essential oils were carried out using a Hewlett-Packard 6800 GC equipped with an HP5-MS capillary column (30m x 0.32mm x 0.25 m) film thickness. The oven temperature was kept at 60°C for 8 min initially, then gradually increased to 250°C at 2°C/ min and kept again at 250°C for 20 min. The injector and detector temperature were 250 °C and 280 °C, respectively. The carrier gas was helium used at flow rate of 1.2 mL/min. 1µl of sample was injected in split mode at a ratio of 1:70, where the detection ionization energy was 70

eV. For GC-MS analysis, the same above-mentioned conditions for GC were applied. The mass scan range was 29-550 Uma. The percentage composition of the oils was expressed as peak area by integration from the total ion current. The percentage of each compound was computed using the normalization method from the GC peak area, calculated as mean value of three injections, without using correction factors. The identification of the compounds was based on the comparison of retention indices with those reported in the literature. Retention indices were calculated using the Van Den Dool and Kratz equation. The series of n-alkanes (C₅-C₂₈) were injected in the same conditions. The EI-mass spectra of essential oils were compared with those of mass spectra library (NIST and Wiley 7N library) and the literature (Adams, 2007).

2.4. Pharmacological activities

2.4.1. Animals

Strains of albino mice of both sexes, weighing (20-25g) were used for pharmacological studies. The animals were obtained from the Department of Pharmacotoxicology, SAIDAL Antibiotical-Medea, Algeria. The animals were housed in cages under standard laboratory conditions (12-hour light/dark cycle at 25°C). The animals were divided into groups of five and fasted for 12 hours before the experiment.

2.4.2. Acute toxicity assay

The acute toxicity test was performed using the Lorke method (Lorke, 1983). Mice were divided into several groups of five. (0.5 mL) of (2000 mg / kg) of essential oils were administered orally. The control group was treated in the same manner without administering essential oil. The mice were observed for 14 days. The mice that died in each group were counted for lethal dose (LD50) determination.

2.4.3. Anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity was determined based on the carrageenan induced edema test (Levy, 1969). Groups of five mice each were treated orally with (0.5 mL) of

essential oils (50 mg/kg, 100 mg/kg and 150 mg/kg). After 30 minutes, (0.025 mL) of (1%) carrageenan solution (diluted with 0.9% physiological water) was injected into the right hind paw planter surface of the mice. Positive control received (50 mg/kg, 100 mg/kg and 150 mg/kg) of Diclofenac. After 3.30 hours, the animal suffers euthanasia and their right and left paws were removed and weighed with a precision scale. The percentage of edema was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Edema} = 100 \times (\text{Average weight of left paws} - \text{average weight of right paws}) \div \text{Average weight of left paws}.$$

The percentage reduction of edema in the treated mice relative to the control was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Reduction of edema} = 100 \times (\% \text{ Edema control} - \% \text{ Edema test}) \div \% \text{ Edema control}.$$

2.4.4. Antimicrobial activity

2.4.4.1. Microbial strains

Nine stains were used, including five Gram-positive bacteria: *Staphylococcus Aureus* ATCC 6538/P, *Staphylococcus Epidermidis* ATCC 12228, *Enterobacter Faecalis*, *Bacillus Subtilis* ATCC 6633 and *Sarcina Lutea*, two Gram-negative bacteria: *Escherichia Coli* ATCC 11105 and *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 and two yeasts: *Candida Albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces Cerevisiae* ATCC 2601.

The microbial strains belonged to the American Type Culture Collection, except for *Enterobacter Faecalis*, and were supplied from Frantz Fanon Hospital in Blida, Algeria and Pastor Institution in Algiers, Algeria.

2.4.4.2. Agar disk diffusion method

The antimicrobial activity was determined using the disk diffusion method (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997). The test was performed using the Soja Agar medium for bacterial germs and Sabouraud medium for fungal germs. The microbial suspensions were adjusted to 10^6 CFU/ml

(Colony Forming Units) in a sterile saline solution and were streaked over the surface of the plates using a sterile cotton swab in order to get a uniform microbial growth on the test plates. Sterile filter paper disks (6 mm in diameter) were then permeated with (10 uL) of essential oil. Plates were incubated at 37°C for 24h. Penicillin G, Oxalin and Amoxypen (200 mg/mL) were used as standard antibiotics. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the diameter of inhibition in mm (diameter of the disc included). Assays were performed in triplicate.

2.5. Statistical analysis

Collected data are expressed as mean \pm standard deviation. All tests were performed using IBM SPSS v 23. The comparison between chemical compositions was performed using a multivariate analysis of variance, sustained by a Tukey post hoc test, if significant. The study of biological activity was established by the ANOVA or Kruskal Wallis tests, sustained by Tukey or Mann Whitney U tests, if significant. Differences are considered as significant when ($p < 0.05$), highly significant when ($p < 0.01$) or strongly significant when ($p < 0.001$).

3. Results and discussions

3.1. Yields and chemical composition of essential oils

The extraction of the aerial parts of *P. Scoparius* produced yellow essential oils ranging in yield from 0.20% to 0.53% (w/w) as a function of the extraction method (Table 1). The results showed that the extraction method had a significant influence on essential oil yields of *P. Scoparius* ($p < 0.05$). The extraction by HD provided the highest yield (0.53%, 4h) compared to that obtained by SD (0.33 %, 4h), however the lowest yield was obtained using MAE (0.20 %, 0.5h). The results obtained agreed with those reported by several authors (0.25–0.99 %) (Vérité and Nacer, 2003; Lograda et al., 2013; Hammoudi et al., 2015; Ksouri et al., 2017; Malti et al., 2018, Attia et al., 2011). However higher oil yields were obtained from some different Algerian Saharan regions in

others studies (1.0-2.8%) (Gourine *et al.*, 2011; Lograda *et al.*, 2013).

