

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
SIDI BEL ABBES

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

M^{me} Nabila BEKHTI

Spécialité : chimie

Option : chimie physique et théorique, modélisation moléculaire

Intitulée

**“ Caractérisation physico-chimiques des Polyphénols et
Alcaloïdes utilisés en médecine ”**

Soutenue le.....Devant le jury composé de :

M ^{me} TALEB-MOKHTARI. Ilham	Professeur	Présidente	Univ. Sidi Bel Abbes
M ^{me} MOSTEFAL Asmaa	Professeur	Examinatrice	Univ. Saida
M ^{me} OULDMOUMNA Oumria	MCA	Examinatrice	Univ. Mascara
Mr SELKA Mohamed Adil	MCA	Examineur	Univ. Tlemcen
M ^{me} ZEMRI Khalida	MCA	Examinatrice	Univ. Sidi Bel Abbes

Directeur de thèse : M^{me} SEKKAL-RAHAL Majda **Professeur** **UDL/SBA**

Co-Directeur de thèse :

Année universitaire : **2020/2021**

Remerciements

Tout d'abord je remercie le **bon DIEU** tout puissant, qui m'a permis de mener ce travail à bien et de m'avoir donné la force de continuer ma recherche.

Une partie du travail a été effectuée au laboratoire de recherche de l'université Degli Studi, département des Sciences Chimiques et Géologiques, Cagliari, Italie. Je remercie donc **Professeur S. PORCEDDA** pour m'avoir accueilli dans sa structure, ainsi que **Dr A. PIRAS** de m'avoir donné la possibilité et de bonnes conditions afin de mener à bien mes recherches et d'accepter de collaborer dans ce modeste travail. Et une partie a été faite au laboratoire de Chimie Organique de la Faculté de Médecine **UDL. SBA**, Je tiens à remercier le Chef de Département de la Faculté, **Dr Y. ACHOURI**, et son Adjoint **Dr. M.A SELKA** pour leur confiance ainsi que pour les nombreux recentrages et discussions scientifiques fructueuses.

J'aimerais remercier ici mon directeur de thèse, **Professeur M. SEKKAL-RAHAL (UDL. SBA)**, qui a accepté de diriger ce travail. Elle a su se montrer présente tout en me laissant une certaine liberté dans les orientations que j'ai souhaité donner à mes travaux. Elle s'est toujours sentie très concernée par le bon déroulement de ce travail et je l'en remercie.

Je tiens à remercier **Dr F. BELABDELLI-MOURI (MCA .Faculté de médecine .SBA)** pour sa disponibilité, sa compétence, sa gentillesse, ses encouragements continus qui m'ont permis de finaliser ce travail de thèse, un grand merci. Je vous témoigne avec ces mots modestes mon profond respect et ma gratitude toute ma vie.

Mes remerciements vont tout droit à la présidente de ce jury, **Professeur I.TALEB-MOKHTARI (Faculté de médecine .SBA)** d'avoir répondu favorablement et d'avoir accepté de présider le jury afin d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement les personnes qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être membre de mon jury : **Professeur A. MOSTEFAI (UNIV de Saida)**, ainsi que **Dr O. OULDMOUMNA (MCA-UNIV de Mascara)**, **Dr M.A. SELKA (MCA-UNIV de Tlemcen)**, **Dr K. ZEMRI (MCA- UNIV de Sidi Bel Abbes)**.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux **Dr A. SIAD-BEKHTI (MCA-UNIV de Mascara)** et **Dr. W. ATMA (MCA-UNIV de Mascara)** qui m'ont assisté et encouragé pour

finaliser cette thèse de Doctorat, pour tous mes Professeurs qui m'ont formés et assistés pour une vie professionnelle réussie.

Ma profonde gratitude va à mes amis et collègues pour leurs soutien moral et encouragements : **Dr K. GUENAOUI** (MCB ; U.D.L SBA), **Dr F-F. FEDDOUL** (UDL SBA), **Dr L. BEKRI** (MCB ; U.D.L SBA), **Melle A. FIZAZI** (UDL SBA), **Dr L. BENABI** (MCB .UNIV Tiaret), **Dr W. CHAIBI** (Attachée de recherche CRAPC), **Dr Z. AGGAB** (UDL SBA), **Dr I. ABEDELMALEK** (MCB .UNIV Tiaret), **Dr H. SEHIL** (MCB .UNIV Tiaret), (UNIV MASCARA) et l'ensemble du personnels du laboratoire de graduation de l'université **MUSTAPHA STAMBOULI, MASCARA** surtout **Melle H, BELDJILALI**. Et tous mes amis et collègues.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

A Mes parents qui sacrifiaient pour moi et m'aide depuis j'étais enfant

A Mes enfants Nouh et Dina qui me donnent toujours le courage

A Mes chers frères qui je souhaite tout le bonheur du monde

A Mes chères sœurs pour leur soutien illimité

A Ma défunte chère amie et collègue « HAKEM KARIMA »

A mes amis(es)

A tous ceux qui me sont chers

Nabila

Table Des Matières

INTRODUCTION GENERALE	01
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	07
CHAPITRE I : PLANTES MEDICINALES : COMPOSITION CHIMIQUE ET INTERET BIOLOGIQUE	08
I. Plantes médicinales	09
1. Définitions	09
2. Terminologie	09
3. Historique	10
4. Mode d'obtention et Conservation	11
5. Principe actif	12
II. Métabolite Secondaire	12
1. Classification	13
1.1 Les composés phénoliques	13
2. Procédés d'extraction	28
3. Méthodes d'analyse	30
4. Activité antimicrobienne	33
5. Activité antioxydante	37
Références	43
CHAPITRE II : MONOGRAPHIE DES PLANTES ETUDIEES	49
I. PRESENTATION DE LAURIER NOBLE : <i>Laurus nobilis</i>	50
1. Historique	50
2. Terminologie	50
3. Description	51
4. Etude Botanique	54
5. Etude Chimique	56
6. Etude pharmacologique	59

7. Utilisation	59
II. PRESENTATION DE KHELLA, (NOUKHA) : <i>Ammoïdes verticillata</i>	62
1. Terminologie	62
2. Description	62
3. Etude Botanique	64
4. Etude Chimique	66
5. Etude pharmacologique	67
6. Utilisation	67
Références	71
CHAPITRE III : MÉTHODES QUANTIQUES ET RÉACTIVITÉ CHIMIQUE	75
I. Méthodes quantiques	76
1. Méthodes ab-initio	76
II. Réactivité chimique	83
III. Evaluation de l'activité antioxydante	88
Références	91
<u>PARTIE 2</u> : ETUDE EXPERIMENTALE	93
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES	94
I. MATERIELS	95
II. METHODES	97
1. Extraction	97
2. Détermination du rendement d'extraction	99
3. Caractérisation des huiles essentielles	100
4. Détermination de la composition chimique	105
5. Activités biologiques et pharmacologiques	109
5.1 Activité antibactérienne	109
5.2 Activité antioxydante	116
5.3 Evaluation de la réactivité antioxydante	119
Références	128

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	131
I. RESULTATS ET DISCUSSION	132
1. Détermination du rendement d'extraction	132
2. Caractérisation des huiles essentielles	136
1.1.Caractéristiques organoleptiques	136
1.2.Analyses physico-chimiques des huiles essentielles :	137
3. Détermination de la Composition chimique	141
a. Identification des huiles essentielles	141
b. Identification des polyphénols	150
4. Activité antimicrobienne	154
a. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration bactéricide minimale (CBM)	154
b. Evaluation de l'activité antimicrobienne	156
5. Evaluation de l'activité antioxydante	164
6. Evaluation de l'activité antioxydante par des calculs quantiques	169
Références	181
CONCLUSION GENERALE	188
Annexes	192

LISTE DES TABLEAUX

<u>PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
Tableau I.1 : Principaux acides benzoïques.	14
Tableau I.2 : Principaux acides cinnamiques.	15
Tableau I.3 : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe.	18
Tableau II.1 : Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i> .	54
Tableau II.2 : Classification botanique d' <i>Ammoides verticillata</i> .	64
Tableau II.3 : Enquête thérapeutique effectuée au niveau de la région de Tlemcen sur <i>Ammoides verticillata</i>	69
<u>PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE</u>	
Tableau I.1 : Situation géographique des sites choisis.	95
Tableau I.2 : Conditions opératoires d'analyse CG/SM d'HE.	107
Tableau I.3 : Souches bactériennes testées.	110
Tableau II.1 : Rendements des extraits des deux plantes étudiées.	132
Tableau II.2 : Rendements d'extraction de <i>Laurus nobilis</i> rapportés dans la littérature.	133
Tableau II.3 : Rendements d'extraction d' <i>Ammoides verticillata</i> rapportés dans la littérature.	134
Tableau II.4 : Caractéristiques organoleptiques des HEs des deux espèces étudiés.	137
Tableau II.5 : Analyses physiques des HEs des deux espèces étudiés.	137
Tableau II.6 : Analyses chimiques des HEs des deux espèces étudiés.	139
Tableau II.7 : Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extraite à partir des feuilles sèches de <i>Laurus nobilis</i> .	141
Tableau II.8 : Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extraite par hydrodistillation des parties aériennes sèches d' <i>Ammoides verticillata</i> .	144
Tableau II.9 : Composition chimique des HEs extraites par hydrodistillation des deux plantes étudiées.	147
Tableau II.10 : Teneur en composés phénoliques d'extrait éthanolique des parties aériennes	152

sèches d' <i>Ammoides verticillata</i> .	
Tableau II.11: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CBM) des deux huiles essentielles testées.	155
Tableau II.12 : Zones d'inhibition des HEs des deux plantes étudiées.	156
Tableau II.13: % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits de l'acide ascorbique et du catéchine.	165
Tableau II.14 : Descripteurs globaux de (+) –catéchine et de (-) – épicatechine neutres.	171
Tableau II.15 : Propriétés énergétiques de catéchine et d'épicatechine neutres.	171
Tableau II.16 : Energies des orbitales frontières de la catéchine et de ses radicaux, et les énergies de dissociation des liaisons des groupes OH.	173
Tableau II.17 : Propriétés électroniques de la catéchine et de ses radicaux.	176
Tableau II.18 : Energies de dissociation des radicaux libres les plus stables et les concentrations d'inhibition de (+)-catéchine et d'acide ascorbique.	179

LISTE DES FIGURES

<u>PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
FIGURE I.1 : Structures des acides benzoïque et cinnamique.	14
FIGURE I.2 : Structure de base des flavonoïdes.	16
FIGURE I.3 : Quelques structures des flavonoïdes.	17
FIGURE I.4 : Structure générale d'une molécule de coumarine.	21
FIGURE I.5 : Quelques structures des alcaloïdes.	22
FIGURE I.6 : Structures d'isoprène et d'isopentenyl pyrophosphate (IPP).	23
FIGURE I.7 : Classes des constituants des huiles essentielles.	26
FIGURE I.8 : Structures chimiques de quelques composés antimicrobiens des plantes.	33
FIGURE I.9 : Principe du test DPPH.	42
FIGURE II.1 : Laurier noble ou <i>Laurus nobilis</i> .	51
FIGURE II.2 : Arbre de <i>Laurus nobilis</i> .	52
FIGURE II.3 : Feuilles de <i>Laurus nobilis</i> .	52
FIGURE II.4 : Fleurs de <i>Laurus nobilis</i> .	53
FIGURE II.5 : Fruits de <i>Laurus nobilis</i> .	53
FIGURE II.6 : Distribution des Lauracées à travers le monde.	55
FIGURE II.7 : Structure du 1,8-cinéole.	57
FIGURE II.8 : Ajowan ou <i>Ammoïdes verticillata</i> .	63
FIGURE II.9 : Fleurs d' <i>Ammoïdes verticillata</i> .	64
FIGURE II.10 : Distribution d' <i>Ammoïdes verticillata</i> à travers le monde.	65
<u>PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE</u>	
FIGURE I.1 : Localisation de la commune de Tessala dans la wilaya de Sidi Bel Abbès.	95
FIGURE I.2 : Feuilles de <i>Laurus nobilis</i> .	96

FIGURE I.3 : Partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i> .	96
FIGURE I.4 : Localisation de la commune de Ghazaouet dans la wilaya de Tlemcen.	96
FIGURE I.5 : feuilles de <i>Laurus nobilis</i> et partie aérienne d' <i>Ammoides verticillata</i> séchés et broyés.	97
FIGURE I.6 : Montage d'hydro-distillation en utilisant un appareil de type Clvenger.	98
FIGURE I.7 : Extraction par macération successive.	99
FIGURE I.8 : Evaporateur rotatif de type « Büchi ».	99
FIGURE I.9 : Réfractomètre.	102
FIGURE I.10 : Chromatographie en phase liquide à haute performance (CPLH).	108
FIGURE I.11 : Spectrophotomètre.	118
FIGURE I.12 : Structures des deux isomères (a) (+)-catéchine et (b) (-)-épicatéchine.	122
FIGURE II.1 : Histogramme des rendements d'extraction des deux plantes étudiées.	135
FIGURE II.2: Chromatogramme CG/SM de l'HE des feuilles de <i>Laurus nobilis</i> . Temps de rétention des composants majoritaires sont : 1, 8-cineole (7.9363), methyl eugenol (22.8303), α -terpynil acetate (20.5264).	142
FIGURE II.3 : Chromatogramme CG/SM de l'HE des parties aériennes sèches d' <i>Ammoides verticillata</i> . Temps de rétention des composants majoritaires sont : thymol (18.2487), limonène (7.8574), p-cymene (7.7132).	144
FIGURE II.4 : Histogramme de la composition chimique des deux plantes étudiées.	149
FIGURE II.5 : Profils Chromatographiques obtenus par HPLC de l'Extrait éthanoïque (EOH) des parties aériennes sèches d' <i>Ammoides verticillata</i> à 254, 278 et 330 nm. . Temps de rétention des composants majoritaires sont : Acide hydroxybenzoïque (7.786), Acide benzoïque (4.348), catéchine (13.231).	151
FIGURE II.6 : Structures des composants majoritaires de l'extrait : (a) Acide hydroxybenzoïque, (b) Acide benzoïque, (c) catéchine.	153
FIGURE II.7 : Observation de la croissance d' <i>Escherichia coli</i> à différentes concentrations des deux huiles essentielles testées.	155
FIGURE II.8 : Zones d'inhibition des deux huiles essentielles testées.	157

FIGURE II.9 : Histogramme des zones d'inhibition des deux huiles essentielles étudiées.	161
FIGURE II.10 : Terpénoïdes susceptibles de présenter des activités antibactériennes.	162
FIGURE II.11 : Courbes des taux d'inhibition en fonction des concentrations.	166
FIGURE II.12 : Histogramme des concentrations d'inhibition CI50.	168
FIGURE II.13 : Structures moléculaires de (a) : (+) –catéchine et de (b) : (-) – épicatechin.	170
FIGURE II.14 : Structures de catéchine à l'état fondamental (a) et ses radicaux : 2-OH (b) et 3-OH (c) 4-OH (d) 5-OH (e) et 6-OH (f).	172
FIGURE II.15 : Répartition des charges HOMO : 1 et LUMO 2 de catéchine à l'état fondamental (a _{1, 2}) et ses radicaux : 2-OH (b _{1, 2}) et 3-OH (c _{1, 2}) 4-OH (d _{1, 2}) 5-OH (e _{1, 2}) et 6-OH (f _{1, 2}).	174
FIGURE II.16 : Les distributions des densités de spin des radicaux libre de la catéchine : 2-OH (b) et 3-OH (c) 4-OH (d) 5-OH (e) et 6-OH (f).	177
FIGURE II.17 : Structures moléculaires des radicaux stable de (a) : d'acide ascorbique neutre et (b) : le radicale le plus stable d'acide ascorbique.	179

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association française de normalisation.

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH).

A échantillon : Absorbance de la solution à tester.

ATCC : American Type Culture Collection

BDE : Enthalpie de dissociation de la liaison

BHA : ButylHydroxyAnisole.

BHT : ButylHydroxyToluene.

B3LYP : Lee, Yang et Parr avec trois paramètres de Becke.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CPG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée avec la Spectrométrie de Masse.

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CI50 : Concentration Inhibitrice de 50% de DPPH

CPCM : Conductor Polarized Continuum Model.

d : densité

DHHDP : Dé-Hydro-Hexa-Hydroxy-Di-Phénique.

DMSO : diméthylsulfoxyde

DFT : La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité.

DPPH : 1,1- DiPhényl-2-PicrylHydrasyle.

ETE : Enthalpie de transfert d'électrons,

EE-OH : Extrait éthanoïque.

ES : extraction par solvant

EV : Entrainement à la vapeur

ERO : Espèce réactive oxygénée.

EOH : Ethanol

GGA : (Generalized Gradient Approximation) Fonctionnelle non-locale à correction du gradient.

GPx : Glutathion Peroxydase.

HHDP : Acide Hexa-Hydroxy-Di-Phénique.

HD : Hydrodistillation

HE : Huile Essentielle.

HV : Huile Végétale.

HOMO : Orbitale Moléculaire la plus Haute en énergie Occupée.

HAT : H-Atom Transfer.

IPP : Isopentenyl PyroPhosphate.

IR : Infrarouge.

I_K : index Kovats.

I% : Pourcentage d'inhibition du DPPH.

IP : potentiel d'ionisation

I_A : Indice d'acide.

I_S : Indice de saponification.

I_E : Indice d'ester.

LDA : (Locale Density Approximation) Approximation de la densité locale.

LUMO : Orbitale Moléculaire la plus Basse Vacante.

MH : Monoterpènes Hydrocarbure

MO : Monoterpenes oxygénés

ndt : Indice de réfraction

OM : Orbitales Moléculaires.

PA : Principes Actifs.

Ph-Pr : phénylpropènes

PhM : phénol monoterpénoïde

PG : la Gallate Propylée.

PA : l'affinité protonique,

PDE : Enthalpie de dissociation du proton.

RX : Rayons X.

ROS : Espèces réactives oxygénées (reactive oxygen species)

RNS : Espèces réactives azotées (reactive azote species)

RONS ou ERON : espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (reactive oxygen and nitrogen species).

SPLET : transfert séquentiel d'un électron suivi de la perte d'un proton.

SET-PT : transfert d'un seul électron suivi du transfert de protons

S-CO₂ : CO₂ supercritique.

SOD : SuperOxyde Dismutase.

SO : Sesquiterpènes oxygénés

SH : Sesquiterpènes Hydrocarbure

Tr : Temps de retention

T : Température

TCE : tétracyanoéthylène.

TAH : transfert de l'atome d'hydrogène

TBHQ : Tetra-ButylHydroQuinone.

U.V : Ultra-Violet.

UB3LYP : B3LYP non restreinte.

η : Dureté ou le gap énergétique

μ_{corps} : masse volumique du liquide

μ_{eau} : masse volumique de l'eau

Résumé

Ce travail vise la détermination de la composition chimique des extraits de deux plantes médicinales de la flore Algérienne « *Laurus nobilis* » et « *Ammoides verticillata* » ainsi que la détermination de leur pouvoir antibactérien in vitro sur des souches pathogènes multirésistantes puis l'évaluation du pouvoir antioxydant in vitro et à l'aide des calculs quantiques. Les résultats montrent que l'HE d'*Ammoides verticillata* est riches en phénols (Thymol : 58,5 %) et les alcools mono- terpéniques caractérisent l'HE de *Laurus nobilis* comme le 1,8-Cinéole (30,1%) et α -terpynil acetate (21,6%), et l'analyse CPLH de l'extrait polyphénolique d'*Ammoides verticillata* a confirmé sa richesse en composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénolique). L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*A. Vertecillata* riche en thymol s'est révélée antibactérienne à faible concentration, elle inhibe la croissance des cinq souches bactériennes testées avec des zones d'inhibition de diamètres variables. Les extraits des deux espèces ont été trouvés comme des antioxydants efficaces puisque les valeurs des CI50 trouvées étaient légèrement inférieures à celle d'acide ascorbique. Les radicaux libres 6-OH et 5-OH de (+)-catéchine montrent leur stabilité moléculaire par rapport aux autres, le potentiel antioxydant de catéchine est principalement dû aux ces deux groupes, en raison de leurs valeurs de BDE extrêmement faibles mais plus grandes que celle d'acide ascorbique.

Mots-clés. *Ammoides verticillata* ; *Laurus nobilis* ; GC-MS ; CPLH ; Thymol ; 1,8-Cinéole ; CI50 ; BDE.

ABSTRACT

This study aims to determine the chemical composition of extracts of two medicinal plants of the Algerian flora "*Laurus nobilis*" and "*Ammoides verticillata*" as well as the determination of their antibacterial power in vitro on pathogenic and multiresistant strains and the evaluation of the antioxidant power in vitro and using quantum calculations. The results show that the EO of *Ammoides verticillata* is rich in phenols (Thymol: 58,5%) and the mono- terpene alcohols characterize the EO of *Laurus nobilis* such as 1,8 – Cineole (30.1%) and α -terpynil acetate (21.6%), and the HPLC analysis of the polyphenolic extract of *Ammoides verticillata* confirmed its richness in phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids). The antimicrobial activity of the essential oil of *A. vertecillata* rich in thymol was shown to be antibacterial at low concentrations; it inhibited the growth of the five bacterial strains tested with zones of inhibition of varying diameters. Extracts from both species were found to be effective antioxidants since the IC50 values found were slightly lower than that of ascorbic acid. The free radicals 6-OH and 5-OH show their molecular stability. The antioxidant potential of catechin is mainly due to these groups due to their extremely low BDE values but greater than that of ascorbic acid.

KEYWORDS. *Ammoides verticillata* ; *Laurus nobilis* ; GC-MS ; CPLH ; Thymol ; 1,8–Cinéole ; IC50 ; BDE.