Table 1. Variability in the chemical composition of *P. Scoparius* essential oil obtained by different methods

| No. | Compounds ^a | RI ^b | RI ^c | HD | MAE | SD |
|-----|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------|------|------|
| 1 | α -Thujene | 914 | 930 | 1.94 | - | 0.49 |
| 2 | α -Pinene | 925 | 939 | 10.84 | 0.48 | 3.28 |
| 3 | Camphene | 937 | 953 | 0.16 | - | tr |
| 4 | Sabinene | 967 | 976 | 0.88 | tr | 0.26 |
| 5 | β -Pinene | 971 | 979 | 2.63 | 0.27 | 1.19 |
| 6 | β -Myrcene | 989 | 990 | 0.38 | - | 0.14 |
| 7 | <i>l</i> -Phellandrene | 1003 | 1005 | 0.39 | tr | 0.18 |
| 8 | Δ -3-Carene | 1009 | 1011 | 1.08 | tr | 0.80 |
| 9 | α -Terpinene | 1015 | 1017 | 0.28 | tr | 0.25 |
| 10 | <i>p</i> -Cymene | 1025 | 1024 | 4.89 | 1.57 | 4.02 |
| 11 | Limonene | 1028 | 1029 | 3.16 | 0.77 | 1.73 |
| 12 | β -Ocimene Z | 1039 | 1040 | 2.70 | 0.32 | 1.00 |
| 13 | β -Ocimene E | 1047 | 1050 | 0.27 | - | tr |
| 14 | γ -Terpinene | 1057 | 1059 | 0.56 | 0.18 | 0.60 |
| 15 | Cissabinene hydrate | 1064 | 1068 | 0.11 | tr | tr |
| 16 | α -Terpinolene | 1085 | 1088 | 0.24 | 0.19 | 0.38 |
| 17 | Transsabinene hydrate | 1095 | 1097 | 0.22 | - | 0.13 |
| 18 | β -Thujone | 1113 | 1114 | 0.16 | - | 0.30 |
| 19 | α -Campholenal | 1117 | 1125 | - | 0.65 | - |
| 20 | Terpinene-1-ol | 1118 | - | 0.15 | - | - |
| 21 | α -Comphoaldehyde | 1123 | - | 0.37 | - | 0.53 |
| 22 | Pinocarveol (trans) | 1135 | 1139 | 0.69 | 0.92 | 0.57 |
| 23 | <i>Cis</i> Verbenol | 1138 | 1140 | 0.11 | 0.49 | - |
| 24 | <i>Trans</i> Verbenol | 1142 | 1144 | - | - | 0.27 |
| 25 | Penthybenzene | 1154 | 1156 | 0.14 | - | 0.27 |
| 26 | Pinocarpone | 1160 | 1162 | 0.55 | 0.52 | 0.30 |
| 27 | 4-Terpineol | 1176 | 1177 | 1.04 | 1.10 | 1.36 |
| 28 | Crypton | 1179 | - | - | 0.22 | 0.26 |
| 29 | Cymen-8-ol-para | 1183 | 1183 | 0.30 | 0.37 | 0.44 |
| 30 | α -Terpineol | 1189 | 1189 | 0.18 | - | 0.29 |
| 31 | (-)-Myrtenal | 1194 | 1193 | 0.44 | 0.37 | 0.24 |
| 32 | Myrtenol | 1200 | 1200 | 0.48 | 0.36 | 0.25 |
| 33 | α -Phellandrene epoxide | 1204 | - | - | 0.67 | 0.70 |
| 34 | <i>l</i> -Verbenone | 1206 | 1205 | 0.21 | 0.32 | 0.34 |
| 35 | <i>Trans</i> Carveol | 1218 | 1216 | 0.30 | 0.56 | 0.41 |
| 36 | Propanal,2-methyl-3-phenyl | 1238 | - | - | - | 0.41 |
| 37 | <i>l</i> -Carvone | 1241 | 1242 | 0.13 | 0.24 | 0.15 |

| | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 38 | Carvotanacetone | 1245 | 1247 | tr | 0.14 | 0.12 | |
| 39 | Phellandral | 1273 | 1271 | 0.10 | - | 0.20 | |
| 40 | Safranal | 1280 | - | - | 0.68 | - | |
| 41 | <i>p</i> -Cymen-7-ol | 1287 | 1290 | tr | 0.18 | 0.22 | |
| 42 | Thymol | 1289 | 1290 | - | - | 0.15 | |
| 43 | Carvacrol | 1300 | 1299 | 0.30 | 0.61 | 0.73 | |
| 44 | α -Copaene | 1370 | 1376 | 0.11 | 0.18 | 0.22 | |
| 45 | Methyleugenol | 1400 | 1401 | 0.25 | 0.61 | 0.37 | |
| 46 | β -Selinene | 1481 | 1485 | 0.21 | 0.11 | 0.22 | |
| 47 | Myristicin | 1523 | 1520 | 4.21 | 9.35 | 7.15 | |
| 48 | α -Calacorene | 1533 | 1545 | tr | 0.11 | 0.18 | |
| 49 | β -Calacorene | 1549 | - | 0.39 | - | - | |
| 50 | Élémicine | 1556 | 1554 | 0.14 | 0.33 | 0.28 | |
| 51 | 1,5-epoxysalvial-4 (14) ene | 1560 | - | 0.62 | 0.60 | 0.66 | |
| 52 | Spathulenol | 1575 | 1576 | 4.27 | 5.23 | 4.23 | |
| 53 | Salvia-4 (14)-en-1-one | 1586 | - | 0.44 | 0.76 | 0.71 | |
| 54 | Caryophyllene oxide | 1600 | 1581 | 0.57 | - | 0.24 | |
| 55 | Dillapiol | 1612 | 1622 | 16.38 | 37.21 | 31.95 | |
| 56 | Isospathulenol | 1634 | - | 0.52 | 0.18 | 0.22 | |
| 57 | β -eudesmol | 1645 | 1649 | 9.19 | 7.10 | 7.70 | |
| 58 | Butylidenephtalide Z | 1668 | 1672 | 7.15 | 1.23 | 6.65 | |
| 59 | Butylidenephtalide E | 1700 | 1718 | 1.86 | 2.72 | 2.20 | |
| 60 | 3-N-Butyl phtalide | 1724 | 1739 | 4.46 | 3.50 | 2.86 | |
| 61 | Butylidenedihydro-phtalide | 1777 | - | 0.33 | - | 0.14 | |
| 62 | Hexahydrofarnesyl acetone | 1848 | - | - | 0.32 | - | |
| 63 | Acidepalmitique | 1947 | - | 0.21 | 0.73 | tr | |
| Yield | | | | | 0.53 | 0.20 | 0.33 |
| Monoterpene Hydrocarbons | | | | | 30.16 | 3.59 | 13.94 |
| Oxygenated Monoterpenes | | | | | 6.22 | 8.59 | 9.02 |
| Sesquiterpene Hydrocarbons | | | | | 5.17 | 10.36 | 8.14 |
| Oxygenated Sesquiterpenes | | | | | 32.13 | 51.41 | 45.99 |
| Phtalides | | | | | 13.8 | 7.45 | 11.85 |
| Others | | | | | 0.21 | 1.05 | tr |
| Total | | | | | 87.69 | 82.45 | 88.94 |

^a Compounds listed according to their elution order on apolar HP5MSTM capillary, ^b Retention Indices on apolar column (HP5MS), ^c Retention indices of literature on apolar column reported by Adams (2007), tr: trace (<0.1%), -: Not detected, all components were identified by comparison of their retention indices with those of published data (Adams, 2007) and mass spectra with literature data, the MS library (NIST and Wiley 7N library)

GC and GC-MS analyses resulted in the identification of sixty-three compounds representing (82.45-88.94%) of the total composition of the essential oils. As shown in

(Table 1), a noteworthy qualitative similarity was observed, but with differences in the abundance of major compounds. The oxygenated sesquiterpenes were found to be the

main chemical group in all samples (32.13-51.41%). The second most frequently identified chemical class in the hydrodistilled sample was monoterpene hydrocarbons (30.16%). This fraction was present in much lower amounts in the samples obtained by SD and MAE (13.94 and 3.59%, respectively). The oxygenated monoterpene compounds were present in lower amounts in all samples (<10%). Among the three extractive processes, an important observation revealed that MAE isolated the highest relative amount of oxygenated sesquiterpenes (51.41%), as compared to SD with (45.99%) and HD with (32.13%). This result, which indicates that oils isolated by Microwave-assisted hydrodistillation are characterized by a higher content of oxygenated compounds, was previously reported on essential oils of three different species (*Ocimum basilicum L.*, *Mentha crispa L.* and *Thymus vulgaris L.*) (Lucchesi *et al.*, 2004). The same finding was obtained on *Rosmarinus officinalis L.* essential oils by (Elyemni *et al.*, 2019; Karakayat *et al.*, 2014; Okoh *et al.*, 2010; Moradi *et al.*, 2018). This may be due to an increase in hydrothermal effects in HD, compared to MAE which uses a lower quantity of water, that is rapidly heated [20, 30]. Conversely, Lo Presti, M. *et al.* reported in their study on the same species (*Rosmarinus officinalis L.*) that the essential oils produced by MAE and HD were characterized by very similar chemical profiles (Lo Presti *et al.*, 2005). Alternatively, a different result was previously published, where the amount of the oxygenated compounds was higher in the hydrodistilled essential oil compared with the oil isolated by microwave distillation from dried *Cuminum cyminum L.*, and *Zanthoxylum bungeanum Maxim* (Wang *et al.*, 2006). This contradiction in results is probably due to the fact that the amount of oxygenated compounds in essential oil is not dependent only on extraction methods, but also on many other factors including: species used, plant maturity, plant part used and harvest site (Mohammedi *et al.*, 2015; Mohammedi *et al.*, 2019).

The major compounds identified in the three essential oils were Dillapiol, β -eudesmol, Myristicin, α -Pinene and Butylidene phthalide Z, but with significant differences in their proportions depending on the extraction method used. Dillapiol, the major compound in all samples, was present at (37.21%) and (31.95%), respectively, for MAE and SD, but only at (16.38%) for HD. In the same way, Myristicin, the second compound in MAE oil (9.35%), amounted to (7.15%) and (4.21%) in the SD and HD samples, respectively. The hydrodistilled oil contained the highest amount of α -Pinene (10.84%), which is present in much lower amount in the other oils obtained by SD and MAE (3.28% and 0.48%, respectively). Both samples extracted by HD and SD contained important amounts of Butylidene phthalide Z (7.15% and 6.65%, respectively) and p-cymene (4.89% and 4.02%, respectively). These compounds account for only (1.23-1.57%) in the oil obtained by MAE. Other major compounds were determined with equivalent amounts in the oils extracted by HD, SD and MAE such as β -eudesmol (9.19%, 7.70% and 7.10%, respectively), Spathulenol (4.27%, 4.23% and 5.23%, respectively) and 3-N-Butyl phthalide (4.46%, 2.86% and 3.50%, respectively). To the best of our knowledge, 3-N-Butyl phthalide has never been identified in *P. Scoparius* essential oils.