الملخص

يهدف هذا العمل إلى تحديد التركيب الكيميائي لمستخلصات نباتين طبيين من الفلورا الجزائرية "*Laurus nobilis*" و "*Ammoides verticillata*" وكذلك تحديد قوتها المضادة للبكتيريا على السلالات المسببة للأمراض ومتعددة المقاومة. وتقييم فاعليتها كمضادات الأكسدة تجريبياً ثم باستخدام حسابات الكم. أظهرت النتائج أن EO الخاص بـ *Ammoides verticillata* غني بالفينولات Thymol (58.5%) وأن كحول التيربين الأحادي يميز EO لـ *Laurus nobilis* 1.8- Cineole (30.1%) و α -terpynil acetate (21.6%)، وأكد تحليل CPLH لمستخلص البوليفينول من أن *Ammoides verticillata* ثري بالمركبات الفينولية (الفلافونويد والأحماض الفينولية). النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري أثبت أن مادة *A. verticillata* الغنية بالثيمول مضادة للجراثيم بتركيزات منخفضة، كما أنها تثبط نمو السلالات البكتيرية الخمس المختبرة بمناطق تثبيط بأقطار مختلفة. تم العثور على المستخلصات من كلا النوعين كمضادات أكسدة فعالة لأن قيم IC50 كانت أقل قليلاً من تلك الموجودة في حمض الأسكوربيك. تُظهر الجذور الحرة OH-6 و OH-5 من الكاتشين ثباتها الجزيئي مقارنة بالآخرين، وتعزى إمكانات مضادات الأكسدة في الكاتشين بشكل أساسي إلى هاتين المجموعتين، نظرًا لقيم الإثيرات ثنائية الفينيل شديدة الانخفاض ولكن أكبر من تلك الموجودة في حمض الأسكوربيك. .

الكلمات الرئيسية: *Ammoides verticillata*; *Laurus nobilis*; GC-MS; CPLH;

Thymol ; 1,8-Cinéole ; CI50; BDE.

Introduction Générale

Introduction Générale

Depuis son existence sur terre, l'homme s'est appuyé sur la nature pour subvenir à ses nécessités de base à savoir la nourriture, l'habillement, l'abri et également pour ses besoins médicamenteux. En effet, la plupart des moyens découverts pour soigner et soulager les maux sont d'origine végétale. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie [1].

Les plantes médicinales et les produits biologiques constituent un véritable trésor de santé, de dynamique et de beauté pour l'organisme de l'être humain. Ces produits naturels sont très demandés à travers le monde, dont il est temps de multiplier nos efforts pour faire évoluer ce domaine par l'application des résultats des recherches scientifiques. Seule une petite partie de 420000 espèces végétales connues dans le monde était exploitée sur le plan phytochimique et pharmacologique [2], sachant qu'une espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents et d'intérêts variés.

L'Algérie, possède une position géographique particulière, accordant une large bande de végétation très variée notamment de plantes aromatiques médicinales. Par ces ressources naturelles, elle dispose d'une flore singulièrement aussi riche que variée. On compte environ 3000 espèces de plantes [3]. Une grande part de plantes inexplorées est encore immense. Ce qui offre éventuellement l'opportunité de découvrir des traitements pour des maladies encore dévastatrices et de proposer des alternatives thérapeutiques peu onéreuses avec moins d'effets indésirables.

Au cours de ces dernières années, les résultats des recherches conduites par les spécialistes (Médecins, biologistes, chimistes, pharmaciens, ethnologues, botanistes, agronomes, écologistes, économistes) concourent à démontrer les effets néfastes des médicaments à base des produits chimiques pour l'organisme de l'être humain et l'importance et l'efficacité des plantes médicinales et des produits provenant de l'agriculture biologique.

Selon, les données de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par

Introduction Générale

manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité [4]. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés poly phénoliques [5].

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydant et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles.

Les plantes aromatiques ont de nombreuses utilisations médicinales. Elles sont employées, soit sous leur forme naturelle, comme condiment et en pharmacopée traditionnelle, soit pour en extraire le principe actif, recherché par les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires [6]. Un grand nombre de plantes, aromatiques médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe et comprend généralement deux fractions : la première dite volatile (huile essentielle) obtenue essentiellement par hydro distillation ; la deuxième dite non volatile, obtenue principalement par macération en utilisant des solvants organiques. Cette dernière est généralement constituée de polyphénols.

Les huiles essentielles sont des substances naturelles riches en composés bioactifs dotés de propriétés thérapeutiques et biologiques intenses notamment comme antimicrobienne, antioxydant, analgésique, antiinflammatoire, anticancéreuse, antivirale et insecticides. C'est la raison pour laquelle de nombreuses études se sont

Introduction Générale

concentrées sur la recherche d'une nouvelle molécule d'origine naturelle dotée d'activités biologiques intenses avec un faible impact négatif sur la santé humaine.

Les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) qui appartiennent à la famille des antioxydants naturels parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercitrine.... Cette source de composés antioxydants est très intéressante, dont l'application peut s'étendre à des domaines comme la pharmacologie, la microbiologie médicale et clinique, la phytopathologie et la conservation des aliments [7].

Le stress oxydatif peut être considéré comme un processus chimique très complexe résultant à partir des molécules pro-oxydantes appelées les radicaux libres. Ces derniers sont produits chaque jour dans l'organisme et qui sont surveillés par les antioxydants [8]. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant /antioxydant [9]. Les antioxydants ont une grande importance dans les systèmes biologiques contre le stress oxydatif qui est la cause de différentes maladies et aussi responsable sur le vieillissement humain. Pour cette raison, il y a de nombreux travaux consacrés à des composés chimiques qui présentent une activité antioxydante. En raison de leurs radicaux stables et propriétés moléculaires, les antioxydants protègent efficacement les membranes cellulaires contre l'oxydation.

La recherche d'antioxydants naturels avec la vertu d'être non toxiques a donné lieu à un grand nombre d'études sur le potentiel antioxydant des substances naturelles. Ceci est particulièrement pertinent car la plupart des antioxydants synthétiques courants sont soupçonnés d'être potentiellement dangereux à long terme pour la santé humaine.

Dans ce contexte et dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques de l'ouest algérien et de la découverte de nouveaux antioxydants et des antibiotiques d'origine naturelle, nous nous sommes intéressés dans ce travail à étudier la composition chimique des huiles essentielles et des extraits polyphénoliques en adaptant les méthodes d'analyses et spectrales en fonction des besoins et étudiant les interactions entre les composés des deux plantes étudiées individuellement poussant spontanément dans l'ouest Algérien.

Introduction Générale

Deux plantes ont été sélectionnées pour leurs utilisations médicinales pouvant être en lien avec leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, il s'agit de *Laurus nobilis* et d'*Ammoides verticillata*. Les principaux objectifs de ce travail seront consacrés à la valorisation des huiles essentielles et polyphénols des deux plantes étudiées et cela par des tests des activités biologiques notamment l'activité antioxydante et antimicrobienne. Et enfin nous terminerons par l'analyse des propriétés antioxydantes d'un constituant majoritaire dans l'extrait polyphénolique d'*Ammoides verticillata*, dans cette partie nous avons utilisé les méthodes quantiques DFT (B3LYP) pour le calcul des descripteurs thermochimiques : l'enthalpie de dissociation de la liaison hydrogène (BDE), le potentiel d'ionisation (IP), le calcul des énergies et des densités des orbitales moléculaires frontières HOMO, ainsi que le calcul des densités de spin atomiques. L'étude théorique a été effectuée en solution dans le méthanol, les structures de départ ont été optimisées en phase gazeuse.

La présente thèse est subdivisée en deux parties, une partie théorique composée de trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique portant sur la phytothérapie, les plantes médicinales et leur constitution en métabolites secondaires en se basant sur les polyphénols et les huiles essentielles et ses différentes méthodes d'extraction. Ce chapitre décrit aussi l'utilisation de ces deux types de métabolites secondaires en tant qu'agents antioxydants naturels et dans la lutte contre les infections microbiennes ainsi que leur caractérisation en précisant les procédés d'échantillonnage, la préparation du matériel végétal et la méthodologie d'analyse développée.

Dans le deuxième chapitre une étude monographique est faite pour les deux plantes étudiées *Laurus nobilis*, et *Ammoides verticillata* en présentant leurs constituants chimiques, les paramètres environnementaux impliqués dans la variabilité de ces compositions et leurs Intérêts thérapeutiques.

Une étude bibliographique des méthodes quantiques est présentée dans le troisième chapitre ainsi que les approches théoriques de la réactivité chimique des molécules aromatiques.

Introduction Générale

Et une partie expérimentale composée de deux chapitres :

Matériel et méthodes est consacré à la description du volet expérimental développé dans notre travail, à savoir, le matériel utilisé, la démarche expérimentale et les méthodes employées pour réaliser l'extraction et l'évaluation des activités biologiques des extraits testés, ainsi que les logiciels et les méthodes de calculs utilisés dans la partie théorique.

Dans le chapitre résultats et discussion nous avons présenté les différents résultats obtenus sur les caractéristiques des huiles essentielles, la détermination des compositions chimiques des deux huiles essentielles et celle de l'extrait polyphénolique d'*Ammoides verticillata*, l'évaluation des pouvoirs antibactériens et antioxydants ainsi que les résultats théoriques trouvés pour la catéchine avec une explication du pouvoir antioxydant en la comparant avec l'acide ascorbique.

Enfin une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus à travers les études chimiques et biologiques des deux espèces étudiées et nous terminons par quelques perspectives.

Introduction Générale

Références :

[1] : Pourbaix, M., & Van Rysselberghe, P. (2000). Le Comité International de Thermodynamique et de Cinétique Electrochimiques (CITCE). *Electrochimica Acta*, 45 (15-16), XIII-XVI.

[2] : Waridel, P. (2003). Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L. (*Potamogetonaceae*) (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté des sciences).

[3] : Gaussen, H., Deuroy, J.F. and Ozenda, P. Précis de botanique II «les végétaux supérieurs». Ed : Masson ,1982; pp 215-408.

[4] : O.M.S, 2002.- Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° 4. 6 p.

[5] : Bahorun, T. (1998, March). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In Second Annual Meeting of Agricultural Scientists (Vol. 83).

[6] : Muanda, F. (2009). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three malian medicinal plant parts. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*

[7] : Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2576-2581.

[8] : Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants : experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-860.

[9] : Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4 (8), 118.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
PLANTES MEDICINALES :
COMPOSITION CHIMIQUE ET
INTERET BIOLOGIQUE

I. Plantes médicinales :

1. Définitions :

La matière médicale est à l'origine de l'étude de toutes les matières premières naturelles à usage médical. Actuellement encore appelée pharmacognosie, elle est le plus souvent limitée aux produits bruts d'origine végétale [1].

Les plantes sont dites médicinales, lorsqu'un de leurs organes possède des activités pharmacologiques, pouvant conduire à des emplois thérapeutiques [2]. On utilise généralement qu'une partie de la plante : la racine, la feuille, la fleur ...la plus riche en principe actif. Leurs extraits contiennent des produits végétaux dotés de composants pharmacologiquement actifs. Un seul constituant principal peut être actif ou, plus souvent, un mélange complexe de composants liés structurellement produit un effet combiné [3].

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration de médicaments [4], non seulement lorsque les constitutions de ces plantes sont utilisées directement comme agent thérapeutique, mais aussi comme matière première pour la synthèse de nouveaux médicaments [5].

Les médicaments à base de plantes sont des médicaments dont les principes actifs (PA) sont exclusivement des drogues végétales et/ou des préparations à base de drogue(s) végétale(s). Les drogues végétales sont des parties de plantes fraîches ou desséchées, utilisées à des fins thérapeutiques. On estime que 25% des médicaments prescrits sont produits à partir de principes actifs provenant des végétaux [6]. Cette ruée vers la médecine par les plantes peut s'expliquer par le fait que les plantes sont accessibles et abondantes, rendant ainsi la médecine par le traitement des plantes, abordable surtout dans les pays en voie de développement [7].

2. Terminologie :

Phytothérapie : Est un mot d'origine grecque : « phyto » qui veut dire plante et « therapeuein » qui veut dire soigner. Autrement dit, au sens étymologique, c'est « la thérapeutique par les plantes » ; elle utilise les plantes ou les formes immédiatement dérivées des plantes, en excluant les principes actifs purs issus de celles-ci. Les plantes sont consommées sous plusieurs formes : en l'état (infusions) ou après transformation (teintures, extraits, médicaments à base de plantes...) [8].

Plante médicinale : « Une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. Il s'agit de toutes plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles, également appelée « drogue végétale » [8]. Suivant Dragendorff, toute matière d'origine végétale utilisée pour soin est une plante médicinale.

Aromathérapie : Une branche de la phytothérapie, elle recourt aux extraits aromatiques des plantes (essences et huiles essentielles). Elle se différencie de la phytothérapie qui fait appel à l'ensemble des éléments contenus dans la plante.

3. Historique :

Pour calmer ses maux, l'homme s'est depuis toujours servi des plantes. Il leur a attribué des pouvoirs magiques, puis a appris peu à peu à discerner leurs propriétés.

L'histoire des plantes est beaucoup plus ancienne, elle est liée à celle de l'homme. Les anciens textes égyptiens font état de l'emploi de plantes médicinales, en Afrique du Nord, depuis des millénaires et le papyrus égyptien Ebers (environ. 1500 ans avant. J.C.), mentionne environ 700 herbes et nombreuses formules et indications [9]. Ce sont les égyptiens, 3150-1085 avant Jésus-Christ, de l'époque pharaonique, qui furent les premiers à avoir recours aux plantes aromatiques pour embaumer les morts, avec notamment un mélange d'huiles essentielles comme l'huile de cèdre et de basilic [10].

Lorsqu' il s'agit de l'histoire des plantes, il est fait souvent référence à la médecine grecque, Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine, recommandait déjà l'asperge et l'ail pour leurs vertus diurétiques, le pavot comme hypnotique et les feuilles de saule pour soulager douleurs et fièvre. Il indiquait les bains aromatiques dans le traitement des maladies de la femme [11]. Au début de notre ère, un autre grec, Dioscorides, qui était médecin et grand voyageur, dressa l'inventaire de 519 espèces de plantes et qui servira de référence dans la société Romaine et Arabe. Il établit le premier herbier des plantes médicinales, Traduit en arabe et en persan, ce traité intitulé « De materia medica » sera utilisé quelques siècles plus tard par les savants musulmans, qui influenceront les grandes universités de l'époque, notamment

celle de Montpellier, le centre européen le plus réputé en botanique [12], et citant aussi Galien (2^{ème} siècle).

Les arabes ont ainsi poursuivi les recherches sur les plantes médicinales en devenant les premiers à mettre au point la distillation des plantes, permettant d'en extraire l'huile essentielle, il y a de cela plus de mille ans [13].

4. Mode d'obtention et Conservation :

Des études scientifiques ont permis de définir le moment optimal de la récolte. Ainsi, sont récoltées de préférence [14] :

- Les racines au moment du repos végétatif (automne, hiver) ;
- Les parties aériennes, le plus souvent au moment de la floraison ;
- Les feuilles, juste avant la floraison ;
- Les fleurs à leur plein épanouissement, voir en bouton (aubépine) ;
- Les graines, lorsqu'elles auront perdu la majeure partie de leur humidité naturelle.

Pour assurer une bonne conservation, c'est-à-dire favoriser l'inhibition de toute activité enzymatique après la récolte, éviter la dégradation de certains constituants ainsi que la prolifération bactérienne, le séchage apparaît comme un élément primordial [14]. Les techniques de dessiccation sont diverses [15] :

- Au soleil et à l'air libre pour les écorces et les racines ;
- A l'abri d'une lumière trop vive pour les fleurs, afin d'éviter une modification de leur aspect, et parfois leur activité (huiles essentielles).
- Avec une température de séchage bien choisie, car la composition chimique peut varier selon les conditions.

Les plantes médicinales, rarement utilisées à l'état frais, doivent être conservées dans de bonnes conditions. Or, une fois récoltée, la plante se fane et meurt ; apparaissent alors des processus de dégradations souvent préjudiciables à l'activité thérapeutique des plantes [1].

5. Principe actif :

Le principe actif est une molécule contenue dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments. Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou séchées [16]. Donc, les principes actifs sont des composants naturels dans une plante médicinale ils sont souvent en quantité extrêmement faible de leur support végétal, ils sont mieux et totalement assimilés par l'organisme.

Il existe deux types de substances actives dans les plantes : celle du premier type produites par le métabolisme primaire (c'est le cas des saccharides principalement), sont des substances présentes dans toutes les plantes vertes grâce à la photosynthèse et qui leur sont indispensables pour vivre ; celle du seconde type sont des produits du métabolisme secondaire, qui résultent de processus ayant principalement leur origine dans l'assimilation de l'azote. Ces produits semblent parfois inutiles à la plante, mais leurs effets thérapeutiques sont remarquables.

II. Métabolite Secondaire :

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs composés naturels bioactifs appelés : les métabolites secondaires qui ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Ils interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes.

En plus des métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides, les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires ». Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : Les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (polyphénols). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies) qui possèdent une très large gamme d'activité biologique [17]. Ces composés sont émis en très faible quantité et accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante [18].

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, en raison de leur utilisation comme colorants, fibres, colles, huiles,

cires, agents aromatisants, des médicaments et des parfums, et ils sont considérés comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, des antibiotiques, insecticides et les herbicides [19].

1. Classification :

En se basant sur leurs origines biosynthétiques, Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles :

- Les composés phénoliques et poly phénoliques.
- Les terpènes (Huiles essentielles)
- Les alcaloïdes et composés soufrés.

1.1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques, ou polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement distribuée dans le règne végétal. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits ils font partie intégrante de notre alimentation. [20].

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques qui interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques. Ces composés montrent des activités biologiques intéressantes. D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme ces molécules jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé de consommateurs (effet anti oxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) [21].

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un noyau benzénique, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc [22]. Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités. A l'heure actuelle, plus de

8000 molécules ont été isolées et identifiées [23], réparties en une dizaine de classes chimiques.

Leur étude a été croissante ces dernières décennies en raison de leurs bienfaits sur la santé, notamment grâce à leur pouvoir antioxydant mais aussi dans la prévention ou le traitement de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives. Ils sont également utilisés en agroalimentaire, en cosmétique ou dans l'industrie pharmaceutique comme additifs.

Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines [24] :

1.1.1. Les acides phénoliques :

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques (C₆-C₁) et cinnamiques (C₆-C₃) (Figure I.1).

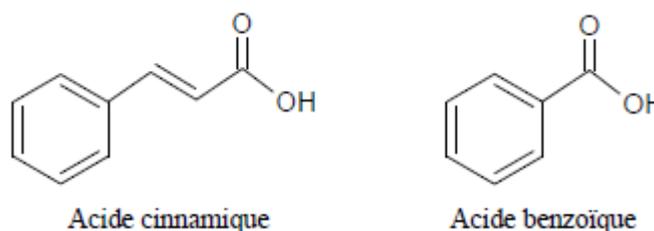


Figure I.1 : Structures des acides benzoïque et cinnamique.

- **Les acides benzoïques :**

IL s'agit de dérivés de l'acide benzoïque, ou une structure générale de base de type (C₆-C₁) qui existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides.

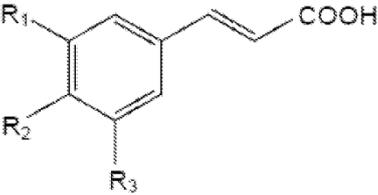
Tableau I.1 : principaux acides benzoïques.

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

• Les acides cinnamiques :

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C₆-C₃), ils existent souvent sous forme combinée avec les molécules organiques.

Tableau I.2 : principaux acides cinnamiques.

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide 4-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

La plupart des acides-phénols dérivés de l'acide cinnamique ont une distribution très large, mais les autres sont peu fréquents. Ils sont rarement rencontrés à l'état libre et forment souvent :

- Des esters d'alcools aliphatiques (comme les acides mono-et dicaféyl-tartriques des Vitacées).
- Des esters de l'acide quinique (comme l'acide chlorogénique).
- Des depsides (comme l'acide rosmarinique), spécifiques des Lamiacées et des Boraginacées.

Ils peuvent également être ramifiés (comme des dérivés de la spermidine), ou combinés avec des sucres : esters du glucose ou éther du glucose.

Le rôle physiologique et/ou écologique des acides-phénols est très mal connu. Leur intérêt thérapeutique potentiel est très limité : propriétés antiseptiques urinaires de l'arbutine, propriétés anti-inflammatoires des dérivés salicylés. Par ailleurs, plusieurs composés acides phénoliques sont antibactériens et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes [25].

1.1.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [26].

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées et leur nombre ne cesse d'accroître. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux unités aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle C [27]. En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : « anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones, auronnes ».

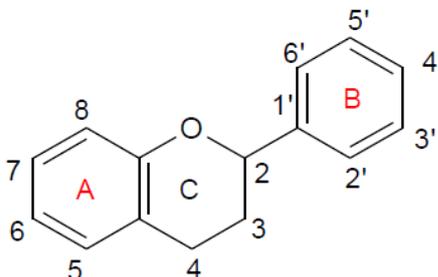


Figure I.2 : Structure de base des flavonoïdes.

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères [28].

On les distingue par le nombre et la position des groupements hydroxyles, par l'existence ou non de substituants sur la génine [25]. On les classe en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2 ou 3 (Figure I.3).

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé flavane.
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme isoflavane.
- Si la position 4 du flavane porte un groupement carbonyle, la molécule est appelée flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est en plus insaturée, le composé est nommé flavone.
- Si le squelette précédent est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de flavonol [29].