The multivariate analysis of variance showed a strong significant effect of methods on major essential oil compounds. ($p < 0.001$). Extraction method variation indicates a significant effect on: Dillapiol ($p < 0.001$); α -Pinene ($p < 0.001$); Butylidene phthalide Z ($p < 0.001$); β -Ocimene Z ($p < 0.001$); β -Pinene ($p < 0.001$); α -Thujene ($p < 0.001$); Myristicin ($p < 0.001$); Limonene ($p < 0.001$); p-Cymene ($p < 0.001$); 3-N-Butyl phthalide ($p < 0.001$); β -eudesmol ($p < 0.001$); Spathulenol ($p < 0.001$); Δ -3-carene ($p < 0.001$); Butylidene phthalide E ($p < 0.001$); 4-terpineol ($p = 0.002$). The mean comparison between major compounds was assessed to choose the best extraction method for each Substance. Results show a considerable difference between methods for most

compounds, except for 4-terpineol, for which results indicate no difference in SD vs MAE (p=0.074), as well as Spathulenol, for which

results indicate no difference in SD vs HD (p=0.887).

Table 2. Major compounds of *P. Scoparius* essential oils from different origins previously reported.

| Country / Region | | Used part | Main constituents (%) | | | | | Other major constituents | Ref |
|------------------|----------------|-----------|-----------------------|----------|-----------|-------------|-------------|--|------------------------------|
| | | | α -pinene | Sabinene | Limonene | Myristicin | Dillapiol | | |
| Algeria | Oum El Bouaghi | S | 34 | - | - | - | - | Apiol (15.0) | Vernin <i>et al.</i> , 1999 |
| | | d | 11 | - | - | - | - | Apiol (52.8); Bornyl acetate (21%). | |
| | Ghardaïa | S | 6.8 | - | 9.8 | 7.2 | - | Germacrene D (12.7); α -Phellandrene (7.1); Methyl eugenol (5.9). | Vérité and Nacer, 2003 |
| | | d | 8.2 | - | 11.2 | 11.1 | - | Caryophyllene oxide (12.2); <i>p</i> -Cymene (7.5); Thymol (5.9). | |
| | M'sila | F | 17.4 | 7.5 | - | 24.1 | - | α -Phellandrene (15.6). | Smaili <i>et al.</i> , 2011 |
| | Ghardaïa | P | 4.4-11.2 | - | 32.7-66.5 | \leq 31.1 | \leq 23.0 | α -Phellandrene (\leq 6.4); Germacrene D (\leq 6.3). | Gourine <i>et al.</i> , 2011 |
| | Djelfa | P | 23.7-27.0 | - | 1.0-7.8 | \leq 18.2 | \leq 47.3 | Bornyl acetate (\leq 9.6); <i>p</i> -Cymene (2-6.7); β -Pinene (\leq 5.3). | |
| | Laghouat | P | 35.1-35.8 | - | 7.0-30.0 | - | 9.9-25.7 | Bornyl acetate (3.0-9.5); β -Pinene (5.2). | |
| | M'sila | P | 16.4 | 14.8 | - | - | - | Caryophyllene oxide (9.7); α -Farnesene (7.7); α -Terpinene (5.8). | Lograda <i>et al.</i> , 2013 |
| | Batna | P | 23.3 | 18.6 | - | - | - | α -Terpinene (7.7); β -Ocimene-E (7.6). | |
| Biskra | P | 8.3-13.4 | 18.9-24.8 | - | 7.6 | 6.6-16.8 | - | | |

| | | | | | | | | |
|----------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|------------------------|
| Tamenra-set | P | 12.1 | - | - | - | - | Bornyl acetate (32); Epi-Bicycle sesquiphellandrene (8.4); Eremophilene (8.2); γ -Cadinène (6.3). | Hammoudi et al., 2015 |
| Ghardaïa | P | - | - | - | 12.1 | - | 7-Methoxy-3-methyl-1-H-isichromen-1-one (10.6); Methyl propene (9.9). | Belkacemi et al., 2015 |
| Souk Ahras | P | 16.3-26.5 | 23.6-34.4 | - | - | - | <i>p</i> -Cymene (8.6-10.1); Terpinen-4-ol (4.1-9.7); α -Thujene (5.3-5.7); β -Pinene (\leq 5.5). | Chikhoun et al., 2016 |
| Tamenras-set | P | - | - | 46.9 | - | - | 1.8-Cineol (7.6). | Ksouri et al., 2017 |
| Batna | P | \leq 11.2 | \leq 10.5 | \leq 22.4 | \leq 19.4 | \leq 16.8 | 6-Methoxyelemicine (\leq 58.2). | Malti et al., 2018 |
| Biskra | P | 7.2-11.2 | 19.9-28.0 | - | \leq 20.1 | \leq 18 | Elemicine (\leq 29.1). | |
| Bechar | P | - | 32.4 | 19.1 | - | - | 6-Methoxyelemicine (27.4). | |
| Ghardaïa | P | 2.8-17.1 | \leq 31.3 | 9.2-26.7 | \leq 13.6 | - | 6-Methoxyelemicine (\leq 29.4); α -Phellandrene (\leq 15.4); β -Phellandrene (\leq 7.9); β -Pinene (\leq 7.1). | |
| Tunisia | P | 32.0 | 17.2 | - | - | - | Δ -3-Carene (16.9); α -Thujene (13.7); Ocimene (9.8). | Attia et al., 2011 |

P: Aerial parts; S: Stems; F: Flowers; d: seeds; n.r: not reported.

Previous research on the chemical composition of *P. Scoparius* essential oils obtained by HD and SD from different origins is summarized in (Table 2). It is noted that no

study on the essential oil of *P. Scoparius* as a function of extraction method has been performed to-date. As mentioned above, a significant qualitative and quantitative

difference in the chemical compositions was observed. As shown in (Table 2), most samples, whether from Tunisia or from different Algerian regions (M'sila, Batna, Biskra and Souk Ahras) were characterized by a high amount α -Pinene (8.3-35.8%) and Sabinene (14.8-34.4 %) (Lograda *et al.*, 2013; Chikhoun *et al.*, 2016; Attia *et al.*, 2011). Otherwise, essential oils obtained from seeds and stems essential oils from Oum El Bouaghi were dominated by apiol (52.8% and 15%, respectively) and α -pinene (11% and 34%, respectively). Bornyl acetate was present with large amount only in the seeds oil (21%) (Vernin *et al.*, 1999). Limonene (32.7-66.5%), Myristicin (up to 31.1%), dillapiol (up to 23%) and α -pinene (4.4-11.2%) were the main compounds of the aerial part essential oil from Ghardaia (Gourine *et al.*, 2011), while, Germacrene D (12.7%) was the major compound of the stems oil and Caryophyllene oxide (12.2%) the major compound of the seeds from same region (Ghardaia). These two samples were also characterized by similar amounts of limonene, myristicin and α -pinene (6.8-9.8% and 8.2-11.2%, respectively for stems and seeds oils) (Vérité and Nacer, 2003). Samples from Djelfa and Laghouat showed similar chemical profiles, dominated by α -pinene (23.7-35.8%), dillapiol (9.9-47.3%), Limonene (up to 30.0%), bornyl acetate (3.0-9.6%) and β -Pinene (up to 5.3%). However, myristicin was present in high amounts only in the oil obtained from Djelfa (up to 18.2%) (Gourine *et al.*, 2011). Myristicin 24.1 % and α -pinene (14.4 %) were also the primary compounds in the flours oil from M'sila, followed by α -Phellandrene (15.6 %) (Smaili *et al.*, 2011). The essential oils of *P. Scoparius*, isolated from Batna, Bechar and Ghardaia, contained the same dominant compounds: 6-Methoxyelemicine (0.0–59.6%), sabinene (0.8–55.6%), limonene (0.3–44.0%), myristicin (0.0–32.4%) and α -pinene (0.7 –31.0%). Dillapiol was found as a principal compound only in the oil from Batna (up to 16.8%) (Malti *et al.*, 2018). 6-methoxyelemicine was identified neither in our work, nor in other reports. In the same study, the samples coming from Biskra were

dominated by sabinene (19.9-28.0%), elemicine (up to 29.1%) and myristicin (up to 20.1%), while dillapiol and α -pinene were also present with appreciable percentages (1.4-18% and 7.2-11.2%, respectively) (Malti *et al.*, 2018). Limonene (46.9%) was the predominant compound in the sample from Tamenrasset, followed by 1.8-Cineol (7.6) (Ksouri *et al.*, 2017). In contrast, α -pinene (12.1%), Epi-Bicyclosesqui phellandrene (8.4%), Eremophilene (8.2%) and γ -Cadinene (6.3%) were the main components of the hydrodistilled oil from the same region (Tamenrasset) (Hammoudi *et al.*, 2015). Furthermore, 7-Methoxy-3-methyl-1-H-isichromen-1-one and methyl propene were identified, along with myristicin, in appreciable amounts only in the oil obtained by SD from Ghardaia (10.6%, 9.9% and 12.1%, respectively) (Chikhoun *et al.*, 2016).

3.2. Acute Toxicity Test

The oral administration of *P. Scoparius* essential oils in doses of 2000 mg/kg (limited dose) did not cause any mortality in treated mice for 14 days following the oral administration. According to Hodge and Sterner scale (Hodge, 1943), *P. Scoparius* essential oil can be classified as non-toxic.

3.3. Anti-inflammatory activity

In the present investigation, the anti-inflammatory activity of Diclofenac and *P. Scoparius* essential oils extracted by HD, MAE and SD was determined based on the carrageenan induced edema test. The results obtained are expressed in triplicate in (Table 3).

Our results showed that all the studied samples exhibited anti-inflammatory activity in a dose-dependent manner. In fact, the concentration had a significant effect on the extraction methods ($p < 0.05$) with the exception of MAE ($p = 0.308$). The groups treated with essential oils at a dose of 50 mg / kg showed the lowest inhibition percentages of carrageenan-induced edema (25.31 ± 0.85 - $40.64 \pm 2.36\%$) compared to the groups treated with doses of 100 mg / kg (27.75 ± 0.53 - $44.36 \pm 2.30 \%$).