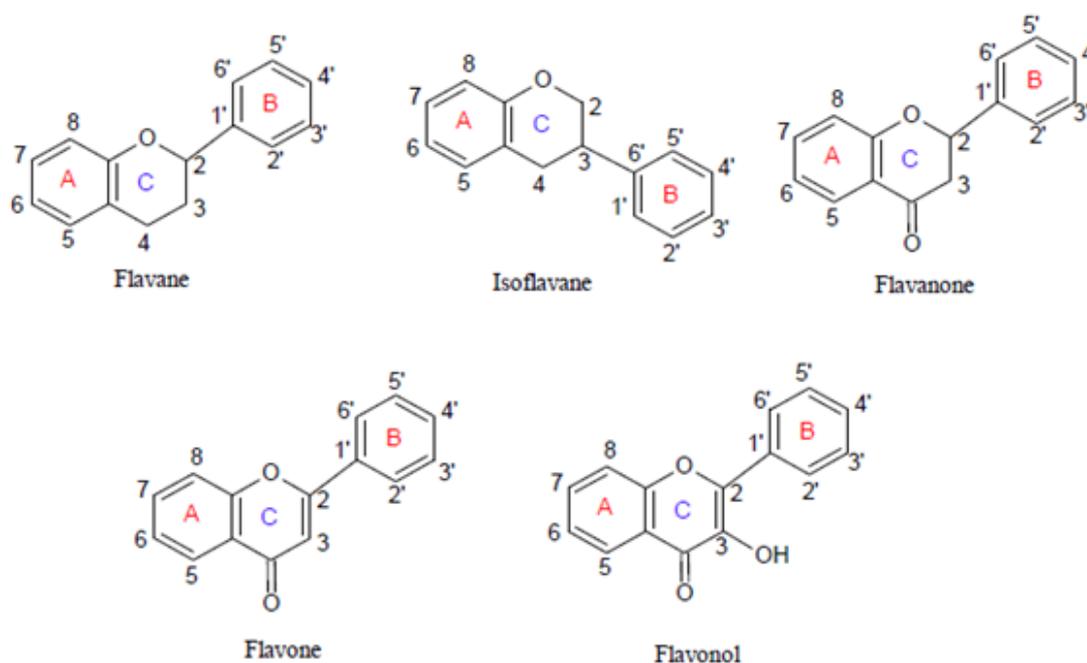
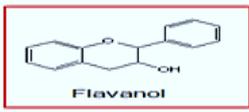
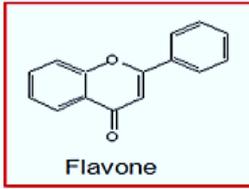
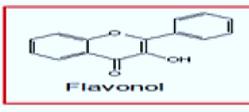
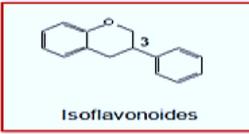
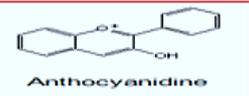


Figure I.3 : Quelques structures des flavonoïdes.

14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines [30] (Tableau III).

Tableau I.3 : Structures chimiques de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe [30].

Classe	Structure générale	Flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-Catechin	3,5,7,3',4'-OH
		(-)-Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4',5'-OH, 3-gallate
Flavone		Chrysin	5,7-OH
		Apigenin	5,7,4'-OH
		Rutin	5,7,3',4'-OH, 3-rutinoside
		Luteolin	5,7,3',4'-OH
		Luteolin glucosides	5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7'-glucose
Flavonol		Kaempferol	3,5,7,4'-OH
		Myricetin	3,5,7,3',4'-OH
		Tamarexiten	3,5,7,3'-OH, 4'-OMe
Flavanone (dihydroflavone)		Maringin	5,4'-OH, 7-rhamnoglucose
		Maringenin	5,7,4'-OH
		Taxifolin	3,5,7,3',4'-OH
		Eriodictyol	5,7,3',4'-OH
		Hesperidin	3,5,3'-OH,4'-Ome, 7-rutinoside
Isoflavonoïdes		Genistin	5,4'-OH, 7-glucose
		Genistein	5,7,4'-OH
		Daidzen	4'-OH, 7-glucose
		Daidzein	7,4'-OH
Anthocyanidin		Apigenidin	5,7,4'-OH
		Cyanidin	3,5,7,4'-OH, 3,5-OMe

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquitaires des plantes. Ils possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs ; les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs et fruits des plantes [31].

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques [25].

La principale propriété biologique reconnue des flavonoïdes est d'être « veino-actifs » (veinotrope, vitaminique « P ») c'est-à-dire qu'ils permettent de diminuer la

perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance [25]. Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco biologiques comme entre autres des effets, antivirales, antimicrobiens et anticancéreux [32] antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépatoprotecteurs. Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels.

1.1.3. Les tanins :

Depuis l'Antiquité Utilisés par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, d'où le terme tanin dérivé de la capacité de tannage de la peau animale c'est-à-dire de la rendre imputrescible en la transformant en cuir par le dit composé. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Les tanins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et de leurs produits dérivés. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire, sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments [33]. Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelquefois combinés aux protéines et aux alcaloïdes [34].

Il est classique de distinguer chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins, différents à la fois par leur structure aussi bien que par leur origine biogénique, et leur réactivité chimique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [35].

1) Tanins galliques ou hydrolysables :

Ce sont des oligos ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénol est soit l'acide gallique d'où le nom des tanins galliques, soit l'acide hexa-hydroxy-di-phénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (dé-hydro-hexa-hydroxy-di-phénique (DHHDP) ; acide chébulique) [25].

Les tanins hydrolysables sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcalin ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors

une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique soit un dimère de ce même acide, l'acide phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique). Une forme simple de ce type de tanin est le pentagalloyglucose, molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes, par exemple la castalagine chez le châtaignier ou le chêne [35].

2) Tanins catéchiques ou condensés :

Ce sont des polymères flavaniques des oligomères ou des polymères. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ol liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4-8 ou 4-6, résultante ou couplage entre le C-4 électrophile d'un flavanyle issu d'un flavan-3,4-diol et une position nucléophile (C-8, plus rarement C-6) d'une autre unité, généralement un flavan-3-ol [25]. Dérivés de la catéchine ou de nombreux isomères et constituent la classe des tanins catéchiques. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seul des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigment rougeâtre et, pour cette raison, ils sont dénommés "proanthocyanidines". Lorsque les liaisons interflavaniques (intermonomérique) sont de type C-C, positionnées en 4 sur une des unités et en 6 et en 8 sur la second, les tanins sont dits de type B. Les tanins de série A possèdent une liaison interflavanique supplémentaire de type éther [35].

Les tanins condensés sont très abondants dans certains organes végétaux consommés ou utilisés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise...).

De nombreuses études ont montré l'activité antibactérienne des tanins. Ces molécules ont été rapportées comme bactériostatiques ou bactéricides, la croissance de plusieurs bactéries, virus, champignons et levures est inhibée par les tanins [36].

1.1.4. Les coumarines :

Ce sont des dérivés de la benzo α -pyrone. La coumarine (Figure I.4) proprement dite, a été isolée en 1820, pour la première fois, de la fève Tinka, *Coumarona adorata* (Légumineuse). C'est la lactone de l'acide hydroxy-cinnamique.

Elles sont les très répandues dans le règne végétal, et possèdent des substitutions (OH ou OCH₃) en position 6 et 7 [37].

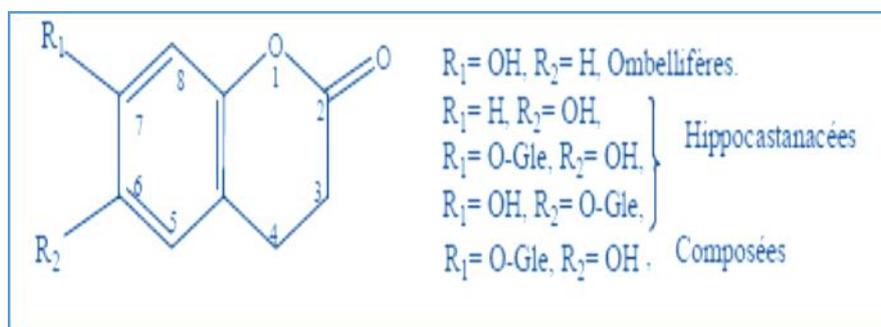


Figure I.4 : Structure générale d'une molécule de coumarine [37].

Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres, de saveur généralement amère, certaines sont sublimables et entraînaibles à la vapeur d'eau. Les hétérosides et les génines sont assez solubles dans l'eau et l'alcool. Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Leur spectre U.V est également caractéristique et sert à leur identification.

Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone par son ouverture et sa solubilisation en milieu alcalin puis, par fermeture en milieu acide pour la régénérer [37].

La coumarine est connue pour ses propriétés anti-œdémateuses, pour améliorer les symptômes en rapport avec l'insuffisance veino-lymphatique (confirmée en pharmacologie clinique).

1.2. Les composés azotés (Alcaloïdes) :

Les alcaloïdes représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, ce sont des composés cycliques contenant un ou plusieurs atomes d'azote [38], typiquement comme les amines primaires, secondaires, ou tertiaires et cela confère la basicité à l'alcaloïde, en facilitant leur isolement et purification comme sels solubles dans l'eau formés en présence des acides minéraux. Pourtant, le degré de basicité varie beaucoup, selon la structure de la molécule d'alcaloïde et la présence et l'endroit des autres groupes fonctionnels.

Le terme alcaloïdes a été introduit par W. Meisner en 1818, il est utilisé pour désigner des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin. Il provient de l'arabe alkaly, et la sonde et du grec eidos, (l'aspect).

En 1803, DEROSNE a isolé le premier alcaloïde semi-pur du latex sec de l'opium (*Papaver somniferum*), une drogue utilisée depuis des siècles pour des propriétés analgésiques et narcotiques. En 1805, SERTÜRNER a caractérisé cet alcaloïde et l'a nommée morphine, et puis, entre 1817 et 1820 plusieurs alcaloïdes comme la strychnine, brucine, et quinine ont été isolés sous forme cristalline [39].

III. Avant quelques années, la majeure source des alcaloïdes était les plantes à fleurs, les angiospermes, où 20% des espèces y contiennent [39]. Depuis leur découverte et jusqu'à maintenant plus de 10.000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés chez les plantes, les champignons et même les animaux, pour cela et à cause de la grande diversité de ce groupe de métabolites, leur classification est basée sur plusieurs critères : l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure et les propriétés spectroscopiques/spectrométriques (chromophores dans la spectroscopie UV) [40].

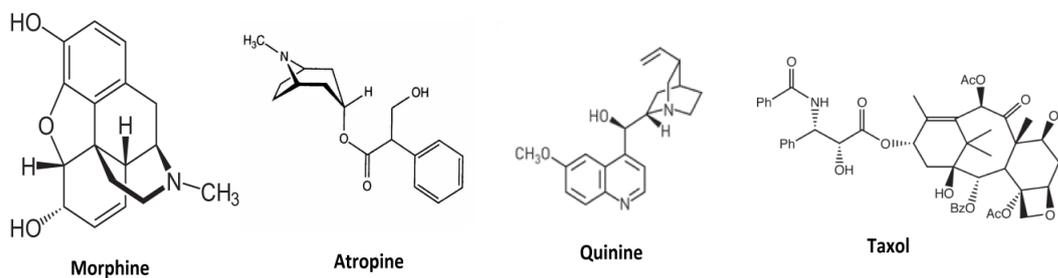


Figure I.5 : Quelques structures des alcaloïdes.

Les alcaloïdes ne sont pas tous dérivés des acides aminés, Ils sont classés en groupes, selon leur précurseur biosynthétique. On distingue généralement :

- Les alcaloïdes vrais qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle.
- Les proto-alcaloïdes qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique.
- Les pseudo-alcaloïdes qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

IV. L'activité biologique de beaucoup d'alcaloïdes dépend souvent de la fonction amine étant transformée en système quaternaire par ionisation aux pH physiologiques [19]. Les alcaloïdes exercent généralement leurs activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'homme. Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, Ils jouent plusieurs activités pharmacologiques : Analgésique (cocaine), anti-cholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (reserpine), antitussive (codeine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaine), narcotique (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (ephedrine), ect... [40]. Plusieurs alcaloïdes servent de model pour la synthèse d'analogues avec des propriétés meilleures.

1.3. Les composés terpéniques (Huiles Essentielles) :

Ce sont les molécules les plus banales constituant les HE dont le squelette carboné est composé de molécules d'isoprènes arrangées en cycle ou de façon linéaire. Elles sont formées à partir d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) (Figure I.6).

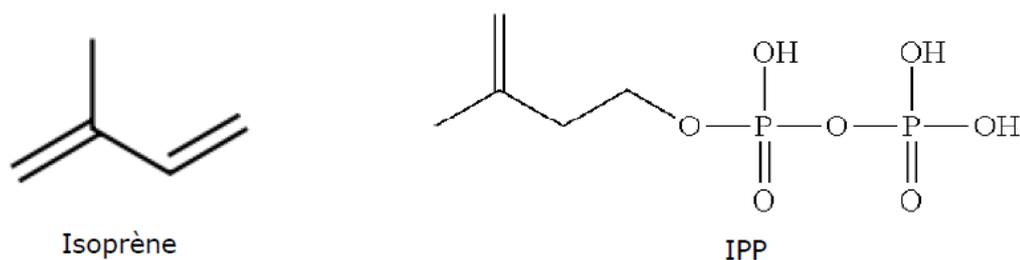


Figure I.6 : Structures d'isoprène et d'isopentenyl pyrophosphate (IPP).

Elles sont classées en fonction du nombre d'unités isopréniques n qu'elles comprennent :

- $n = 1$: monoterpènes à dix atomes de carbone ;
- $n = 2$: sesquiterpènes à 15 atomes de carbone ;
- $n = 3$: diterpènes avec 20 carbones, rarement retrouvés dans les HE.

Les monoterpènes sont les plus retrouvés car il faut savoir que plus une molécule contient d'atomes de carbones, plus elle sera « lourde » et donc difficile à extraire lors de la distillation.

Les terpènes constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques des végétaux, avec près de 15.000 structures moléculaires connues. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui les composent ainsi que dans les divers modes d'assemblage [41].

Les terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. Le triterpénoïde, l'acide betulinique est de juste un de plusieurs terpénoïdes qui ont montré une action inhibitrice envers le HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles [46].

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges très complexes et variables, de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpènes volatils de formule générale $(C_5H_8)_n$ et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [22]. Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) [42]. On retrouve plus d'un millier de composants chimiques dans les huiles essentielles.

On trouve dans la littérature plusieurs définitions des huiles essentielles, Selon la pharmacopée européenne [42] : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

On appelle huile essentielle ou parfois « essence végétale » le liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, offrant une forte concentration en principes actifs [43], obtenue par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec. Contrairement à ce que suppose la dénomination, ces extraits ne sont pas forcément huileux. La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut ainsi une très grande quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles.

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles telles que : les Conifères, les Rutacées, les Umbellifères, les Myrtacées, les Lamiacées, les Poacées.

Elles sont présentes dans différents organes végétaux producteurs, variant en fonction de la zone productrice du végétal [44] : les sommités fleuries (ex : lavande, menthe...), dans les racines ou rhizomes (ex : vétiver, gingembre), dans les écorces (ex : cannelles), le bois (ex : camphrier), les fruits (ex : citron), les graines (ex : Muscade) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches [45].

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes. La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C10) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesqui-terpénoïdes (C15) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles. Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine [46]. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (Figure I.7).

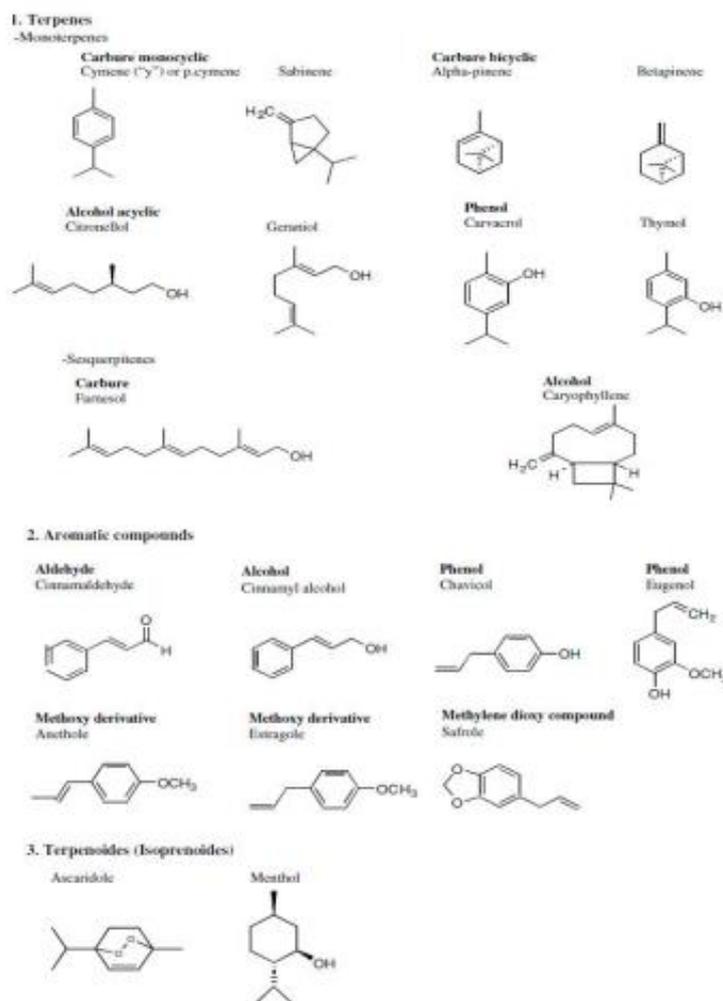


Figure I.7 : Les classes des constituants des huiles essentielles.

Les huiles volatiles qui renferment des molécules aromatiques trouvent de très larges applications dans le traitement de toutes pathologies allergiques et inflammatoires. Toutes les éruptions et irritations cutanées, les crises d'asthme, les artérites, épicondylites... En 1977 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries [46].

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs [47]. Les huiles essentielles

agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire [48]. Il existe cependant quelques exceptions.

La bactérie reconnue comme la moins sensible à leur effet reste néanmoins les bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*. En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *Pseudomonas aeruginosa* deviennent actives [49]. Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles [50].

1.3.1. Caractères physico-chimiques :

A température ambiante, les huiles essentielles sont liquides sauf la Myrrhe et le Santal qui peuvent être visqueuses ainsi que la Rose et le Camphrier qui peuvent être cristallisées [51], mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Leur volatilité est liée à leur caractère odorant.

A basse température, certaines cristallisent comme par exemple les huiles essentielles d'Anis, de Menthe des champs ou de Thym saturéoïde.

Les huiles essentielles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaibles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau [42]. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées : ex : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée [45].

1.3.2. Conservation :

Les HE sont relativement stables et peuvent garder leurs propriétés pendant plusieurs années en respectant quelques conseils :

- ❖ Conservation du flacon à une température entre 5°C et 35°C, à l'abri de la lumière ;
- ❖ Conservation des HE dans un flacon en verre teinté protégé par un conditionnement en carton ou en métal dans l'idéal ;
- ❖ Garder le flacon bien scellé par un bouchon étanche pour éviter l'évaporation.

Les deux principaux risques à surveiller lors du stockage des HE sont la volatilité des HE et l'instabilité des molécules (coupure oxydative, hydrolyse...). En respectant les conseils énumérés ci-dessus, les HE se conservent pendant au moins 5 ans. Les HE d'agrumes se conservent un peu moins longtemps (3 ans) car elles s'oxydent plus rapidement. En cas d'ajout d'une HV à des HE, le mélange doit être utilisé dans les 3 ans en raison du rancissement possible de l'HV [10].

2. Procédés d'extraction :

Un procédé de séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts.

Les buts de ce type de procédé peuvent être divers :

- Purification : des impuretés doivent être extraits du composé d'intérêt
- Concentration : élimination d'une partie du solvant
- Fractionnement : séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique. Cette technique utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques. Le principe d'un procédé de séparation est d'utiliser une différence de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange. Plus la différence de propriété sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi le choix du procédé de séparation commence par une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés des différents composants.

Les procédés d'extraction classiques à partir de la matière végétale sont souvent réalisés dans des installations spécifiquement pour chacune d'entre elles [52]. La recherche d'un nouvel équipement répondant aux critères suivants :

- Extraire et isoler un produit de bonne qualité
- Minimiser le temps d'extraction
- Être flexible et adaptable à la diversité de la matière première
- Définir l'utilisation du réacteur assisté par induction thermomagnétique directe dans le domaine des extractions de métabolites secondaires.

a. Extraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide est une mise en œuvre de l'extraction par transfert entre deux phases liquides. Un mélange binaire ou plus dont on veut effectuer la séparation est mis en contact avec un autre liquide non miscible appelé solvant et retenu pour sa capacité à extraire sélectivement l'un des éléments du mélange. Après l'opération, on récupère deux phases séparées par décantation : l'extrait formé du solvant enrichi en soluté, et le raffinat, soit le mélange appauvri en soluté. Cette opération, ordinaire dans l'industrie chimique, permet de séparer des produits ayant des températures d'ébullition très voisines (donc une distillation trop délicate) mais ayant des propriétés physico-chimiques différentes. Au laboratoire, c'est aussi une technique de purification très employée : dans une ampoule à décanter, les deux liquides séparent les solutés en fonction de leur solubilité dans chaque solvant [53].

b. Extraction solide-liquide :

Il s'agit d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant. Les cas les plus simples correspondent à la décoction, l'infusion et la macération. En chimie organique.

c. Techniques utilisées pour extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques. Dans le cas des huiles essentielles, d'une façon générale, l'extraction de la plante fraîche ou sèche est faite par entraînement à la vapeur d'eau. Cette méthode est un procédé de séparation basé après condensation sur la différence de composition

entre l'eau et la vapeur produite pendant l'exécution de l'opération unitaire [54]. La durée de la distillation peut être ramenée de quelques minutes jusqu'à 30 heures, davantage, suivant les paramètres intervenant au cours du procédé.