Table 3. Effects of *P. Scoparius* essential oils and Diclofenac on carrageenan-induced hind paw edema in mice

| Doses (mg/kg) | Inhibition (%) | | | |
|---------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | HD | MAE | SD | Diclofenac |
| 50 | 25.31±0.85 ^{c, C} | 40.64±2.36 ^{a, A} | 31.37±3.38 ^{b, B} | 42.69±3.04 ^{a, C} |
| 100 | 27.75±0.53 ^{b, B} | 44.36±2.30 ^{a, A} | 33.76±4.33 ^{b, B} | 63.32±1.83 ^{a, B} |
| 150 | 55.68±1.30 ^{b, A} | 48.15±2.82 ^{c, A} | 51.09±3.68 ^{bc, A} | 69.01±1.00 ^{a, A} |

Values are averages ± standard deviation of triplicate analysis.

Data in the same column having different capital letters are significantly different ($P < 0.05$) among different concentrations.

Data in the same row having different lower-case letters are significantly different ($P < 0.05$) among different essential oil extraction method.

Results are ranked in ascending order; a>b>c; A>B>C.

The maximum activity was observed at 150 mg / kg for all samples (48.15 ± 2.82 - $55.68 \pm 1.30\%$). The percentage of inhibition of Diclofenac (50, 100 and 150 mg / kg), taken as a standard drug, also increased from ($42.69 \pm 3.04\%$) to ($69.01 \pm 1.00\%$), with increasing dose. At a dose of 50 mg / kg, HD was less effective than the sample obtained by SD (25.31 ± 0.85 vs $31.37 \pm 3.38\%$). However, using MAE, the essential oil showed the highest inhibition percentage ($40.64 \pm 2.36\%$). The last value was comparable to that obtained with Diclofenac ($42.69 \pm 3.04\%$) and had no significant difference with the standard drug ($p = 0.743$). The same order was observed using samples at a dose of 100 mg / kg (27.75 ± 0.53 , $33.76 \pm 4.33\%$ and $44.36 \pm 2.30\%$, respectively for HD, SD and MAE). The results showed that the anti-inflammatory activity of HD vs SD at the dose of 100 mg / kg has no significant difference ($p = 0.667$). The same is true for MEA and Diclofenac ($p = 0.099$). In contrast, at a dose of 150 mg / kg, the maximum activity was obtained in HD ($55.68 \pm 1.30\%$) and presented no significantly difference from SD ($p=0.147$).

Based on these results, it can be asserted that *P. Scoparius* essential oils have anti-inflammatory activity, with significant difference depending on the method of extraction used. This important anti-inflammatory activity of *P. Scoparius* essential oils can be attributed to their content of dillapiol,

β -eudesmol, myristicin, Butylidene phthalide Z and α -Pinene. These results validate the use of *P. Scoparius* as an anti-inflammatory in traditional Algerian medicine.

3.4. Antibacterial assays

The antimicrobial activity of essential oils was determined against seven bacteria strains and two yeasts using the disk diffusion method. This activity is estimated based on the diameter of inhibition zones. Results are presented in (Table 4) for different extraction methods.

Our data showed that *P. Scoparius* essential oils generally possessed a weak to moderate activity against yeasts (inhibition zone from 7.1 ± 0.1 to 13.6 ± 0.4 mm) as well as gram-positive bacteria (inhibition zone from 8.2 ± 0.1 to 21.8 ± 0.3 mm).

S. lutea was the most affected by *P. Scoparius* essential oils; the oil extracted by HD showed the largest zone of inhibition (inhibition zone = 21.8 ± 0.3 mm) as compared to those obtained by MAE (inhibition zone = 19.8 ± 0.7 mm) and by SD (inhibition zone = 14.7 ± 0.6 mm). Similarly, the tested oils exhibited weak activity against *S. aureus* (inhibition zone: 8.2 ± 0.1 - 11.0 ± 0.1 mm) and *B. subtilis* (inhibition zone: 9.1 ± 0.6 - 11.2 ± 0.2 mm), while *S. epidermidis* was more affected by the oils obtained by HD and SD (inhibition zone ≈ 12.7 mm). Dillapiol had no effect against *S. aureus* (Ferreira *et al.*, 2016). In another study;

Dillapiol had no effect against gram-negative bacteria and weak effect against gram-positive bacteria (Eftekhar *et al.*, 2014). This limited effect of *P. Scoparius* essential oils against *S. aureus* could be due to their high content of dillapiol.

These results were previously reported by Ksouri, A. *et al.* on *B. bastilus* (inhibition zone

= 8.3±1.1 mm) while *S. aureus* was more resistant to *P. scoparius* essential oil (inhibition zone = 20.0±3.0 mm) (Ksouri *et al.*, 2017). Kiram, A. *et al.* who worked on *P. scoparius* from Biskra (Southeast Algeria) reported stronger oil activity against the same bacterial strain, *S. aureus* [Kiram *et al.*, 2013).

Table 4. Antimicrobial activity of *P. Scoparius* of essential oils used three different methods extractions.

| Microorganisms | Inhibition zone (mm) | | | | | |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|--------|-----------|
| | Essential oil | | | Standard antibiotics | | |
| | HD | MAE | SD | Penicillin G | Oxalin | Amoxyphen |
| Gram- positive bacteria | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 8.2±0.1 ^{b,F} | 8.2±0.1 ^{b,D} | 11.1±0.1 ^{a,B} | 40 | 40.6 | 38 |
| <i>S. epidermidis</i> | 12.4±0.3 ^{a,C} | 10.4±0.2 ^{a,C} | 12.1±0.6 ^{a,AB} | 14.6 | 21.8 | 17.6 |
| <i>S. lutea</i> | 21.8±0.3 ^{a,A} | 19.8±0.7 ^{a,A} | 14.7±0.6 ^{b,A} | >45 | >45 | >45 |
| <i>B. subtilus</i> | 11.2±0.2 ^{a,D} | 9.1±0.6 ^{b,D} | 9.5±0.1 ^{b,C} | 35 | 40 | 34 |
| Gram-negative bacteria | | | | | | |
| <i>E. faecalis</i> | - | - | - | 12 | 25 | 26 |
| <i>E. coli</i> | - | - | - | 31 | 16.9 | 40 |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - | - | - | 17 | 19 |
| Yeast | | | | | | |
| <i>C. albicans</i> | 11.5±0.3 ^{b,D} | 11.3±0.2 ^{b,B} | 13.4±0.2 ^{a,A} | - | - | - |
| <i>S. cerevisiae</i> | 13.6±0.4 ^{a,C} | 7.1±0.1 ^{b,E} | 12.0±0.1 ^{a,A} | - | - | - |

Values are averages ± standard deviation of triplicate analysis, zone of inhibition in mm ± standard deviation beyond well diameter (6 mm), data in the same column having different capital letters are significantly different ($P < 0.05$) among different microorganisms, data in the same row having different lower case letters are significantly different ($P < 0.05$) among different essential oil extraction method, results are ranked in ascending order; a>b; A>B>C>D>E>F, -: not action

Alternatively, *P. scoparius* essential oils showed no activity (inhibition zone = 0 mm) against gram-negative bacteria *E. faecalis*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. Unlike gram-positive bacteria, it is known that gram-negative bacteria have a very high resistance to essential oils due to their wall made up of a second external barrier (Okoh *et al.*, 2010; Dhouioui *et al.*, 2016). The same results were obtained by other authors who reported that *P. Scoparius* essential oils generally showed limited activity against *P. aeruginosa*, *E coli* and *E. faecalis* (Ksouri *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2017).

Our findings displayed a strong significant difference against *S. aureus* and *S. cerevisiae* between MEA and SD ($p < 0.001$), and no

significant difference between HD and MEA against strains ($p > 0.05$), except for *B. subtilus* and *S. cerevisiae*. The comparison of HD vs SD showed that the extraction method influenced the antimicrobial activity except for *S. epidermidis* and *S. cerevisiae* ($p < 0.05$). This could be due to the high content of hydrocarbon monoterpene since the antimicrobial activity of the essential oil could be linked to the presence of α -pinene (Bourkhiss *et al.*, 2007; Abi-ayada *et al.*, 2011; Amarti *et al.*, 2011)); although minor molecules can also produce antibacterial activity, contributing to the activity of essential oils (Okoh *et al.*, 2010).

4. Conclusions

The effects of extraction methods on *P. Scoparius* essential oil compositions and their anti-inflammatory and antimicrobial activities are investigated here for the first time. The chemical compositions of the essential oils obtained are qualitatively similar, but with significant differences in the abundance of major compounds. *P. Scoparius* essential oils are non-toxic and exhibit important anti-inflammatory activity and weak antibacterial activity. The extraction method significantly affected the anti-inflammatory and antibacterial activities. It is very important to continue this research and find a correlation between the extraction techniques and their effects on the chemical composition and biological activities.

5. References

- Abdellah, H., Sahki, R. E. (2004). Eds. Le Hoggar: Promenade botanique, Herbaceous species.
- Abi-Ayada, F. Z., Abi Ayad, M., Lazzouni, H. A., Rebiahi, S., Bessiere, A. (2011). Antibacterial Activity of Essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master from Algeria flora, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1, 1-6.
- Adams, R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. (4th ed.). Allured Pub Corp.
- Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M. Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment / Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14(1), 141-148.
- Attia, S., Grissa, K.L., Lognay, G., Heuskin, S., Mailleux, A.C., Hance, T. (2011). Chemical composition and acaricidal properties of *Deverra Scoparia* essential oil (Araliales: Apiaceae) and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic entomology*, 104(4), 1220-1228.
- Belkacemi, D., Kalla, A., Rouabhi R., Amara, D. (2016). Effect of *Pituranthos Scoparius* essential oils on reducing metganogenesis in cheep: in vitro Study. *Environmental Science and Indian Journal*, 12(3), 118-126.
- Benchelah, A. C., Bouziane, H., Maka, M., Ouahes, C. (2000). Fleurs du Sahara : Voyage ethnobotanique avec les Touaregs du Tassili. 2nd eds. Ibis Press, 105-106.
- Beoletto, V. G., De las Mercedes Oliva, M., Marioli, J. M., Carezzano, M. E., Demo, M. S. (2016). Antimicrobial Natural Products Against Bacterial Biofilms. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches, *Antibiotic resistance*, Chapitre 14, 291-307.
- Boukef, M. K. (1986). Plants in traditional Tunisian medicine. *Cultural and technical cooperation agency*, 1986, 228-230.
- Bourkhiss, M., Ouhssine, M., Hnach, M., Satrani, B., Farah, A. (2007). Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bulletin of the Bordeaux Pharmacy Society*, 146, 75-84.
- Chikhoune, A., Pavleca, J. D., Shashkov, M., Berroua, Z., Chebbi, K., Bougherra, H., Zeroual, B., Aliane, K., Gagaoua, M., Boudjellal, A., Vovk, I., Križman, M. (2016). Antioxidant effect induced by the essential oil of *Pituranthos Scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), 1-12
- Council of Europe, Pharmacopée Européenne, (2010). 7th Eds. Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, Strasbourg, France.
- Dhouioui, M., Boulila, A., Chaabane, H., Saïd Zina, M., 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.
- Eftekhar, F., Yousefzadi, M., Azizian, D., Sonboli, A., Salehi, P. (2005). Essential Oil