➤ **Extraction par entraînement à la vapeur (Hydrodistillation) :**

Est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles [55]. Le matériel végétal est en contact direct avec l'eau. L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de la température de distillation ; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition. La montée de la chaleur permet l'éclatement des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [22]. Selon l'épaisseur des tissus du matériel végétal, cette technique peut prendre plus ou moins de temps selon la polarité des constituants.

Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode est la non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de de la couleur, de l'odeur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation [56]. Cette méthode est généralement indiquée pour les huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants.

La présence de l'eau dans l'hydrodistillation peut entraîner des phénomènes d'hydrolyse, phénomènes limités par l'absence de contact entre le végétal et l'eau dans la distillation à la vapeur d'eau. Ceci explique la moindre utilisation de l'hydrodistillation.

3. Méthodes d'analyse :

La complexité des extraits de plantes nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules d'intérêt. Différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation des produits naturels. La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La séparation des composants

entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et désorptions successives sur la phase fixe, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase [57]. Plusieurs méthodes existent, nous avons employées pour l'analyse qualitative et/ou quantitative des différents constituants des deux plantes étudiées : la chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), la chromatographie en phase gazeuse (GC, Gas Chromatography) couplée avec la spectrométrie de masse CPG-SM.

3.1. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) :

La chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC - High Performance Liquid Chromatography est plus fréquemment utilisée) est une technique de séparation analytique qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection. Outre ces avantages, cette technique peut être utilisée selon plusieurs modes de séparation en fonction des caractéristiques physico-chimiques des analytes à séparer dont le mode dit phase normale (NP, Normal Phase) dans lequel la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, et le mode dit phase inverse (RP, Reversed Phase) dans lequel les polarités sont inversées [58].

D'une manière générale l'HPLC, est basée sur l'hydrophobicité des molécules ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide sous pression environ 70 bar (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.) [59].

3.2. Analyses utilisées pour identification des huiles essentielles :

Quel que soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques [60]. La plus utilisée pour identifier les huiles essentielles puisque sont des molécules volatiles est la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

❖ Analyse structurale par Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La GC a été employée pour l'analyse et l'identification des composés volatils, cette technique est particulièrement adaptée à l'analyse de molécules de faible poids moléculaire et/ou à caractère hydrophobe facilement volatilisables, après une étape de dérivatisation. Elle permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir). Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur [61]. Ainsi elle peut être couplée à un détecteur de spectrométrie de masse.

❖ Analyse structurale par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM) :

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique. Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse [22]. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres [62].

4. Activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne d'huile essentielle et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médicales et agro-alimentaires. Le premier rapport des propriétés antimicrobiennes des épices est apparu en 1880 et concernait la moutarde, le clou de girofle, la cannelle et leurs huiles. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc. Quelques-uns de ces composés sont décrits à la figure I.8 [46].

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [17].

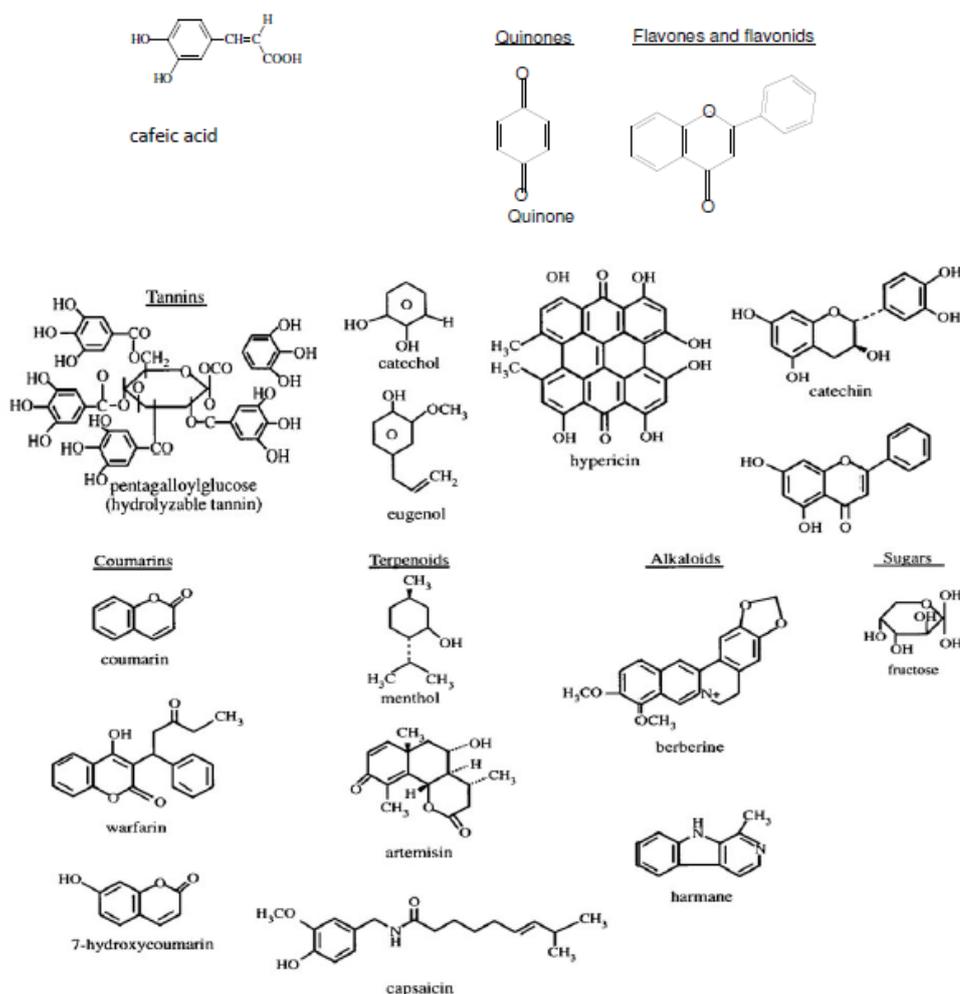


Figure I.8 : Structures chimiques de quelques composés antimicrobiens des plantes [46].

Pour évaluer l'activité antimicrobienne d'une substance naturelle ou d'un extrait végétal les méthodes communément employées sont réalisées par dilution ou par diffusion. La méthode de dilution, qui peut être effectuée en milieu liquide ou en milieu solide, consiste à mettre un inoculum microbien au contact de concentrations croissantes de l'échantillon. Le degré d'inhibition de la croissance microbienne détermine le pouvoir antimicrobien des substances testées. La méthode de diffusion, exclusivement réalisée sur milieu solide, consiste à déposer un disque de papier absorbant préalablement imprégné de l'échantillon sur une géloseensemencée avec l'inoculum microbien. Les molécules actives diffusent à partir des disques et la présence d'une zone d'inhibition, dans laquelle il n'y a pas eu de croissance, indique la présence de molécules actives à l'égard du micro-organisme testé.

4.1. Les agents antimicrobiens :

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes. Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus fort que les dommages qu'elles causent à l'organisme; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme [63].

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et leur spécificité d'action qui peut être germicide ou germistatique :

✓ Action germicide :

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent antichampignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti- protozoaires) [64].

✓ Action germistatique (bactériostatique et fongistatique) :

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer (bactérie ou champignon). Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès

que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue [64].

Il existe trois types d'agents antimicrobiens : physiques, chimiques et chimio thérapeutiques.

4.1.1. Agents physiques :

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. D'autres agents moins agressifs, comme la dessiccation limitée sont utilisés à d'autres fins. Les principaux agents physiques sont la chaleur, les radiations (micro-ondes, rayons ultra-violets, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha ; rayons X). Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application [64].

4.1.2. Agents chimiques :

Ils correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Les désinfectants sont des agents antimicrobiens utilisés sur les matériaux inertes ; leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les antiseptiques ont la même nature chimique que les désinfectants mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur les tissus vivants. Les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés sont les alcools, les composés phénoliques qui agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires, les aldéhydes, les halogènes et les détergents [64].

4.1.3. Agents chimio thérapeutiques :

Un agent chimio thérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux [65].

4.2. Activité anti bactérienne :

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires).elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique [66].

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique). Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Mais la très grande utilisation souvent inadaptée de ces molécules antibactériennes a entraîné la sélection de souches multi-résistantes. Ce phénomène de résistance aux antibiotiques est général et concerne toutes les espèces bactériennes et ne cesse d'augmenter, il est devenue une véritable préoccupation [67]. La résistance des bactéries aux antibiotiques est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveau agents antibacteriens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) [68].

Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les Phénols, les terpènes ou terpénoïdes ont aussi des effets contre les bactéries et différents autres germes causant des problèmes dans le domaine médicale et agroalimentaire. Cependant le mécanisme de l'action de ces terpènes n'est pas entièrement compris et qu'il peut être s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles [46]. D'une manière générale, l'action des huiles essentielles se déroule en trois phases :

- ✓ Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
 - ✓ Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;
 - ✓ Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.
- **Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) :**
La construction des courbes de croissance in vitro en présence de concentration croissante en agents antimicrobiens permet de définir des concentrations limites : c'est-à-dire la concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance visible.

La concentration inhibitrice 50 % ou CMI correspond à une croissance égale à la moitié de la croissance du témoin et la concentration minimale bactéricide (la CMB) correspond à la concentration permettant de tuer tous les micro-organismes. Celle-ci est appréciée par étalement après culture. Ces méthodes sont adaptables aussi bien aux antibiotiques qu'à d'autres substances bactéricides [64].

5. Activité antioxydante :

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [69].

5.1. Le stress oxydant :

Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de défense antioxydant de l'organisme. La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive, il peut être un élément potentiellement toxique en l'absence de mécanismes de défense. C'est ce que l'on appelle le stress oxydatif.

Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote ($NO\cdot$), le radical peroxyde ($ROO\cdot$) et le radical

alkoxyde ($\text{RO}\cdot$). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires telles que l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Collectivement connu sous le nom d'oxygène actif [70].

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs pathologies : cancer, maladies cardiovasculaires, maladies dégénératives) ainsi qu'un vieillissement prématuré, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète [71]. Une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydatif est la mort cellulaire programmée ou apoptose.

5.2. Les radicaux libres :

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou, un pouvoir oxydant fort. Il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe. C'est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins [72]. Les espèces radicalaires sont électrophiles et vont chercher à arracher un électron à une molécule voisine afin d'apparier leur électron célibataire. Cet état est donc seulement transitoire, de l'ordre de la microseconde, car le radical va soit accepter un autre électron, soit transférer le ou les électrons libres sur une autre molécule (lipide, protéine, acide nucléique) afin de rapparier son ou ses électrons célibataires et d'obtenir ainsi un état plus stable [73]. Il s'agit donc d'un intermédiaire de réaction. Cela va entraîner une réaction en chaîne qui va produire de nouveaux radicaux libres car la molécule agressée par le radical libre devient à son tour radicalaire.

Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme. En effet, ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à l'apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, au fonctionnement

de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes [70]. L'organisme en produit en continu.

5.3. Les antioxydants :

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder inhibent ou ralentissent l'oxydation des substrats biologiques. Les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. Un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules, c'est une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme [74].

Selon **Berger (2006)**, la stabilité de la structure des antioxydants leur permet d'agir pour former des produits finis non radicaux en [75] :

- réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras;
- absorbant l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur;
- s'oxydant lui-même plus rapidement qu'un substrat à risque d'oxydation.

5.3.1. Types d'antioxydants :

Les antioxydants sont présents sous de nombreuses formes, Ils peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres.

Il existe deux classes d'antioxydants : les endogènes et les exogènes :

➤ Antioxydants endogènes :

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire [76].

➤ Antioxydants exogènes :

La deuxième partie permet d'appréhender les antioxydants exogènes qui sont, par définition, apportés de l'extérieur, de nombreuses molécules issues de notre

alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels,...etc. sont considérés comme des antioxydants. Notons à titre d'exemples, les plus courants : La vitamine E ou α -tocophérol, La vitamine C ou acide ascorbique.

Les antioxydants sont classés selon leur origine en antioxydants naturels ou synthétiques et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination (antioxydants primaires et secondaires).

➤ Antioxydants naturels :

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydant in vivo. Elles incluent le bêtacarotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [77].

Il est bien évident qu'une alimentation saine et équilibrée assure un apport considérable d'antioxydants naturels pour le bon fonctionnement de l'organisme humain, surtout lors de la consommation de fruits, de végétaux, de céréales, de la viande et du poisson. Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) qui appartiennent à la famille des antioxydants naturels parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercitrine....Cette source de composés antioxydants est très intéressantes, dont l'application peut s'étendre à des domaines comme la pharmacologie, la microbiologie médicale et clinique, la phytopathologie et la conservation des aliments [78].

Le mécanisme de piégeage des radicaux libres par les polyphénols se fait par le transfert de l'atome d'hydrogène (H-atom transfer ou HAT). Le radical libre est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R•).



Le radical ArO• ainsi formé sera stabilisé :

- par délocalisation des électrons π ,
- par un nouveau transfert d'atome d'hydrogène conduisant à la formation de quinone

- ou bien par réaction avec un autre radical libre.

➤ **Antioxydants synthétiques :**

Il existe des radicaux libres non biologiques « synthétiques », qui vont permettre d'évaluer l'activité antioxydant de composés. Parmi ces radicaux, on peut citer le radical DPPH (1,1- diphényl-2-picrylhydrazyle) ainsi que le radical cation ABTS+• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la gallate propylée (PG) et le tetra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [79].

➤ **Antioxydants primaires :**

Ils englobent les composés qui interfèrent avec l'oxydation lipidique en convertissant les produits d'oxydation lipidiques (L% LOO, LO) en produits plus stables (LH, LOOH, LOH) grâce à leur propriété de donneurs de protons actifs. Le radical (A») dérivé de l'antioxydant se convertit en produit stable [80].

➤ **Antioxydants secondaires :**

Selon **Gordon (1990)**, les antioxydants secondaires sont des composés qui retardent l'oxydation lipidique selon différents modes d'action [81] :

- Absorption des radiations ultraviolettes ;
- Inactivation de l'oxygène singulet ;
- Chélation des métaux ;
- Décomposition des hydro peroxydent.

5.4. Evaluation de l'activité antioxydante (La méthode de DPPH) :

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire. Afin d'évaluer l'activité anti-oxydante, il existe plusieurs méthodes de détermination de l'activité antioxydante. Parmi ces tests, nous présenterons celui couramment cité et qui a été utilisé au cours de notre étude : la réduction du radical libre 2,2-diphényl-1-picryl-

hydrazyl (DPPH•). Cette dernière est la plus utilisée en raison de la simplicité de l'analyse.

Le potentiel anti radicalaire d'une substance, peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tel que le DPPH• [82], abréviation du composé chimique 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) qui est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque [83]. Cette méthode consiste à mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le radical chimique DPPH• par transfert d'un hydrogène en formant une liaison moléculaire stable (Figure I.9). Ceci se traduit par la décoloration du DPPH• initialement violet, pour se transformer en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine ayant une coloration jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant.

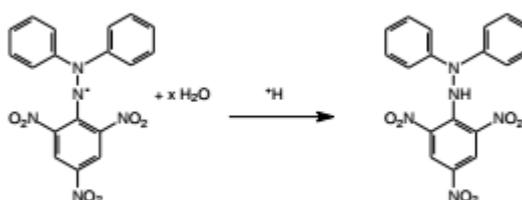


Figure I.9 : Principe du test DPPH.

Un paramètre est par la suite déterminé à savoir l'IC₅₀, qui correspond à la concentration de l'extrait requis pour diminuer de 50% la concentration initiale de DPPH•. L'activité antioxydante de cet extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition.

Références :

- [1] : Paris, M., Hurabielle, M., & Paris, R. R. (1981). Abrégé de matière médicale : Monographies (2. Partie) : plantes actives sur le système nerveux, sur l'appareil digestif, plantes cardiotoniques, plantes antiparasitaires, plantes insecticides, antibiotiques et antitumoraux d'origine végétale. Masson.
- [2] : Sofowora, A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Paris, France, KARTHALA Editions, 378 p.
- [3] : Edzard, E., & Max, H. P. (2005). Médecines alternatives le guide critique. *Ed Elsevier SAS*, 524p.
- [4] : Decaux, I. (2002). Phytothérapie : mode d'emploi. Ed : Le Bien Public, 6-7.
- [5] : AMEENAH, G. (2006). Plantes médicinales : traditions d'hier et drogues de demain. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- [6] : Hostettmann, K., Potterat, O., & Wolfender, J. L. (1998). The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimia International Journal for Chemistry*, 52(1-2), 10-17.
- [7] : O.M.S, 2002.- Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° 4. 6 p.
- [8] : Gazengel, J. M., & Orecchioni, A. M. (2013). Le préparateur en pharmacie. Guide théorique et pratique (2ème Edition. Ed. Lavoisier Paris), 374.
- [9] : Baba Aissa, F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident", Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger.
- [10] : Abrassart, J. L. (1997). Aromathérapie essentielle : huiles essentielles et parfums pour le corps et l'âme. G. Trédaniel.
- [11] : Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
- [12] : Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., ... & Botrel, A. (2001). Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins. Editions Larousse, Paris, 15.
- [13] : Nogaret, A. S. (2011). La phytothérapie : se soigner par les plantes. Editions Eyrolles.
- [14] : Wichtl, M., & Anton, R. (1999). Plantes thérapeutiques : tradition, pratique, officinale. Science et thérapeutique. Edition française.
- [15] : Kalla, A. (2012). Étude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien.
- [16] : Benganou, M. (2012). La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical CHETTIA (Alger), 56.
- [17] : Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

- [18] : Toure, D. (2015). etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de côte d'ivoire (Doctoral dissertation, Université Felix Houphoet Boigny, Côte d'Ivoire).
- [19] : Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons.
- [20] : Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de l'INRA, 79-82.
- [21] : Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
- [22] : Bruneton J., 1999.- Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- [23] : Lugasi, A. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. Acta biologica szegediensis, 47(1-4), 119-125.
- [24] : Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathe, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. Biomedicine & pharmacotherapy, 56 (4), 200-207.
- [25] : Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Tec & Doc/Lavoisier, Paris, 279-281.
- [26] : Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie, 3(4), 162-169.
- [27] : De-Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Udo, A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of chromatography A, 1112(1-2), 31-63.
- [28] : Dacosta, Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta.
- [29] : Bouakaz, I. (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala* (Doctoral dissertation, Batna, Université El Hadj Lakhder. Faculté des sciences de l'ingénieur).
- [30] : Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of nutritional biochemistry, 13(10), 572-584.
- [31] : Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A., & Mornar, A. (2004). Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. Croatica chemica acta, 77(1-2), 361-366.
- [32] : Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry, 67(18), 2058-2070.

- [33] : Alkurd, R. A. A., Takruri, H. R., & Al-Sayyed, H. (2008). Tannin contents of selected plants used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), 265-274.
- [34] : Catier, O., & ROUX, D. (2007). *Botanique pharmacognosie phytothérapie*. Paris 3^e édition. Pp113. ISBN : N 2915585520.
- [35] : Sarni-Manchad, P., & Cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*, Éd Tec & Doc. Coll. Sci. & Techn. Agroaliment., Lavoisier, Paris.
- [36] : Chung, K. T., Wei, C. I., & Johnson, M. G. (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 168-175.
- [37] : BOUHADJERA, K. (2005). Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* r. br. et *Aristida pungens* l. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- [38] : Wink, M., & Roberts, M. F. (Eds.). (1998). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Plenum Press.
- [39] : Walton, N. J., & Brown, D. E. (1999). *Chemicals from plants : perspectives on plant secondary products*. World Scientific.
- [40] : Hesse, M. (2002). *Alkaloids : naturels curse or blessing*. John Wiley & Sons.
- [41] : Belbache, H. (2003). *Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de Centaurea Parviflora Desf. Mémoire de Magister en chimie organique, Université Mentouri Constantine*. p, 16-20.
- [42] : Pharmacopée européenne. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). *Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles*. Mai 2008.
- [43] : Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
- [44] : Lamendin, H. (2004). *Huiles essentielles en diffusion atmosphérique*. *Chir. Dent.* Fr1185, 78-80.
- [45] : Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 18-21.
- [46] : Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564.
- [47] : Oussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessenn, K. N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanova, J. (2008). *Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux*

plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24(1), 94-103.

[48] : Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

[49] : Mann, C. M., Cox, S. D., & Markham, J. L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30(4), 294-297.

[50] : Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.

[51] : Marinier, F. C. (2008). *Huiles essentielles : l'essentiel : conseils pratiques en aromathérapie pour toute la famille au quotidien, un pharmacien vous conseille*. F. Couic Marinier.

[52] : Martini, M. C., & Seiller, M. (1999). *Actifs et additifs en cosmétologie*, Lavoisier TEC et DOC, 3^{ème} édition, Ouvrage de 1080 p.

[53] : Don, W. G., & Robert, H. P. (2007). Chapter 9. Capital Cost Estimation. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*.

[54] : Lawrencet, B. M. (2001). Essential oils: from agriculture to chemistry. *International Journal of Aromatherapy*, 10(3-4), 82-98.

[55] : Carnat, A. P., Carnat, A., Fraisse, D., & Lamaison, J. L. (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72(5), 301-305.

[56] : Chalchat, J. C., Garry, R. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of essential oil research*, 9(1), 67-75.

[57] : Schwedt, G. (1993). *Atlas de poche des méthodes d'analyse*. Flammarion.

[58] : Cooper, W. T. (2006). Normal-Phase Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*.

- [59] : Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (1979). Introduction to modern liquid chromatography. 2-nd edition. A Wiley-Interscience Publication, New York.
- [60] : Joulain, D. (1994). Modern analysis methodologies: use and abuse. *Perfumer & flavorist*, 19(2), 5-17.
- [61] : Audigie, C., Dupont, G., & Zonszain, F. (1985). Principes des méthodes d'analyse biochimique (No. 574.192 AUDp).
- [62] : Paolini, J. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae* endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum* (Doctoral dissertation, Université de Corse).
- [63] : Perry, J. J., Staley, T. J., & Lory, S. (2002). Croissance des micro-organismes. Microbiologie, Inc, sous le titre *Microbial Life*, 136.
- [64] : Bousseboua, H. (2002). *Eléments de microbiologie générale*.
- [65] : Djebaihia Selma-Guernine Amel, Menasria Lemya. (2019). Activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Fumaria officinalis* L. Mémoire de Master, Spécialité SNV ; université de guelma.
- [66] : Nauciel, C., & Vildé, J. L. (2005). *Bactériologie médicale*. Elsevier Masson.
- [67] : Akoua-Koffi, C., Guessenn, N., Gbonon, V., Faye-Ketté, H., & Dosso, M. (2004). La méticillino-résistance de *Staphylococcus aureus* isolés à Abidjan (1998–2001) : un nouveau problème en milieu hospitalier. *Médecine et maladies infectieuses*, 34(3), 132-136.
- [68] : Kempf, I., & Zeitouni, S. (2012). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences. *Pathologie Biologie*, 60 (2), 9-14.
- [69] : Walker, H. G., Kohler, G. O., & Garrett, W. N. (1982). Comparative feeding value of alfalfa press cake residues after mechanical extraction of protein. *Journal of Animal Science*, 55(3), 498-504.
- [70] : Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- [71] : Atawodi, S. E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(2), 128-133.
- [72] : Leverage, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.

- [73] : Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., & Leverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11(6), 411-420.
- [74] : Halliwell, B., & Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, 102(suppl 10), 5-12.
- [75] : Berger, M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(1), 48-53.
- [76] : Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Université de LIMOGES.
- [77] : Mohammedi, Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p.
- [78] : Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2576-2581.
- [79] : FERNANDEZ, X., MERCK, F., & KERDUDO, A. (2012). Conservateurs pour cosmétiques-Antioxydants et anti-UV.
- [80] : Kim, D. O., & Lee, C. Y. (2004). Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 253-273.
- [81] : Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. In *Food antioxidants* (pp. 1-18). Springer, Dordrecht.
- [82] : Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- [83] : Trouillas, P., Calliste, C. A., Allais, D. P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., & Duroux, J. L. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*, 80(3), 399-407.

CHAPITRE II :
MONOGRAPHIE DES PLANTES
ETUDIEES

I. PRESENTATION DE LAURIER NOBLE (*Laurus nobilis*) :

1. Historique :

Laurus est dérivé du mot latin laus qui veut dire «louange». Le laurier noble est une plante chargée de symbolisme, consacrée au dieu Apollon [1]. La pythie de Delphes mâchait des feuilles de laurier avant ses divinations [2]. Chez les Grecs et les Romains anciens, l'usage s'était établi de couronner de laurier -la Corona Triumphalis- les poètes et les généraux vainqueurs. Ressortant triomphants de leur combat, les chefs de guerre comme César ou Napoléon étaient ornés d'une couronne de laurier [3]. Le laurier est resté à l'époque moderne également un symbole de triomphe. Il suffit de songer à la «Feuille de laurier argentée», qui est la plus haute distinction sportive depuis 1950 chez la République Fédérale d'Allemagne. Dans les écoles de médecine, la couronne dont on entourait la tête des jeunes docteurs était faite de rameaux feuillés de laurier avec des baies, d'où le nom « baccalauréat » donné encore de nos jours au diplôme qui sanctionne la fin des études secondaires. Le mot provient de la racine latine « *bacca lauri* » signifiant baies de laurier [4].

Le laurier est toujours un symbole de paix. Cet organisme végétal possède une caractéristique, il demeure vert en hiver. Cette caractéristique a été prise en compte pour faire de cette plante un symbole d'immortalité. Vivre à côté d'une forêt de lauriers était synonyme de bonne santé. Les médecins grecs recommandaient d'ailleurs son utilisation pour se protéger de la peste ou d'autres maladies. Aussi, il était d'usage de croire que la foudre ne frappait pas à l'endroit où poussait un laurier [2].

Dès l'Antiquité, le laurier était cultivé par les Grecs et les Romains dans toutes les régions méditerranéennes. Les feuilles et fleurs de laurier sont d'ailleurs citées dans un livre de recette par le gastronome romain Apicius « *De re coquinaria* » [5].

2. Terminologie :

Le substantif masculin « laurier » est dérivé, avec le suffixe -ier de l'ancien français, et lor du latin c'est *laurus*, c'est un nom d'origine celte qui veut dire « toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante, sont principalement appliquées pour son feuillage, et connues en cuisine comme assaisonnement pour aromatiser les sauces, les vinaigres, la moutarde etc.... et herbe médicinale depuis les périodes antiques grecs et romaines [6].

Laurus nobilis, ou Laurier noble, Laurier vrai, est aussi appelé laurier commun, laurier franc, également connu sous le nom de laurier-sauce ou laurier d'Apollon. Il ne doit pas être confondu avec les « faux lauriers » : le Laurier-cerise, le Laurier-rose qui sont toxiques et le Laurier-tin. Il est intéressant de noter que cette herbe qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle a, en fait, des propriétés qui peuvent suggérer de nouvelles applications [7].

3. Description :

C'est une espèce d'arbustes à feuillage persistant, les feuilles sont étroites, alternes spiralées et aromatiques de couleur vert foncé et luisantes. Il se couvre de bouquets de fleurs de petites tailles jaune verdâtre au printemps, uni- ou bisexuées, elles peuvent être présentées en inflorescences compactes selon leur groupe. Les fruits sont généralement des drupes [2].

Le caractère aromatique de ces plantes provient de la présence de cellules à HE présentes dans les feuilles et l'écorce.

Couleur fleur : Jaune
Couleur feuillage : vert
Hauteur : 300 cm
Feuillaison : Janvier - Décembre
Floraison(s) : Mars - Avril
Type de feuillage : persistant
Exposition : soleil
Type de sol : sec.



Figure II.1 : Laurier noble ou *Laurus nobilis*.

Laurus nobilis est un grand arbuste à écorce grise pouvant atteindre de 2 à 6 m de haut, jusqu'à 15 m à l'état sauvage à tige droite et grise dans sa partie basse, verte en haut. Cet arbre peut-être taillé presque en toute saison et à volonté pour simplifier sa récolte ou laissé naturel dans les grands espaces. Sa croissance est généralement lente, d'environ 5 à 6 m en vingt ans.



Figure II.2 : Arbre de *Laurus nobilis*.

Les tiges des rameaux sont vertes et dirigées vers le haut. Au début de sa croissance, le tronc possède une écorce vert olive à noire qui deviendra grise au fil des années. La constitution d'une écorce véritable nécessite plusieurs années [8].

D'allure pyramidale, il présente un feuillage alterne, coriace persistant, elliptique, longues de 10 cm sur 3,5 cm de large, dense vert foncé et glacés sur leur face supérieure et plus pale en dessous. La forme des feuilles est allongée voire lancéolée avec des extrémités pointues et un pétiole court. Le limbe possède un bord ondulé légèrement épaissi et recourbé vers l'intérieur (figure II.3), elles dégagent une odeur aromatique quand on les froisse.



Figure II.3 : Feuilles de *Laurus nobilis*.

Les fleurs sont petites vertes ou jaunes blanchâtres, odorantes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles, apparaissent en mars-avril. C'est une plante dioïque c'est-à-dire que les fleurs mâles et femelles sont sur des pieds distincts. La floraison a lieu de mars à mai. Le fruit est une petite baie ovoïde de 2 cm de longueur sur 1cm de largeur, noire violacé à pulpe grasse [3].



Figure II.4 : Fleurs de *Laurus nobilis*.

Les fruits sont des baies ovales d'environ 2 cm de long, vertes puis noir violacé en automne (figure II.5). Elles contiennent une seule graine formée de deux cotylédons riches en lipides et parfumés. Les matières grasses s'oxydent rapidement ce qui limite la capacité germinative de la graine. Très souvent, les baies restent présentes tout l'hiver sur l'arbre, voire même jusqu'au printemps suivant. L'huile peut en être extraite pour fabriquer des savons [9].



Figure II.5 : Fruits de *Laurus nobilis*.

4. Etude Botanique :

Le laurier est une plante aromatique à importance médicinales, elle appartient à la famille des Lauraceae (Lauracées). Considéré comme parmi les plus primitifs des angiospermes. Cette famille comporte 2000 à 2500 espèces réparties en cinquantaine de genre certaines produisent des huiles essentielles appréciées. Les Lauraceae sont l'une des plus importantes familles ligneuses tropicales [3].

Parmi les Lauracées exotiques les plus connues, on connaît notamment à travers leurs produits que l'on consomme : l'avocatier (*Persea americana*), originaire d'Amérique, le camphrier (*Cinnamomum camphora*) et le cannellier (*Cinamomum zeylanicum*), originaires d'Asie.

Des études ont révélé une étroite relation entre ses genres, tous sont dioïques et la plupart ont une inflorescence ombelle sous-tendu par bractées [10].

a. Classification botanique :

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure [11]. Synthétisée dans le **Tableau II.1**.

Tableau II.1 : Classification botanique de *Laurus nobilis*

Règne	Plantes
Sous règne Plantes	vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Laurales
Famille	Lauracées
Genre	<i>Laurus</i>
Espèce	<i>Laurus nobilis</i>

Les Laurales constituent un grand ordre qui regroupe 9 familles et environ 3000 espèces. Elles sont apparentées aux Magnoliidées, considérées comme un groupe primitif, qui possèdent un pollen monoapperturé. Les principales familles de cet ordre sont les Calycanthaceae, les Lauraceae et les Monimiaceae [12].

Les Lauracées représentent une importante famille comprenant plus de 30 genres et 2500 espèces. Elles sont pour la plupart réparties dans des régions tropicales, essentiellement en Asie du Sud-Est, en Amazonie et à Madagascar [13].

b. Écologie et distribution :

Il est originaire du bassin méditerranéen. *Laurus nobilis* pousse dans les lieux humides et ombragés, Avec l'assèchement de la mer Méditerranée durant le Pliocène, les forêts de lauriers saucé ont peu à peu été remplacées par des plantes plus adaptées à des milieux secs. La plupart des dernières forêts de lauriers saucés ont visiblement disparu il y a environ 10 000 ans. Quelques-unes subsistent dans les montagnes du sud de la Turquie, au nord de la Syrie, le sud de l'Espagne, le centre-nord du Portugal, le nord du Maroc, dans les îles des Canaries et de Madère.

Ces espèces sont réparties dans les zones tropicales et subtropicales comme indiqué sur la figure II.6. Cette famille est peu représentée en Afrique mais très fréquente sur le continent américain ou asiatique, en Australie et à Madagascar.

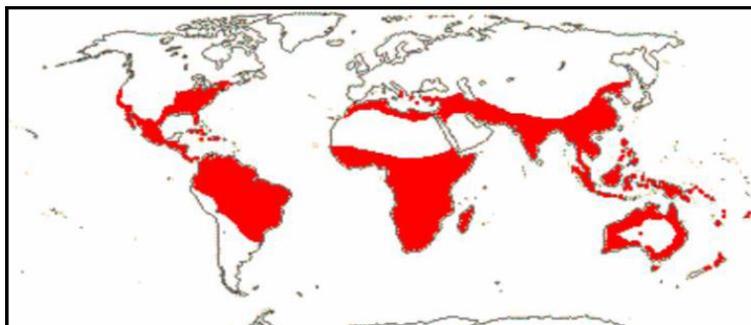


Figure II.6 : Distribution des Lauracées à travers le monde.

Le genre *Laurus*, poussant principalement en Europe, comprend trois espèces majeures, toutes à feuillage sempervirent :

- *Laurus azorica*, également appelé *Laurus canariensis*, poussant dans les forêts des îles des Açores ;
- *Laurus nobilis*, dans la région méditerranéenne ;
- *Laurus novocanariensis*, présent sur l'île de Madère, aux Canaries et au Maroc [9].

Elles poussent également dans les jardins, où elle est cultivée comme condiment. Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux [6].

c. Culture

C'est une espèce affectionnant particulièrement les hivers doux avec des températures ne descendant pas sous les -5°C . Les conditions idéales sont les endroits ensoleillés et protégés du vent, même si elle est tolère l'ombre. Concernant l'humidité, la plante ne supporte pas la sécheresse prolongée : il lui faudra au minimum 600 mm de précipitations par an [5].

Exceptés les sols trop acides, le laurier peut d'adapter à tout type de sol. Il se développe aisément dans les sols profonds et humides toute l'année. Le sol type doit être riche en nutriments, en humus et en bases avec un pH proche de la neutralité [3,5].

Le laurier supporte très bien la taille. Il est sensible aux parasites qui le peuplent habituellement. Les plus courants sont :

Les punaises sont leur principal ennemi (90% des lauriers les portent). Au-dessus de la mélasse sécrétée par ceux-ci, un champignon noir s'installe, ce qui nuit peu à la plante mais la rend très mauvaise à consommer.

Le psylle du laurier (*Trioza alacris*), une peste qui produit des symptômes frappants. Les feuilles semblent froissées à la suite des morsures de ce petit insecte suceur. Il est difficile de voir la cause du mal car il ne reste pas statique sur la feuille.

Le laurier noble est peu touché par les parasites. Ce sont le plus souvent des champignons qui s'attaquent aux feuilles et aux racines. Les feuilles peuvent être parasitées entres autres par des cochenilles ou des araignées.

5. Etude Chimique :

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de *laurus nobilis*, et plusieurs ont prouvé la richesse des feuilles en substance actives, ce qui a permis l'isolation de plusieurs composés :

a. Composition En Huiles Essentielles :

L'huile essentielle extraite des feuilles est d'aspect liquide mobile limpide, de couleur jaune très pâle à jaune, d'odeur aromatique, piquante. Selon la classification de P. Franchomme publiée dans son ouvrage « l'aromathérapie exactement », l'HE de laurier noble peut être classée parmi les HE dites « polymoléculaires » car elle contient, à côté de quelques molécules majoritaires, une abondance de composés actifs [14].

Les oxydes terpéniques sont des molécules très fréquemment rencontrées dans les Huiles Essentielles. Le principal composant de l'huile de laurier noble est le 1,8-cinéole (30 à 70 %), un éther de monoterpènes cycliques. Ce composé est populairement connu comme eucalyptol (Figure II.7). Les cinéoles, sont volatils, symétriques monoterpéniques, et sont des éthers cycliques souvent trouvés en tant que composants d'huiles essentielles de plantes aromatiques. Le 1, 8-cinéole a un parfum frais et camphré caractéristique et un goût âcre.

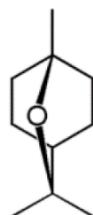


Figure II.7 : Structure du 1,8-cinéole.

Les feuilles du Laurier sauce contiennent une huile essentielle représentant 1 à 3 % du poids sec. La composition de cette HE est exprimée en pourcentage de divers composés des familles des oxydes terpéniques, des monoterpénols, des phénols des monoterpènes, des sesquiterpènes et des esters terpéniques. L'analyse chromatographique en phase gazeuse sur une feuille de Laurier noble a pu identifier 276 molécules différentes [15], les principales molécules avec leurs pourcentages sont décrites ci-dessous :

Terpènes :

Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole (40,91%), **Monoterpénols :** linalol (1,29%), térpinén-4-ol (1,55%), **Phénols :** méthyl eugénol (0,9%), eugénol (1,62%), **Monoterpènes :** sabinène (6,92%), bêta-pinène (4,55%), alpha-pinène (5,82%), **Esters terpéniques :** alpha- terpényle acétate (5,86%), linalyl acétate (0,34%) [16].

Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole (48.38%), **Monoterpénols** : linalol (3.50%), terpinén-4-ol (2.84%), alpha-terpinéol (2.46%), **Phénols** : méthyl-eugénol (2.22%), eugénol (0.08%), **Monoterpènes** : sabinène (9.46%), bêta-pinène (4.99%), alpha-pinène (5.77%), limonène (4.10%), para-cymène (2.38%), gamma-terpinène (2.12%), myrcène (0.64%), camphène (0.32%), alpha-phellandrène (0.24%), alpha-terpinène (0.28%) -Esters terpéniques : acétate d'alpha-terpényle (8.52%), acétate de bornyle (0.16%) [17].

Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole (35-45%), **Monoterpénols** : linalol (7%) et l' α -terpinéol (1,5-4,5%), **Monoterpènes** : α -pinènes et β -pinènes (< à 10%) [15].

b. Autre métabolites secondaires secondaire :

En plus, d'autres composés ont été isolés de feuilles du Laurier noble comme :

Flavonoïdes et dérivés :

Quercetin, Kaempferol, Rutin, Kaempferol 3-o-(2'',4''-o-di-E-p-coumaroyl-alpha-L-pyronorhamnoside-3,3' 4', 5, 6, 7,8-heptamethoxyflavone, Isorhamnetin O-rutinoside, Luteolin 6-C-glucoside, Apigenin 8-glucoside, (+)-Catechin [18]. Des flavonoides O-glycosides ou C-glycoside, de la catéchine, du cinnamtannin, [19], procyanidines et des anthocyanes [20].

Acides phénoliques :

Acide Coumarique, acide 2-hydroxycinnamique, acide tannique [21].

Sesquiterpenes lactones :

Eremantine, Dehydrocostus lactone, Costunolide, Zaluzamin, Reynosin, Laurenobiolide, Santamarin, gazaniolide, spirafolide, spirafolide, Ampelopsisionoside, Lauroside [22].

Acides gras :

Acide capronique, acide laurique, acide palmique, acide palmitoleic, acide heptadecanoic, acide oleique [23].

Autres :

Comme les alcaloïdes isoquinolines et les alcaloïdes aporphiniques, la cryptodoline ou l'actinodaphnine qui sont responsables d'une activité cytotoxique (in vitro). Et la Vitamine E : alpha tocopherol [24].

6. Etude pharmacologique :

➤ Intérêt thérapeutiques :

La particularité de l'huile essentielle de Laurier se présente sous forme de propriétés anti-dégénérative, antibactérienne remarquables. Elle est très efficace dans toutes les infections de la bouche et sera donc utilisée contre les aphtes, les gingivites, les douleurs dentaires. Mais, cette huile essentielle est, aussi, potentiellement allergisante car elle concentre des monoterpénols et des phénols qui peuvent être irritants pour la peau. Il est donc important de la diluer dans de l'huile végétale (huile d'olive, tournesol, germe de blé,...) [23].

L'eucalyptol le composant majoritaire de cette HE possédant des activités biologiques importantes, il stimule les glandes exocrines par une action expectorante sur les glandes respiratoires (*Eucalyptus globulus*) et digestives. Il présente également une activité antibactérienne en étant souvent active sur *Staphylococcus aureus* et est immunostimulant par augmentation des γ -globulines. Concernant sa toxicité, l'eucalyptol est contre-indiqué chez les personnes asthmatiques. Un emploi excessif peut susciter certains troubles passagers d'après la littérature [14].

7. Utilisation :

Laurus nobilis est une plante d'importance industrielle utilisée comme matières premières dans de nombreux domaines, y compris les parfums, cosmétiques, aromathérapie, phytothérapie et de la nutrition.

➤ Alimentaire :

Ses feuilles sont utilisées en cuisine pour leur arôme. En condiment, elles sont habituellement sèches et entrent dans la composition du bouquet garni, pour infusion ou cuisson dans la sauce. En Saintonge, la feuille est employée fraîche pour les courts bouillons, matelotes ou ragoûts. Les Bédouins l'utilisent pour parfumer le café [3].

Les fleurs de Laurier-sauce séchées peuvent aussi être employées en infusion avec une cuillère de miel, et les baies séchées ont les mêmes propriétés culinaires que

les feuilles ; elles sont préparées avec une râpe, de la même manière que la noix de muscade. Il est préférable d'en user avec modération, car la présence de lactones et d'alcaloïdes peut procurer un goût amer

En Inde, plusieurs espèces différentes, au parfum plus ou moins proche du Laurier nobilis, sont utilisées en cuisine, sous le nom de laurier, souvent sans distinction entre elles. Il s'agit le plus souvent de Cinnamomum tamala. Le L. nobilis n'est jamais utilisé en cuisine traditionnelle, mais parfois dans des plats occidentaux ou adaptés [9].

➤ **Ornementale :**

Cet arbuste est aussi très cultivé pour l'ornementation, notamment pour l'art topiaire : la Belgique est connue pour ses pépinières spécialisées dans la culture de laurier noble. Hors des régions de climat méditerranéen, il peut être sensible au gel, et est souvent cultivé en bacs ; cependant certaines variétés, undulata notamment, se révèlent rustiques, et sont marcescentes ou repartent à partir de leur souche après une période de gel importante [3].

➤ **Médicinale :**

La feuille de laurier-sauce s'emploie également pour traiter les crampes abdominales en infusion.

Le laurier est depuis toujours utilisé pour traiter les troubles de l'appareil digestif.