- Composition and Antimicrobial Activity of *Diplotaenia damavandica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(11-12), 821-825.
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M., Eloutassi, N. (2019). Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *The Scientific World Journal*, 1-6.
- Ferreira, R. G., C. Monteiro M. C., da Silva, J. K. R., Maia J. G. S. (2016). Antifungal Action of the Dillapiole-rich Oil of *Piper aduncum* against Dermatofungi Caused by Filamentous Fungi. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 15(12), 1-10.
- Gourine, N., Merrad, B., Yousfi, M., Stocker, P., Gaydou, E.M. (2011). Chemical composition of the essential oil of *Pituranthos Scoparius*. *Natural Product Communications*, 6(8), 1151-1154.
- Hammiche, V., Maiza K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 358-367.
- Hammoudi, R., Dehak, K., Hadj Mahammed, M., Didi Ouldelhadj, M. (2015). Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de *Deverra Scoparia* Coss. & Dur. (Apiaceae). *Lebanese Science Journal*, 16(2), 27-36.
- Hodge, H.C., Sterner, J.H. (1943). Determination of substance acute toxicity by LD50. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 9, 93-96.
- Karakaya, S., Nehir El, S., Karagozlu, N., Sahin, S., Sumnu, G., Bayramoglu, B. (2014). Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1056-1065.
- Kiram, A., Ramdani, M., Zeraid, A. (2013). Etude Phytochimique et de L'activité Antimicrobienne des Huiles Essentielles de *Pituranthos Scoparius* de la Region de Biskra (Sud-Est Algérien). *Tunisian Journal of Medecinal Plants and Natural Products*, 10, 1-6.
- Ksouri, A., Dob, T., Belkebir, A., Dahmane, D., Nouasri, A. (2017). Volatile compounds and biological activities of aerial parts of *Pituranthos Scoparius* (Coss and Dur) Schinz (Apiaceae) from Hoggar, southern Algeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(1), 51-58.
- Levy, L. (1969). Carrageenan paw edema in the mouse, *Life Sciences*, 8(1), 601-606.
- Lograda, T., Ramdani, M., Kiram, A., Chalard, P., Figueredo, G. (2013). Variation of essential oils composition of *Pituranthos Scoparius* in Algeria. *Global journal of research on medicinal plants and indigenous medicine*, 2(1), 1-9.
- Lo Presti, M., Ragusa, S., Trozzi, A., Dugo, P., Visinoni, F., Fazio, A., Dugo, G., Mondello, L. (2005). A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil. *Journal of Separation Science*. 28(3), 273-280.
- Lorke, D.A. (1983). New approach to practical acute toxicity, *Archives of Toxicology*, (pp. 53).
- Lucchesi, M. E., Chemat, F., Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydrodistillation. *Journal of Chromatography*, 1043(2), 323-327.
- Malti, C., Boussaïd, M., Belyagoubi, L., Paoli, M., Gibernau, M., Tomi, F., AtikBekkara, F., Bekhechi, C. (2018). Chemical Variability of the Essential Oil of *Pituranthos Scoparius* from Algeria, *Chemistry & Biodiversity*, 15(7).
- Mohammedi, H., Mecherara-Idjeri, S., Foudil-Cherif, Y., Hassani, H. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *daucus carota* L. subsp. *carota* aerial parts. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 18 (4), 873-883.
- Mohammedi, H., Mecherara-Idjeri, S., Hassani, H. (2016). Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Ruta montana* L. collected from different geographical regions in Algeria.

- Journal of essential oil research*, 32 (1), 88-101.
- Morad, S., Fazlali, A., Hamedi, A. (2018). Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: Comparison with traditional distillation. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(1), 22-28.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A. P., Afolayan, A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 120 (1), 308-312.
- Ould el hadj, M., Hadj mahammed, M., Zabeiro, H. (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du Savoir*, 47-51.
- Ozenda, P. (2004). Flore et végétation du Sahara. (3rd ed.). CNRS, 663.
- Pushpangadan, P., George, V. (2012). Handbook of Herbs and Spices. 2ndEds, Vol. 1, Woodhead Publishing Series in Food Science, *Technology and Nutrition*, 55-72.
- Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques. (CNRS ed.). (pp. 1170).
- Smaili, T., Zellagui, A. Gherraf, N., Flamini, G., Cioni, P. L. (2011). Essential oil content of the flowers of *Pituranthos Scoparius* in Algeria Medicinal plant, *International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 3(2), 177-179.
- Vernin, G., Ghiglione, C., Mostafa, D., Parkanyi, C. (1999). GC/MS Analysis of volatile constituents of essential oils of *Pituranthos Scoparius*, *Journal of essential oil research*, 11, 673-676.
- Vérité, P., Nacer, A. (2003). Composition of seeds and stems and essential oils of *Pituranthos Scoparius* (Coss. & Dur.) Schinz. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 562-564.
- Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H.Q. (2006). Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 11-17.

Acknowledgements

We would like to especially thank the Department of Pharmacotoxicology–Saidal of Medea, Algeria, for laboratory materials support and for hosting the pharmacological activities in their laboratories.