Il ouvre l'appétit, stimule la sécrétion de sucs gastriques dans l'estomac, assure une bonne digestion et évite les fermentations.

Il est aussi utilisé pour ses propriétés antiseptiques, c'est pourquoi, il est présent dans de nombreuses marinades.

Le laurier serait aussi un bon expectorant en cas de bronchite et sa poudre ferait tomber la fièvre.

L'huile essentielle de laurier-sauce (qui ne doit jamais être utilisée en interne) est souvent employée sous forme d'onguents pour combattre les courbatures ou les douleurs musculaires. Son action serait aussi bénéfique sur les douleurs rhumatismales. Les décoctions de feuilles ajoutées à l'eau du bain soulageraient aussi les membres endoloris [2].

Sous forme de cataplasme de feuilles, le laurier-sauce atténuerait la douleur liée aux piqûres de guêpes ou d'abeilles.

Le laurier-sauce aurait aussi des propriétés intéressantes sur l'appareil urinaire puisqu'il tonifierait la vessie et d'après Dioscoride (1er siècle de notre ère), il éliminerait les calculs rénaux. Toujours d'après Discoride, son écorce soulagerait aussi les affections du foie.

Le savon d'Alep est traditionnellement fabriqué avec de l'huile de baies ou de feuilles de laurier [3].

➤ **Comme répulsif :**

Au Maroc, en Algérie et en Tunisie, on frictionne les chevaux avec des feuilles fraîches afin d'en éloigner les mouches. On utilise également la feuille broyée en poudre pour lutter contre les fortes migraines : la poudre est alors prisée. Les feuilles du laurier-sauce contiennent du benzaldéhyde, de la pipéridine et du geraniol à une concentration de 50 ppm ; ces molécules sont toutes trois connues pour leurs qualités de répulsion des insectes [2].

I. PRESENTATION DE KHELLA, (NOUKHA) : *Ammoïdes verticillata*

1. Terminologie :

L'appellation d'*Ammoïdes verticillata* dans notre pays est Noukha ou bien «Nûnkha» dans le Maghreb dérive du nom Perse «Nankhah». En perse, «Nan» et «Khah » signifient respectivement pain et goût parce qu'en Iran cette plante est utilisée, comme aromate dans le pain. En arabe «Taleb El koubs » [25]. En français elle est connue sous le nom : Ajowan ou Ajawain [26]. En anglais, les graines sont appelés « bishop's weed », « carum seed », et la plante entière est appelé «False Parsley» [27].

Elle possède plusieurs noms scientifiques *Ammoïdes verticillata*, également connue sous le nom d'*Ammoïdes pusilla*, *Psychotis ammoïdes* [11], [28], *Ptychotis verticillata*, et *Petroselinum ammoïdes*. Elle est nommée aussi *Trachyspermum copticum* ou bien *Trachyspermum ammi* [11,25].

La dénomination usuelle de la plante est Ajowan et la désignation botanique usuelle en France est *Carum copticum*, *ptychotis ajowan* ou bien *Trachyspermum copticum* [29].

2. Description :

C'est une espèce végétale aromatique indienne caractérisée par le charme indéniable de ses fleurs blanches. Ses graines riches en essence et à forte odeur aromatique caractéristique du thymol ont un gout qui rappelle beaucoup celui du thym. Il est à noter que certains auteurs la confondent avec la plante Ammi visnaga, plante sauvage qui appartient à la même famille des Apiaceae [11].

Ammoïdes verticillata (Figure II.8) est une plante annuelle glaucescente, à souche filiforme, racine grêle, pivotante ; à tige dressée, striée, grêle, à nombreux rameaux étalés de 10 à 40 cm de haut, sans rosette [30].



Figure II.8 : Ajowan ou *Ammoides verticillata*.

Les feuilles adultes stériles basales sont radicales pennatiséquées, Leurs feuilles inférieures possèdent 3 à 4 segments très rapprochés, étroits, trifides verticillés et les postérieures sont pennatifides à segments linéaires.

L'inflorescence de cette plante est ombelliforme à fleurs de couleur blanche (Figure II.9). Elle est fortement aromatique d'odeurs intense et diffusible, balsamique très agréable et persistante même après la dessiccation [27,31]. Les fleurs sont auto-fertiles, mais la pollinisation croisée se produit à travers les insectes [32]. La floraison de cette espèce commence au mois de mai et s'étale jusqu'en juillet.

Couleur fleur : Blanche
Couleur feuillage : vert
Hauteur : 40 cm
Feuillaison : Mars - Avril
Floraison(s) : Mai - Juin
Type de Floraison : ombelles
Exposition : soleil
Type de sol : sec.

Les ombelles penchées avant la floraison [33], les principales sont petites de 6 à 12 rayons capillaires très inégaux, les internes plus courts involucre nul, involucre inégale : 3 sétacées, 2 spatulées et aristées [34].



Figure II.9 : Fleurs d'*Ammoides verticillata*.

Des petits fruits gris brunâtre, sont des diakènes côtelés de forme ovoïde de longueur inférieure à 1 mm, avec méricarpes brun-grisâtre, sont très léger comprimé par le dos, recouvert de poils épais ; cinq cotés primaires filiformes, proéminents, ont la même forme et taille de ceux du persil [30]. Ils ont un gout aromatique et piquant [32].

Les graines sont petites, ovales, striées, courbes et gris-vert ressemblent aux graines du cumin en miniature [35].

3. Etude Botanique :

a. Classification botanique :

Le classement d'*Ammoides verticillata* se réfère selon classification botanique de Cronquist [36]. Synthétisée dans le **Tableau II.2**.

Tableau II.2 : Classification botanique d'*Ammoides verticillata* [36].

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne Plantes	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiacea</i>
Genre	<i>Ammoides</i>
Espèce	<i>Ammoides verticillata</i>

L'*Ammoides verticillata* appartient à la famille des Apiacea (Apiacées). C'est une famille très abondante et qui comprend plus de 3000 espèces avec 55 genres, réparties dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord.

C'est une famille très homogène facile à reconnaître grâce à son inflorescence typique ombelle. Elle appartient à la grande famille des ombellifères, qui est la plus évoluée, à cycle dynamique tardif. Elle apparaît généralement au début du mois de mai. Son cycle de reproduction se poursuit même en juillet. Les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres. Il s'agit de plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces [37].

Le genre *Ammoïdes* regroupe 2 espèces qui sont : *Ammoïdes atiantica* (Plante bisannuelle) ; et *Ammoïdes verticillata* est une plante annuelle [11,31]. On la trouve généralement dans les champs, les pelouses, les montagnes et les forêts, les endroits rocheux et surtout les lieux arides.

b. Écologie et distribution :

Ammoïdes verticillata c'est une espèce herbacée annuelle odorante, elle pousse spontanément en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Egypte) Elle s'étend également dans la région méditerranéenne, en Ethiopie et en Turquie ainsi qu'en Asie (Iraq, Iran, Inde, Pakistan et Afghanistan), On la trouve souvent dans les champs, les pelouses, les montagnes et dans les forêts [11].

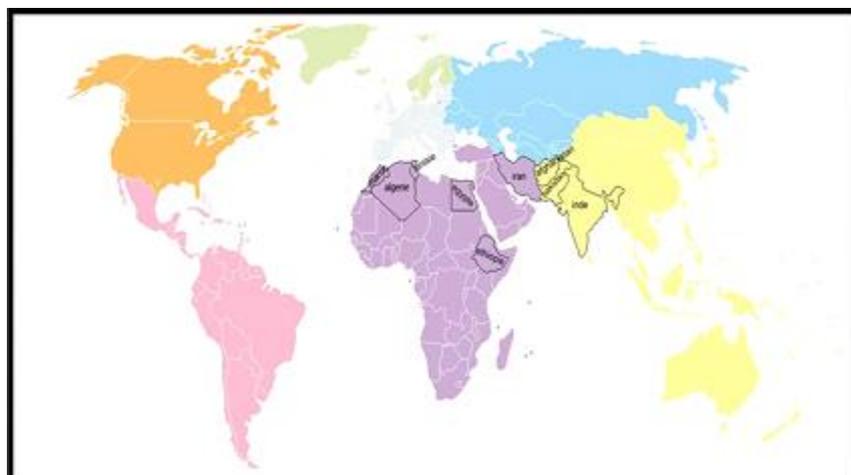


Figure II.10 : Distribution d'*Ammoïdes verticillata* à travers le monde.

c. Culture :

Ammoïdes verticillata a été notée dans les côtes méditerranéennes à différentes altitudes allant de 553 m à 960 m. Cette plante pousse aussi bien dans l'étage bioclimatique subhumide que semi-aride, sur des sols calcaire ou marno-calcaire [35]. Elle nécessite une saison de croissance chaude et longue sans gel. Il faut du temps chaud surtout pendant le développement de la graine [32].

Grace à son large utilisation dans le domaine médicale et même culinaire, *Ammoides verticillata* est cultivée en Egypte, Iraq, Iran, Afghanistan et surtout en Inde [11,30-31], qui entre 2000 et 2001, environ 2900 tonnes de graine ont été produites à partir de 13600 ha, tandis que 962 tonnes de graines et 200 kg d'huile ont été exportées. L'Inde est le plus grand producteur et exportateur de graine d'ajowan dans le monde vers environ 46 pays [32].

4. Etude Chimique :

La graine d'Ajowan a une composition chimique qui varie selon la variété, la région et le stade de la récolte.

La composition chimique des graines est l'humidité 8,9%, les protéines 15,4%, les graisses (extrait étheré) 18,1%, les fibres brutes 11,9%, les glucides

38,6%, la matière minérale 7,1%, le calcium 1,42%, le phosphore 0,30%, le fer 14,6 mg / 100 g [32].

a. Composition En Huiles Essentielles :

Ci-dessous des résultats sur la composition d'HE d'*Ammoides verticillata*:

- 27 composés volatiles ont été identifiés dans l'huile essentielle des graines extraite par distillation à la vapeur, le thymol étant le composant majeur avec 61%, suivi de p-cymène (15.6%) et γ -terpinène (11.9%) [38].
- 17 constituants dont 39.36% thymol, 30.97% γ -terpinène, 19.47% p-cymène, 5.45% β -pinène et 1.48% α -pinène, sont présents dans l'HE de graines d'ajowan [39].
- L'analyse de l'huile extraite par hydrodistillation de la plante entière a révélé la présence de 8 composés dont thymol 49%, γ -terpinène 30.8%, p-cymène 15.7%, β -pinène, myrcène et limonène 3.6% [40].
- Après l'analyse de l'HE de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, 19 constituants ont été identifiés, le carvacrol 44.6%, p-Cymène 9.4%, limonène 18.4%, γ -terpinène 9.5%, thymol 3.4%. Geranyl acetate 4.7% [28].

b. Autre métabolites secondaires secondaire :

Les résultats de screening phytochimique confirment la richesse d'*Ammoides verticillata* en composés phénoliques : (polyphénols, tanins catechiques, flavonoïdes, flavonoïdes libres (flavones), leucoanthocyanes, coumarines, anthocyanes et quinones

libres), en composés terpeniques : (saponosides, stéroïdes, stérols, triterpènes et huiles essentielles), en composés azotés (alcaloïdes), ainsi qu'en antioxydants (caroténoïdes) [35].

5. Etude pharmacologique :

L'existence des tanins catéchiques dans la plante d'*Ammoides verticillata* lui permet d'exercer plusieurs propriétés thérapeutiques, tels que antiseptiques, antibactériennes et antifongiques qui sont clairement démontrées dans le traitement des diarrhées infectieuses et de dermatites. Les tanins possèdent une forte activité antioxydante, ce sont des très bons pièges à radicaux libres et ils inhibent la formation de radicaux superoxydes. Donc on peut dire que cette plante a un pouvoir antioxydant et est recommandée comme une source potentielle d'antioxydants naturels [41].

Les deux grandes qualités d'*Ammoides verticillata* sont sa forte action stimulante et son remarquable pouvoir antimicrobien. En effet, elle a une action très intéressante sur les maladies microbiennes [42].

6. Utilisation :

➤ Alimentaire :

La saveur de cette plante est fortement aromatique et piquante. Son odeur agréable, diffusible, intense et balsamique est persistante même après dessiccation. Les graines de cette plante sont très utilisées dans les préparations culinaires, en petites quantités pour aromatiser de nombreux aliments (pain, rôti, légumes, soupes) grâce à leurs arômes forts [31]. Ces fruits séchés sont aussi utilisés comme épice et connus sous le nom d'Ajowan. En outre, la partie aérienne est employée comme conservateur alimentaire spécialement pour la conservation des olives [43].

Par ailleurs, elles rendent plus digestes les légumineuses, les haricots secs et les lentilles. Elles sont souvent mélangées à d'autres épices pour atténuer leur saveur amère. En Algérie, cette plante jouit d'une grande faveur populaire. En effet, la plante entière ou ses graines sont très utilisés en cuisine, le plat très populaire qui ne se prépare que si un bouquet des parties aérienne d'*Ammoides verticillata*, et *Thymus vulgaris* soit présent est la soupe d'escargot [44].

➤ **Médicinale :**

L'*Ammoides verticillata* est très connue depuis l'antiquité pour ses utilisations en automédications. C'est une herbe potentielle et est largement utilisé pour guérir diverses maladies chez les humains et les animaux. Elle est utilisée en entier ou son huile essentielle.

Ammoïdes verticillata est une plante aromatique qui possède de nombreuses et précieuses propriétés médicinales, elle est largement employée en médecine traditionnelle algérienne et en particulier dans l'ouest Algérien pour traiter certaines maladies. Une enquête thérapeutique a été réalisée par Bekhechi et al en 2009 auprès des herboristes et des gens de la campagne de la région de Tlemcen. Les informations recueillis ont montré que cette plante présente des propriétés culinaires et surtout thérapeutiques (Tableau II.3) [31].

Ammoïdes verticillata est utilisée pour prévenir et guérir diverses maladies. En effet, c'est une espèce aromatique considérée surtout comme une panacée [44], conseillée contre la grippe et possède des propriétés thérapeutiques contre l'hypertension. Cette plante possède également des propriétés antiallergiques, anthelminthique, antivirale, antibactérienne, antifongique [43] et hypocholestérolémiant. Elle a également un effet expectorant, antalgique, carminatif, digestif. Elle est utilisée comme apéritif, emménagogue et dans le traitement du vitiligo en Egypte [45].

La plante entière est très utilisée en infusion pour guérir les maux de tête, la fièvre, le rhume, les maladies broncho-pulmonaires, l'asthme, la sinusite, migraine et les infections rénales, utilisée aussi pour ses propriétés fébrifuges, antispasmodiques, antiseptiques et antidiabétiques [33].

Tableau II.3 : Enquête thérapeutique effectuée au niveau de la région de Tlemcen sur *Ammoïdes verticillata* [31].

Parties utilisées	Indications	Mode d'emploi
Plante entière	Fièvre Rhumes gripes Maladies broncho-pulmonaires	Bouillir de l'eau avec la plante, mettre une serviette sur la tête, et inhaler les vapeurs dégagées. Ensuite, boire une tasse de cette décoction filtrée avant de se coucher.
	Fièvre typhoïde Antipyrétique Dépuratif Antispasmodique Affections rénales	Décoction ou infusion
	Règles douloureuses	Infusion
	Régulateur dermique	Décoction
	Asthme Douleurs gastriques Parasites intestinaux	Mélanger la plante lavée, séchée et broyée avec du miel. Prendre 1 à 2 cuillerées par jour.
	Céphalée migraines	Décoction ou infusion avec un citron. Boire une tasse le soir avant de se coucher.
	Sinusite	Mettre la plante dans de l'eau bouillante, laisser infuser, ensuite mélanger avec du henné et mettre sur les endroits atteints (Sinus osseux de la face).
	Rafraîchissante	Faire une décoction avec une tranche de citron, laisser refroidie puis mettre au réfrigérateur (boire comme une boisson rafraîchissante).
Feuilles et fleurs	Condiment culinaire	Ajouter ces parties de la plante broyées dans des soupes ex: soupe d'escargot. Conserve plus longtemps les aliments et empêche la formation des moisissures, ex : les olives.
Feuilles	Irritations dermiques Abscess -furoncle	Faire bouillir dans très peu d'eau, une poignée de feuilles fraîches. Lorsque le liquide est presque complètement évaporé, mettre les feuilles cuites sur une serviette et les écraser pour en supprimer le suc. Laisser refroidir le cataplasme, puis l'appliquer sur la partie atteinte.
Racines	Diarrhée	Faire bouillir pendant 20 minutes dans un litre d'eau des racines séchées au soleil. Filtre la décoction, la sucrer avec un peu de miel et la boire en trois fois au cours de la journée.
	Diurétique	Mettre dans un litre d'eau bouillante des racines. Filtrer, quand l'infusion est devenue tiède, sucrer avec un peu de miel. Consommer le tout dans la journée.

Un nombre élevé de propriétés médicinales et thérapeutiques des différentes parties de la plante a été décrit. Les feuilles et les fleurs sont utilisées en infusion contre l'irritation dermique, Abscess et furoncle, alors que les racines sont utilisées en décoction pour guérir la diarrhée, les troubles gastriques. En outre, les graines d'*Ammoïdes verticillata* montrent plusieurs effets thérapeutiques, sont utilisées communément comme remède en cas de colique, de diarrhée, de dyspepsie, de complications hépato-biliaires de choléra, d'asthme et de troubles intestinaux de vomissements, de troubles du tractus urinaire, dans la dilatation des bronches et conseillée comme analgésique, diurétique, carminatif, antihistaminique, vermifuge, et anti-asthmatique [46]. Le fruit possède des propriétés stimulantes, antispasmodiques et

carminatives. Il est un important agent correcteur de la flatulence, de la dyspepsie atonique et de la diarrhée, ainsi que d'autres activités sont prouvées : hypotensive, hépatoprotectrice [39].

L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a une importance majeure dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire, pour cela il faut se concentrer sur sa composition chimique et ses propriétés thérapeutiques.

Références :

- [1] : Collognat, A., & Bouttier-Couqueberg, C. (2016). Dictionnaire de la mythologie gréco-romaine-NE- : Illustré par les textes de l'Antiquité. Omnibus.
- [2] : GEERTS, P., RAMMELOO, J., & VAN CAUTEREN, G. (2002). *Laurus nobilis* : le livre du laurier. Gand : Ed. Ludion.
- [3] : Briot, C. (2016). Le laurier noble, plante des héros : aspects historiques, botaniques et thérapeutiques (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- [4] : Pelt, J. M. (2002). Les épices. Fayard.
- [5] : Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc.
- [6] : Demir, V. E. D. A. T., Gunhan, T. U. N. C. A. Y., Yagcioglu, A. K., & Degirmencioglu, A. D. N. A. N. (2004). Mathematical modelling and the determination of some quality parameters of air-dried bay leaves. *Biosystems engineering*, 88(3), 325-335.
- [7] : Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), 31-37.
- [8] : Michel, B. O. T. I. N. E. A. U. (2015). Guide des plantes à fruits charnus comestibles et toxiques. Lavoisier.
- [9] : Ballabio, R., & Goetz, P. (2010). Huile de graine/fruit de laurier *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (Seub.) Franco, *Laurus novocanariensis* Rivas Mart., Lousã, Fern. Prieto, E. Dias, JC Costa et C. Aguiar. *Phytothérapie*, 8(2), 141-144.
- [10] : Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D., & Marongiu, B. (2009). Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural product research*, 23(3), 230-237.
- [11] : Quezel, P., & Santa, S. (1962). New flora of Algeria and southern desert regions. *New flora of Algeria and southern desert regions*.
- [12] : Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. (2002). Botanique systématique : une perspective phylogénétique. De Boeck Supérieur.
- [13] : Botineau, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Tec & doc.
- [14] : Faucon, M. (2012). Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Éditions Sang de la Terre et Médial, Paris.
- [15] : Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Tec & Doc/Lavoisier, Paris, 279-281.
- [16] : Al-Kalaldehy, J. Z., Abu-Dahab, R., & Afifi, F. U. (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, 30(4), 271-278.

- [17]: Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P. L., Ceccarini, L., Ricci, A. S., & Longo, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 36-40.
- [18]: Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2014). Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food chemistry*, 156, 339-346.
- [19]: Tanaka, R., Sakano, Y., Shimizu, K., Shibuya, M., Ebizuka, Y., & Goda, Y. (2006). Constituents of *Laurus nobilis* L. inhibit recombinant human lanosterol synthase. *Journal of Natural Medicines*, 60(1), 78-81.
- [20]: Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Speroni, E., Costa, S., Guerra, M. C., Stella, L., ... & Innocenti, G. (2009). Phytochemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. leaf infusion. *Journal of Medicinal Food*, 12(4), 869-876.
- [21] : Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compound from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5), 1149-1154.
- [22]: Topçu, G., Tümen, G., Kiliç, T., GÖren, A. C., Barla, A., Türkmen, Z., & Kingston, D. G. (2009). Bioactive Turkish plant extracts and their constituents. In *Innovations in Chemical Biology* (pp. 61-81). Springer, Dordrecht.
- [23]: Castilho, P. C., Costa, M. D. C., Rodrigues, A., & Partidário, A. (2005). Characterization of laurel fruit oil from Madeira Island, Portugal. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(12), 863-868.
- [24]: Ouchikh, O., Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M. B., Faleh, H., Abdelly, C., ... & Marzouk, B. (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 103-110.
- [25]: Narayana, C., SOMAYAJULU, B., & Rao, S. D. T. (1967). RECOVERY OF FATTY OIL FROM SPENT SEEDS OF AJOWAN (*TRACHYSPERNUM AMMI* LINN). *Indian Journal of Technology*, 5(8), 268-+.
- [26]: Bekhechi, C., Boti, J. B., Bekkara, F. A., Abdelouahid, D. E., Casanova, J., & Tomi, F. (2010). Isothymol in Ajowan essential oil. *Natural product communications*, 5(7), 1934578X1000500726.
- [27]: ATTOU, A. (2017). Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent) Etude de Leurs Activités Antioxydante et Antimicrobienne (Doctoral dissertation).
- [28] : Tomi, P., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Desjobert, J. M., Costa, J., & Paolini, J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 533-536.

- [29] : Afnor, N. (1992). Recueil des Normes Françaises : Huiles Essentielles. AFNOR: Paris.
- [30]: Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (2008). Chemistry of Spices. CAB International, Wallingford.
- [31] : Bekhechi, C. (2009). Analyse (les huiles essentielles de quelques espèces aromatiques I (le la région de TJe. iicen par (PG, CP (-S\I et RMN'(I et étude de leur pouvoir antibactérien (Doctoral dissertation).
- [32]: Peter, K. V. (2016). A Handbook of Herbs And Spices VOL II. IBN KASEER.
- [33]: Bnouham, M., Benalla, W., Asehraou, A., & Berrabah, M. (2012). Antibacterial activity of essential oil from *Ptychotis verticillata*. *Spatula DD*, 2(1), 69-73.
- [34] : Guinochet, M., & De Vilmorin, R. (1975). Flore de France. 5T. CNRS.
- [35] : Daira, N., Maazi, M. C., & Chefrou, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf-Briq-) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 276-290.
- [36] : Cronquist, A., & Takhtadzhian, A. L. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia university press.
- [37] : Chibani, S. (2013). Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algerien.
- [38]: Chialva, F., Monguzzi, F., Manitto, P., & Akgül, A. (1993). Essential oil constituents of *Trachyspermum copticum* (L.) Link fruits. *Journal of essential oil research*, 5(1), 105-106.
- [39]: Lim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants (Vol. 1, pp. 285-292). Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- [40]: Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., & Bahramifar, N. (2004). Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*, 86(4), 587-591.
- [41]: Mehta, R. L., Zayas, J. F., & Yang, S. S. (1994). Ajowan as a source of natural lipid antioxidant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(7), 1420-1422.
- [42]: Abdelouahid, D.A.; Bekhechi, C. (2004). Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'*Ammoides Verticillata* (Nounkha) : *Rev, biologie et santé* 4(2) :1-10.
- [43] : BEKHCHI, C. (2002). Analyse de l'huile essentielle d'*ammoides verticillata* de la region de tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien.
- [44] : Kambouche, N., & El-Abed, D. (2003). Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *Journal of Essential Oil Research*, 15(1), 39-40.
- [45]: Baba Aissa F., 1999, Encyclopédie des plantes Utiles, *Ed Edas*, 181P.

[46] : Felidj, M., Bouazza, M., & Ferouani, T. (2010). Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoides pussila* (*verticillata*) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *Geo Eco Trop*, 34, 147-154.

CHAPITRE III :
MÉTHODES QUANTIQUES ET
RÉACTIVITÉ CHIMIQUE

Nous évoquons ici la base de la mécanique quantique ainsi que les méthodes quantiques utilisées lors de notre travail. Les équations présentées ici sont trouvés aux références [1] et [2].

I. Méthodes quantiques :

Les méthodes quantiques sont basées sur la résolution de l'équation de Schrödinger [3] pour déterminer les propriétés moléculaires qui sont multiples. On peut citer entre autres :

- Structures et énergies moléculaires.
- Énergies et structures des états de transition.
- Fréquences de vibration, Spectres IR et Raman ,Propriétés thermochimiques, Énergies de liaison, Chemins réactionnels ,Orbitales moléculaires ,Charges atomiques, Moments multipolaires, Déplacements chimiques RMN et susceptibilités magnétiques, Affinités électroniques et potentiels d'ionisation, Polarisabilités et hyperpolarisabilités, Potentiels électrostatiques et densités électroniques. . . .etc.

La détermination de ces différentes propriétés moléculaires peut se faire selon plusieurs types de calculs appelés calculs théoriques, tels que Les méthodes quantiques pures ab-initio, Les méthodes quantiques semi-empiriques et Les méthodes empiriques de la mécanique et de la dynamique moléculaires.

1. Méthodes ab initio :

Les méthodes ab-initio sont des méthodes purement quantiques, permettent le calcul en se basant sur des algorithmes de calculs très précis.

Toute information que l'on peut obtenir sur un système étudié, constitué d'un ensemble de particules est contenue dans la fonction d'onde Ψ du système. La fonction d'onde d'un système composé de N atomes et de n électrons est obtenue en résolvant l'équation de Schrödinger indépendante du temps suivante [3] :

$$H\Psi = E\Psi$$

où H est l'opérateur correspondant (l'hamiltonien du système),

Ψ est la fonction d'onde du système (la fonction des coordonnées des noyaux, des électrons) ;

E est l'énergie totale du système.

Les fonctions Ψ_i solution de cette dernière équation sont appelées états stationnaires du système associé aux énergies E_i . L'état fondamental Ψ_0 du système correspond à l'énergie la plus basse E_0 .

Pour un système de N noyaux et n électrons indépendantes du temps, l'équation de Schrödinger s'écrit :

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \sum_k^n \nabla_k^2 - \sum_k^n \sum_v^N \frac{Z_v e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{kv}} + \frac{1}{2} \sum_k^n \sum_{l \neq k}^n \frac{e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{kl}} - \frac{\hbar^2}{2} \sum_v^N \frac{1}{M_v} \nabla_v^2 + \frac{1}{2} \sum_v^N \sum_{\mu}^N \frac{Z_v Z_{\mu} e^2}{4\pi \epsilon_0 R_{\mu v}} \right] \Psi(x_i, X_i) = E \Psi(x_i, X_i)$$

énergie cinétique des électrons *énergie potentielle des électrons dans le champ des noyaux* *énergie de répulsion électrostatique entre électrons* *énergie cinétique des noyaux* *énergie de répulsion électrostatique entre les noyaux*

Sachant que l'hamiltonien non relativiste du système de charge ponctuelles correspond à :

$$H = T + V_{ne} + V_{ee} + T_n + V_{nn}$$

$$= \left[-\frac{\hbar^2}{2m} \sum_{k=1}^n \nabla_k^2 - \sum_{k=1}^n \sum_{v=1}^N \frac{Z_v e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{kv}} + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n \sum_{l > k}^n \frac{e^2}{4\pi \epsilon_0 r_{kl}} - \frac{\hbar^2}{2} \sum_{v=1}^N \frac{1}{M_v} \nabla_v^2 + \frac{1}{2} \sum_{v=1}^N \sum_{\mu > v}^N \frac{Z_v Z_{\mu} e^2}{4\pi \epsilon_0 R_{\mu v}} \right]$$

ou ∇_k^2 est le Laplacien de $K^{i\text{ème}}$ électron qui s'écrit :

$$\nabla_k^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_k^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_k^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_k^2}$$

$\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1.05 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ où h est la constante de Planck

ϵ_0 est la constante de permittivité du vide

e est la charge de l'électron

M_v est la masse du noyau

r_{kv} est la distance séparant le $K^{i\text{ème}}$ électron du $v^{i\text{ème}}$ noyau

r_{kl} est la distance la distance séparant deux électrons

$R_{\mu v}$ est la distance séparant deux noyaux dont les charges sont respectivement Z_{μ}

et Z_v

Afin de simplifier l'écriture on utilisera par la suite les unités atomique ($m_e = 1, e = 1, \hbar = 1$ et $4\pi \epsilon_0 = 1$). L'hamiltonien se simplifie sous la forme :

$$H = -\sum_{k=1}^n \frac{1}{2} \nabla_k^2 - \sum_{k=1}^n \sum_{v=1}^N \frac{Z_v}{r_{kv}} + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n \sum_{l>k}^n \frac{1}{r_{kl}} - \frac{1}{2} \sum_{v=1}^N \frac{1}{M_v} \nabla_v^2 + \frac{1}{2} \sum_{v=1}^N \sum_{\mu>v}^N \frac{Z_v Z_\mu}{R_{\mu v}}$$

L'équation de Schrödinger, basée sur cet hamiltonien, est difficilement applicable à des molécules polyatomiques ; des approximations ont donc dû être introduites dans la théorie quantique proposée dès les années 1920 afin de pouvoir résoudre l'équation de Schrödinger de façon approchée [1] :

1.1. Approximation de Born-Oppenheimer :

Cette méthode a été publiée en 1927 par Born et Oppenheimer [4] et est toujours utilisée en chimie quantique. Elle a pour but de simplifier la résolution de l'équation de Schrödinger en séparant la partie électronique et la partie nucléaire dans la fonction d'onde Ψ .

L'hypothèse de Born et Oppenheimer peut s'exprimer ainsi : les molécules sont formées de deux espèces de particules, les électrons et les noyaux, de masses très différentes ; la masse des noyaux est très grande par rapport à celle des électrons ($M_N = 1836 m_e$). Les mouvements de ces derniers sont donc beaucoup plus rapides que ceux des noyaux : les électrons auront le temps de décrire plusieurs fois leurs orbites sans que les noyaux aient sensiblement bougé. Le mouvement des électrons peut être, étudié en considérant que les noyaux atomiques sont fixes, leur énergie cinétique peut donc être négligée.

De ce fait, dans cette approximation les mouvements des noyaux ont été séparés de ceux des électrons. On considère donc que les électrons se déplacent dans un champ de noyaux figés, ce qui permet de poser :

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \Psi_R(\vec{r}) \phi(\vec{R})$$

où : $\Psi(\vec{r}, \vec{R})$ est la fonction d'onde totale à n électrons et N noyaux

$\Psi_R(\vec{r})$ est la fonction d'onde électronique

$\phi(\vec{R})$ est la fonction d'onde nucléaire

r et R sont les coordonnées des électrons et des noyaux.

Et l'équation à résoudre s'écrit alors en remplaçant $\Psi(r, R)$ par $\Psi_R(r) \phi(R)$ dans l'équation de Schrödinger, on aura :

$$\begin{aligned}
 H\Psi_R(\vec{r})\phi(\vec{R}) &= (T + V_{ne} + V_{ee})\Psi(\vec{r}) + (T_{nn} + V_{nn})\phi(\vec{R}) \\
 &= (E^e + T_{nn} + V_{nn})\phi(\vec{R}) = E\phi(\vec{R})
 \end{aligned}$$

En appliquant les approximations on aura :

$$H^e\Psi_R(\vec{r}) = E_R^e\Psi_R(\vec{r})$$

Avec

$$H^e = -\sum_{k=1}^n \frac{1}{2} \nabla_k^2 - \sum_{k=1}^n \sum_{v=1}^N \frac{Z_v}{r_{kv}} + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n \sum_{l>k}^n \frac{1}{r_{kl}}$$

Les interactions entre les électrons et des champs extérieurs sont négligées, cette équation ne tient compte que des termes cinétiques relatifs aux électrons et des termes d'interactions électron-noyau et noyau-électron. Pour résoudre le problème électronique d'autre théorie ont été proposées, parmi elles la théorie fonctionnelle de la densité utilisée dans nos calculs.

1.2. Théorie fonctionnelle de densité (DFT) :

Toutes les méthodes vues précédemment décrivent un système à N électrons en recherchant une approximation de la fonction d'onde exacte qui contient toutes les informations accessible du système. Pour des systèmes grands ces calculs sont très longs et nécessitent une mémoire CPU très grandes. Tandis que la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité est moins cher et elle nécessite moins de temps de calcul et donne une bonne précision, pour les systèmes de taille moyenne (> 10 et < 50 atomes).

Dans nos calculs quantiques, nous avons utilisé principalement la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité. Cette approche constitue actuellement l'une des méthodes les plus utilisées dans les calculs de structure électronique. La DFT trouve ses origines dans le modèle développé par Thomas [5] et Fermi [6] à la fin des années 1920, basée sur les propriétés électroniques d'un système qui peuvent être décrites en terme de fonctionnelles de la densité électronique, en appliquant localement des relations appropriées à un système électronique homogène [6]. La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) a pour objet de décrire un système en considérant la densité $\rho(\mathbf{r})$ comme variable de base. Ainsi, le problème de n électrons est étudié dans l'espace $\rho(\mathbf{r})$ qui est de dimension 3 au lieu de l'espace de dimension $3n$ de la fonction d'onde Ψ .

Néanmoins il faudra attendre le milieu des années 1960 et les contributions de Hohenberg, Kohn et Sham pour que soit établi le formalisme théorique sur lequel reposent les techniques de calcul actuelles. En 1964, Hohenberg et Kohn [7] ont établi le théorème fondateur de la DFT qui stipule que l'énergie de l'état fondamental d'un système d'électrons interagissant avec un potentiel externe est une fonctionnelle unique de la densité électronique $\rho(\mathbf{r})$. L'énergie peut s'écrire comme une somme de plusieurs termes :

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T[\rho(\mathbf{r})] + \int \rho(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] + Exc[\rho(\mathbf{r})] \quad (1)$$

$$\text{avec} \quad \rho(\mathbf{r}) = \psi^*(\mathbf{r}) \psi(\mathbf{r}) \quad (2)$$

$T[\rho(\mathbf{r})]$ est la contribution de l'énergie cinétique d'un système d'électrons sans interaction possédant la même densité $\rho(\mathbf{r})$ que le système réel. Les deux termes suivants caractérisent respectivement l'énergie d'attraction coulombienne électron-noyaux et l'énergie de répulsion coulombienne électron-électron. Enfin, $Exc[\rho(\mathbf{r})]$ est l'énergie d'échange-corrélation et inclut aussi la différence entre $T[\rho(\mathbf{r})]$ et l'énergie cinétique du système d'électrons en interaction. Comme dans la théorie Hartree-Fock, il existe un principe variationnel.

Kohn et Sham [8], en introduisant des orbitales dans l'expression de la fonctionnelle d'énergie, ont développé l'algorithme auto-cohérent (SCF) de résolution de l'équation de Schrödinger (appelée l'équation de Kohn-Sham) : $F\phi_i = \varepsilon_i\phi_i$ avec $F[\rho] = T_s[\rho] + V_{Coul}[\rho] + \mu_{xc}[\rho]$. La fonctionnelle d'échange-corrélation exacte étant inconnue, on utilise une fonctionnelle approchée. Nous distinguons deux grandes familles de fonctionnelles :

- Fonctionnelles locales (LDA) proposée par Kohn et Sham, en 1965 [8] sont basées sur le modèle du gaz d'électrons uniforme. Dans l'approximation de la densité locale (locale density approximation) : Cette méthode est dite locale [9], dans le sens où la valeur de la fonctionnelle en un point de l'espace ne dépend que de la densité électronique ρ en chaque point de l'espace et négligent toute influence de l'inhomogénéité du système. Les résultats obtenus sont corrects si la densité électronique ne présente pas de zones inhomogènes.

- Fonctionnelles non-locales à correction du gradient (GGA) (Generalized Gradient Approximation) : permettent de mieux représenter les régions à forte variation de charge et corrigent les défauts des fonctionnelles LDA, dans le cas où la densité électronique présente des zones inhomogènes, il faudrait inclure des corrections aux méthodes locales. Celles-ci utilisent le gradient de la densité électronique aux points considérés, qui sont une mesure de l'inhomogénéité en ces points. Les fonctionnelles les plus employées sont : Becke88, PW91, P86 et LYP [10].
- Les fonctionnelles hybrides HF-DFT estiment l'énergie d'échange à partir d'une expression qui fait intervenir l'échange exact Hartree-Fock et l'échange DFT alors que l'énergie de corrélation reste purement DFT. En général, elles conduisent à des résultats plus précis. Parmi les fonctionnelles existantes, la plus utilisée est B3LYP [10] que nous avons également choisir.

La DFT permet souvent d'obtenir, à plus faible coût, des résultats d'une précision proche de celle obtenue avec d'autre type de calculs. De plus, elle peut être utilisée pour étudier des systèmes relativement gros, contenant jusqu'à plusieurs centaines d'électrons. Ceci explique que la DFT soit aujourd'hui très utilisée pour étudier les propriétés des systèmes moléculaires ou même biologiques. Les nombreux travaux effectués ses dernières années montrent que les calculs DFT donnent de bons résultats sur des systèmes très divers. La théorie de la fonctionnelle de la densité a permis de donner un cadre conceptuel à l'étude de la réactivité et de la sélectivité d'une réaction chimique. Néanmoins, plusieurs domaines restent encore à explorer.

Avec la méthode DFT (fonctionnelles non-locales), une base triple ξ permet d'atteindre le maximum de précision, de telle sorte que l'imprécision résiduelle devrait être considérée comme une conséquence de l'imperfection de la fonctionnelle d'échange-corrélation mais non celle de la base atomique utilisée. En effet, la fonction d'onde n'est qu'un intermédiaire de calcul pour obtenir la densité électronique. Si celle-ci est bien décrite à l'aide d'une base de taille moyenne, il n'est pas indispensable de travailler avec des bases encore plus étendues.

1.3. Différentes bases de calcul :

Le choix de la base de fonctions représentant les orbitales atomiques est important car il peut influencer tant la précision des résultats obtenus que les temps de calculs.

Il existe bon nombre de bases de gaussiennes possibles. Les plus souvent utilisées sont celle qui ont été développées par Pople et collaborateurs [11-12]. On distingue deux sortes de fonctions de bases :

- ❖ Le premier type de base est formé d'orbitales de type Slater (STO) qui sont des puissances de x, y, z multiplié par $\exp(-\xi r)$ ou ξ est une constante qui détermine la taille de l'orbitale. Ces bases dites de Slater décrivent très bien les orbitales atomiques mais sont toutefois moins faciles à utiliser pour les calculs numériques.
- ❖ Le second type de bases est formé de fonctions gaussiennes faciles à calculer (GTO). Elles sont de type x, y, z multiplié par $\exp(-\alpha r^2)$ ou α est une constante qui détermine l'extension radiale de la fonction. Ces bases, contrairement à celles de Slater, ne représentent pas très bien les orbitales atomiques. Mais leur intérêt vient du fait que les intégrales qui interviennent dans le calcul sont toutes calculées sans recours à une intégration numérique.
 - Pour palier le fait que les OA ne soient pas bien représentées par les fonctions gaussiennes, on utilise des combinaisons linéaires des fonctions de bases, appelées fonctions de bases contractées.

Les différentes bases de calcul sont :

➤ **Base STO-nG (n=2,6), ou bases minimales :**

La plus utilisée est la STO-3G. Le sigle «3G» signifie que les orbitales de type Slater (STO) sont représentées par trois fonctions gaussiennes.

Elle est utilisée pour les grandes molécules et est performante pour obtenir la structure optimisée et les charges résiduelles.

➤ **Bases contractées de pople split-valence :**

Pour chaque état mono-électronique ce n'est pas plus une seule gaussienne mais une combinaison de deux ou trois gaussiennes qui est utilisée, d'où vient le nom contracté.

On peut citer comme bases contractées 3-21G, 4-31G, 4-22G, 6-21G, 6-311G et 7-41G, où le premier chiffre représente le nombre de gaussiennes utilisées pour représenter les orbitales de cœur. Les orbitales de valence y sont

représentées par deux fonctions qui sont composées du nombre de gaussiennes indiqué dans la seconde partie de la dénomination de la base. Comme le cas de la base 6-31G du carbone, par exemple, utilisera six gaussiennes pour représenter l'orbitale 1s, trois gaussiennes pour l'orbitale 2s et 1 gaussienne pour représenter les orbitales 2p.

➤ **Bases contractées de pople polarisées :**

Pour une plus grande flexibilité on peut encore rajouter des fonctions de polarisation. La dénomination la plus ancienne est l'ajout d'une étoile ou deux sur la base en question «6-31G* ou 6-31G**», et dans une désignation plus récente, le caractère de la fonction ajoutée est explicitement donné : «6-31G(d) ou 6-31(p,d)».

La base 6-31G* ou 6-31G(d) signifie qu'un ensemble de fonctions d a été rajouté à tous les atomes (sauf l'hydrogène) dans la molécule, alors que 6-31G** ou 6-31(p,d) veulent dire qu'un ensemble de fonctions p a été rajouté aux hydrogènes et que des fonctions d ont été rajoutées aux autres atomes.

➤ **Bases contractées diffuses :**

Un ou deux «+» peuvent être rajoutés tels que 6-31+G* ou 6-31++G*. Un seul signe «+» indique que les fonctions diffuses ont été rajoutées aux atomes autres que l'hydrogène (les atomes lourds). Deux signes «++» indiquent que les fonctions diffuses sont utilisées pour tous les atomes.

Les résultats obtenus après calcul, dépendent de la complexité de base choisie, plus une base est compliquée plus le temps de calcul est long.

II. Réactivité chimique :

Parallèlement à la DFT " fondamentale " ou " computationnelle " une seconde branche s'est développée à partir des années 1980, dont le but est de donner un cadre théorique précis à des concepts souvent mal définis caractérisant la réactivité chimique. C'est cet aspect de la DFT, baptisé DFT « conceptuelle » par R. G. Parr [13].

A présent, deux théories sont largement utilisées par les chimistes : la théorie des orbitales frontières et la généralisation de Klopman [14] et Salem [15] qui dérivent de la théorie des orbitales moléculaires et la théorie conceptuelle de la fonctionnelle de la densité. Ces modèles ont conduit à la définition de divers indices de réactivité.

1. Approximation des orbitales frontières :

La Théorie des Orbitales Frontières, (Frontier Molecular Orbital Theory) de Fukui, récompensée par le Prix Nobel de Chimie en 1981. Le but de cette théorie est de trouver une corrélation entre distribution électronique et réactivité.

Cette théorie a été développée dans les années 1950 par K. Fukui pour expliquer la régiosélectivité observée lors de réactions mettant en jeu des composés aromatiques. Depuis, son champ d'application a été considérablement élargi, d'abord à l'ensemble des systèmes π , puis aux systèmes σ [16].

L'idée originale de Fukui consiste à postuler qu'au cours d'une réaction entre un nucléophile et un électrophile, le transfert de charge qui a lieu au voisinage de l'état de transition met en jeu principalement les électrons de l'orbitale moléculaire la plus haute occupée (HOMO pour Highest Occupied Molecular Orbital) du nucléophile. Il doit en résulter que la densité électronique associée à ces électrons qu'il qualifie de frontaliers doit permettre d'expliquer réactivité et sélectivité. C'est le développement de la théorie de Huckel en 1931 qui a marqué le point de départ de la modélisation théorique de la réactivité.

1.1. Les électrons frontaliers :

Les orbitales frontières sont deux types d'orbitales moléculaires (OM) particulières: l'orbitale HOMO (acronyme de highest occupied molecular orbital), en français HO (pour Haute Occupée) qui est l'orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée par au moins un électron, et l'orbitale LUMO (acronyme de lowest unoccupied molecular orbital), en français BV (pour Basse Vacante) qui est l'orbitale la plus basse en énergie non occupée par un électron.

Cette approximation consiste à ne prendre en compte que les interactions stabilisantes (donc entre une orbitale occupée et une orbitale vacante) des orbitales frontières, c'est-à-dire les interactions entre LUMO et HOMO.

Soient 2 molécules, A et B, dont les orbitales moléculaires peuvent être en interaction. Les interactions les plus importantes à considérer en priorité sont celles qui se développent entre l'orbitale la plus haute occupée (HO ou HOMO) de A, et l'orbitale la plus basse vacante (BV ou LUMO) de B, et réciproquement entre la HO de B et la

BV de A, c'est-à-dire entre les orbitales frontières de A et B. Cette théorie est basée sur les hypothèses suivantes :

- L'état de transition est modélisé par un complexe formé par les réactifs.
- La formation du complexe est représentée par un échange d'électrons entre : HOMO du donneur (nucléophile), LUMO de l'accepteur (électrophile).
- La réaction la plus probable est celle qui correspond à la plus faible différence d'énergie entre HOMO et LUMO.
- Les orbitales HOMO et LUMO interagissent par leurs lobes de même signe.
- Les atomes les plus réactifs dans une molécule sont ceux qui possèdent les plus forts coefficients (en valeur absolue) pour l'OM concernée.

Dans la première approche, en se basant sur le théorème de Janak qui affirme que la dérivée partielle de l'énergie électronique par rapport au nombre d'occupation d'une spin-orbitale est égale à l'énergie de cette spin-orbitale, l'énergie E d'un système dans son état fondamental qui posséderait un nombre $N + n$ non entier d'électrons est donnée par :

$$E[N + n, \nu] = E[N, \nu] + \int_{1+n}^1 \varepsilon_{LUMO}(x) dx; 0 \leq n \leq 1$$

$$E[N + n, \nu] = E[N, \nu] - \int_{1+n}^1 \varepsilon_{HOMO}(x) dx; -1 \leq n \leq 0$$

où ε_{LUMO} et ε_{HOMO} sont respectivement l'énergie de la spin-orbitale de Kohn-Sham la plus basse vacante et la plus haute occupée lorsque le système possède N électrons. x est le nombre d'occupation de ces spin-orbitales, qui peut varier de 0 à 1 [17].

1.2. Descripteurs globaux, locaux et non-locaux :

L'électronégativité est le négatif du potentiel chimique [13] pour un système à N électrons avec une énergie totale E et un potentiel externe $v(r)$; défini comme suit :

$$\mu = -\chi = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)}$$

Avec μ est le multiplicateur de Lagrange associé à la contrainte de normalisation de DFT. La dureté (η) est dénie comme la dérivée seconde correspondante [18].

$$\eta = \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N} \right)_{v(r)} = \left(\frac{\partial \mu}{\partial N} \right)_{v(r)}$$

En utilisant une méthode de différence finie, les équations de travail pour le calcul de χ et η peuvent être données comme [19] :

$$\chi = \frac{I + A}{2}$$

$$\eta = \frac{I - A}{2}$$

Où IP et AE sont le potentiel d'ionisation et l'affinité électronique, respectivement. Si ϵ_{HOMO} et ϵ_{LUMO} sont respectivement les énergies des orbitales moléculaires occupées les plus élevées et des plus faibles orbitales moléculaires inoccupées, les équations ci-dessus peuvent être réécrites à l'aide du théorème de Koopmans [20] :

$$\mu = (\epsilon_{HOMO} + \epsilon_{LUMO})/2$$

L'indice d'électrophilie tel que défini par Parr et al. [21] est donné par :

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

La dureté est aussi le gap énergétique, elle est donnée par l'équation suivante :

$$\eta = (\epsilon_{LUMO} - \epsilon_{HOMO})$$

Dans le cadre du schéma de Kohn Sham, nous introduisons par la suite un indice de nucléophilie globale (relatif) défini comme suit [22] :

$$N_u = \varepsilon_{HOMO(N_u)} - \varepsilon_{HOMO(TCE)}$$

Notons que cette échelle de nucléophilie est référencée au tétracyanoéthylène (TCE) pris comme référence car il présente l'énergie HOMO la plus basse dans une grande série de molécules [23]. Dans le même contexte, nous avons soumis ces molécules à des calculs pour exploiter les quantités locales reliées avec la fonction de Fukui en tenant compte que les attaques nucléophiles, les quantités correspondantes sont déterminées par les équations citées ci-dessous.

La fonction de Fukui est définie comme la première dérivée de la densité électronique $\rho(r)$ d'un système par rapport au nombre d'électrons N à un potentiel externe constant $v(r)$ [24] :

$$f_k = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = \left[\frac{\delta \mu}{\delta v(r)} \right]_N$$

En utilisant des dérivées gauche et droite par rapport au nombre d'électrons, on peut définir les fonctions électrophiles et nucléophiles de Fukui pour un site k dans une molécule [25].

$$\begin{aligned} f_k^+ &= [\rho_k(N+1) - \rho_k(N)] \\ f_k^- &= [\rho_k(N) - \rho_k(N-1)] \\ f_k^0 &= [\rho_k(N+1) - \rho_k(N-1)]/2 \end{aligned}$$

Où $\rho_k(N)$, $\rho_k(N-1)$ et $\rho_k(N+1)$ sont les populations électroniques brutes au site k dans les systèmes neutres, cationiques et anioniques, respectivement. P. Pérez et al. ont montré que le site le plus nucléophile est déterminé par l'indice N_k ; défini comme le produit de l'indice de nucléophilie globale N et l'indice de Fukui nucléophilique f_k^- [24].

1.3 Substitution électrophile aromatique :

Le réactif électrophile est presque toujours un cation. La réaction met en jeu un intermédiaire réactionnel appelé « complexe σ ».

L'approximation des orbitales frontières conduit aux conclusions suivantes :

- Pour un réactif électrophile donné, la réaction est d'autant plus facile que l'orbitale HOMO du composé aromatique possède une énergie élevée.
- Le site préférentiel de substitution sur le cycle aromatique est l'atome qui possède le plus fort coefficient (en valeur absolue) pour l'orbitale HOMO.

Cette approximation a deux inconvénients :

- On néglige l'influence des charges électriques. Dans certains cas, cette influence peut contrebalancer celle des OM.
- On néglige l'influence des OM autres qu'HOMO et LUMO. Or la participation de ces OM peut être importante si la molécule est volumineuse, car alors les niveaux d'énergie tendent à se rapprocher.

1.4 Excitation (ΔE) :

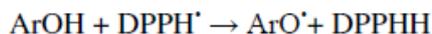
La différence de niveaux d'énergie entre les deux (HOMO-LUMO) peut servir de mesure d'excitabilité de la molécule : plus la différence d'énergie est petite, plus la molécule peut être facilement excitée.

Dans le cas des composés organiques aromatiques qui contiennent des liaisons π conjuguées, le niveau HOMO contient les électrons π (électrons mobiles partagés par les atomes de la molécule, par opposition aux électrons σ , qui forment des liens rigides), tandis que le niveau LUMO contient les électrons π^* , c'est-à-dire les électrons π excités. Chez d'autres types de molécules, cela peut être d'autres électrons (σ , par exemple) qui forment les niveaux HOMO et LUMO.

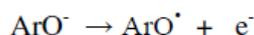
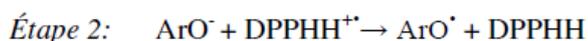
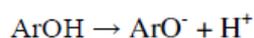
III. Evaluation de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante des composés polyphénoliques dépend de leurs caractéristiques structurales ainsi que de leur capacité de donner des protons et des électrons et avoir un effet antioxydant tel que les radicaux libres. L'activité biologique des composés phénoliques est régie par les interactions électroniques des biomolécules au sein de la cellule. Par conséquent, l'étude des propriétés électroniques et moléculaires est d'une grande importance pour comprendre le mécanisme de l'activité antioxydante des composés [26]. Il existe trois voies de réaction possibles par lesquelles les composés phénoliques (ROH) éliminent les radicaux libres (RO₂•) [27].

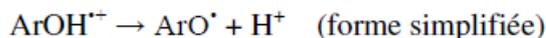
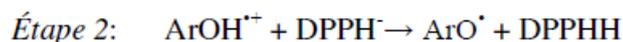
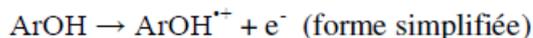
1. Le mécanisme HAT (transfert de l'atome d'hydrogène) : ce mécanisme consiste en une seule étape dans laquelle l'atome d'hydrogène est transféré en radical libre.



2. Le mécanisme SPLET (transfert séquentiel d'un électron suivi de la perte d'un proton) : ce mécanisme comporte deux étapes. La première étape est la déprotonation de la molécule mère et la formation de l'anion ArO^- . Dans la deuxième étape, l'anion formé perd un électron et conduit à la formation du radical phénoxy ArO^{\bullet} .



3. Le mécanisme SET-PT (transfert d'un seul électron suivi du transfert de protons) a été étudié dans le méthanol afin de se rapprocher des conditions expérimentales : ce mécanisme comporte aussi deux étapes. La première étape est caractérisée par le transfert d'un électron au radical libre, et la formation de radical cation $\text{ArOH}^{+\bullet}$. Dans la deuxième étape, le radical cation est déprotoné et conduit à la formation du radical phénoxy ArO^{\bullet} .



Ces trois mécanismes sont élucidés par le calcul des descripteurs thermochimiques, à savoir l'enthalpie de dissociation de la liaison (BDE), l'affinité protonique (PA), l'enthalpie de transfert d'électrons (ETE), le potentiel d'ionisation (IP)

et l'enthalpie de dissociation du proton (PDE). Ces quantités sont calculées en utilisant les équations :

$$\text{HAT : BDE} = H(\text{ArO}\bullet) + H(\text{H}\bullet) - H(\text{ArOH})$$

$$\text{SPLET: PA} = H(\text{ArO}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH})$$

$$\text{ETE} = H(\text{ArO}\bullet) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArO}^-)$$

$$\text{SET-PT: IP} = H(\text{ArOH}\bullet+) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArOH})$$

$$\text{PDE} = H(\text{ArO}\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArOH}\bullet+)$$

L'optimisation de la géométrie est systématiquement suivie d'un calcul de fréquences de vibration pour l'espèce neutre et ces radicaux libres.

Références :

- [1] : Rivail, J. L. (2012). *Éléments de chimie quantique à l'usage des chimistes* (2e édition). EDP Sciences.
- [2] : Szabo, A. (1989). NS Ostlund in *Modern Quantum Chemistry, Revised*.
- [3] : Schrödinger, E. (1926). An undulatory theory of the mechanics of atoms and molecules. *Physical review*, 28(6), 1049.
- [4] : Born, M. (1927). R. · Oppenheimer. *Ann. Physik*, 84, 457.
- [5] : Thomas, L. H. (1927, April). The effect of the orbital velocity of the electrons in heavy atoms on their stopping of α -particles. In *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 23, No. 6, pp. 713-716). Cambridge University Press.
- [6] : Fermi, E. ; Attidella *Accademia Nazionale dei Lincei, Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali, Rendiconti*; 1927; 6; 602.
- [7] : Hohenberg, P., & Kohn, W. J. P. R. (1964). Density functional theory (DFT). *Phys. Rev*, 136, B864.
- [8] : Kohn, W. (1996). Density functional and density matrix method scaling linearly with the number of atoms. *Physical Review Letters*, 76(17), 3168.
- [9] : Vosko, S. H., Wilk, L., & Nusair, M. (1980). Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Canadian Journal of physics*, 58(8), 1200-1211.
- [10] : Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B*, 37(2), 785.
- [11] : BRINKLEY J.S, POPLÉ J.A, HEHRE W.J. *J. Am. Chem. Soc.* 102939 (1980).
- [12] : HEHRE W.J, STEWART R.F, POPLÉ J.A. *J. Chem. Phys.* 2657 (1969).
- [13] : Parr, R. G., Donnelly, R. A., Levy, M., & Palke, W. E. (1978). Electronegativity: the density functional viewpoint. *The Journal of Chemical Physics*, 68(8), 3801-3807.
- [14] : Klopman, G. (1968). Chemical reactivity and the concept of charge-and frontier-controlled reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 90(2), 223-234.
- [15] : Salem, L. (1968). Intermolecular orbital theory of the interaction between conjugated systems. I. General theory. *Journal of the American Chemical Society*, 90(3), 543-552.
- [16] : Fukui, K., Yonezawa, T., & Shingu, H. (1952). A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. *The Journal of Chemical Physics*, 20(4), 722-725.
- [17] : Labet, V. (2009). *Etude Théorique de Quelques Aspects de la Réactivité des Bases de l'ADN-Définition de nouveaux outils théoriques d'étude de la réactivité chimique* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- [18] : Parr, R. G., & Pearson, R. G. (1983). Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *Journal of the American chemical society*, 105(26), 7512-7516.

- [19] : Parr, R. G. (1989). W. Yang Density functional theory of atoms and molecules. Oxford University Press, 1, 989.
- [20] : Koopmans, T. (1934). Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den einzelnen Elektronen eines Atoms. *Physica*, 1(1-6), 104-113.
- [21] : Parr, R. G., Szentpály, L. V., & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1922-1924.
- [22] : Domingo, L. R., Chamorro, E., & Pérez, P. (2008). Understanding the reactivity of captodative ethylenes in polar cycloaddition reactions. A theoretical study. *The Journal of organic chemistry*, 73(12), 4615-4624.
- [23] : Jaramillo, P. ; Domingo, L. R. ; Chamorro, E. ; Pérez, P. A Further Exploration of a Nucleophilicity Index Based on the Gas-Phase Ionization Potentials. *J. Mol. Struct. Theochem.* 2008, 865, 68-72.
- [24] : MEDJDOUB-née-GHOMRI, A. CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RÉACTIVITÉ CHIMIQUE A L'AIDE DE LA DFT CONCEPTUELLE. APPLICATIONS A LA CHIMIE HÉTÉROCYCLIQUE (Doctoral dissertation).
- [25] : Yang, W., & Mortier, W. J. (1986). The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. *Journal of the American Chemical Society*, 108(19), 5708-5711.
- [26] : Mendoza-Wilson, A. M., & Glossman-Mitnik, D. (2005). CHIH-DFT study of the electronic properties and chemical reactivity of quercetin. *Journal of Molecular Structure : THEOCHEM*, 716(1-3), 67-72.
- [27] : Saqib, M., Iqbal, S., Mahmood, A., & Akram, R. (2016). Theoretical investigation for exploring the antioxidant potential of chlorogenic acid: a density functional theory study. *International Journal of Food Properties*, 19(4), 745-751.

Partie expérimentale

CHAPITRE I :
Matériels Et Méthodes

I. MATERIELS :

1. Echantillon :

1.1. Plantes :

L'étude est faite pour deux plantes aromatiques *Laurus nobilis* et *Ammoides verticillata* dont leur identification botanique a été effectuée au niveau du département des sciences Botaniques, Université de Cagliari, Italie par Bruno De Martis, et un spécimen de chaque espèce a été déposé dans l'herbier de cette université.

Les coordonnées géographiques des deux zones choisies pour la récolte des plantes, ont été regroupées dans le Tableau suivant :

Tableau I.1 : Situation géographique des sites choisis.

Plante	Site/Région	Coordonnées géographiques
<i>Laurus nobilis</i>	<i>Tessala (Sidi Bel Abbas)</i>	35° 14' 35" N, 0° 46' 23" O <i>Altitude: 562 m</i>
<i>Ammoides verticillata</i>	<i>Guazaouet (Tlemcen)</i>	5' 38" N, 1° 51' 37" O <i>Altitude: 33m</i>

La récolte de *Lauris nobilis* a été effectuée durant les mois de Février-Mars 2018, dans la région de Tessala, Wilaya de Sidi Bel Abbas (Figure I.1).

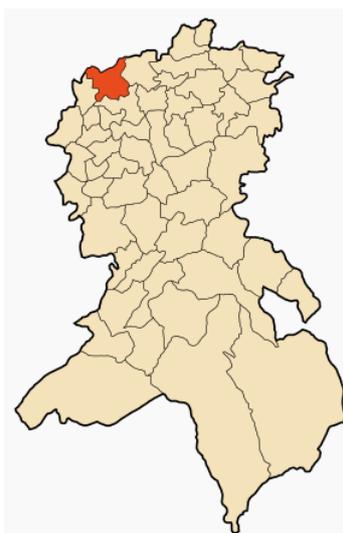


Figure I.1 : Localisation de la commune de Tessala dans la wilaya de Sidi Bel Abbès.

Les feuilles de *Laurus nobilis* ont constitué la drogue végétale de la première partie de notre étude (Figure I.2).



Figure I.2 : Feuilles de *Laurus nobilis*.

Le matériel végétal de la deuxième partie de notre étude est constitué des parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) d'*Ammoides verticillata* (Figure I.3), La récolte a été entreprise manuellement pendant le mois de juin 2018 durant lequel la plante était en pleine floraison, dans la région de Ghazaouet, Wilaya de Tlemcen (Figure I.4).



Figure I.3 : Partie aérienne d'*Ammoides verticillata*



Figure I.4 : Localisation de la commune de Ghazaouet dans la wilaya de Tlemcen.

Après leur récolte, les deux parties sélectionnées des deux plantes ont été soumises au séchage naturel effectué à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante du laboratoire (20-25°C) jusqu'à ce que le poids soit constant. Après séchage ont été réduites en une poudre à l'aide d'un pilon, et conservée dans des sacs en papier jusqu'à utilisation.



Figure I.5 : feuilles de *Laurus nobilis* et partie aérienne d'*Ammoides verticillata* séchés et broyés.

II. METHODES :

1. Extraction :

1.1. Procédés d'extraction et de conservation des huiles essentielles :

Nous avons utilisé la technique d'hydrodistillation pour l'extraction des huiles essentielles. La distillation reste la méthode la plus utilisée pour des composés aromatiques du fait qu'elle produit des substances volatiles facilement analysable par chromatographie en phase gazeuse et exigent une technique relativement simple, et un cout plus bas ainsi qu'une reproductibilité facilement contrôlable [1].

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale sèche des deux plantes a été effectuée au département de chimie et des sciences géologiques, université de Cagliari -Italie- (Department of Chemical and Geological Sciences, University of Cagliari-Italy-).

100 g de la matière végétale broyée a été mise en ébullition dans 1 L d'eau distillée pendant 3 heures dans un appareil de type Clevenger [2] (Figure I.6). Les vapeurs d'eau chargées d'huiles essentielles, en traversant le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à decanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Les huiles essentielles ont été séparées, séchées sur du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'humidité et conservées dans des flacons en verre

hermétiques recouverts de papier d'aluminium à une température comprise entre 4 et 6°C jusqu'à l'analyse pour éviter toute dégradation des huiles essentielles.

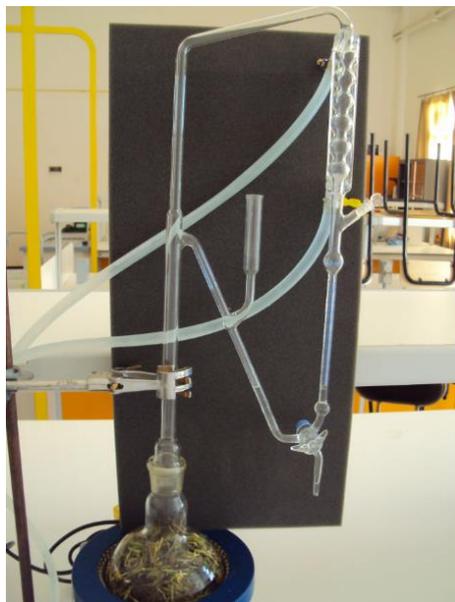


Figure I.6 : Montage d'hydro-distillation en utilisant un appareil de type Clvenger.

1.2. Procédés d'extraction et de conservation des polyphénols :

Les polyphénols sont très reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine surtout concernant leurs pouvoirs antimicrobiens et leur capacité à limiter les dommages oxydatif dus aux espèces radicalaires.

Les deux parties sélectionnées des deux plantes séchées et broyées sont soumises à une extraction, par macération via un solvant, l'Ethanol: Une quantité de 10 g de la poudre végétale est introduite dans un erlenmeyer contenant 100 ml de solvant (Ethanol pure). L'ensemble est soumis sous une agitation pendant 36 h à température ambiante et à l'abri de la lumière puis laissé précipiter, cette étape est répétée trois fois. Les extraits sont ensuite récupérés par filtration à l'aide d'un papier Whatman et conservé dans des flacons en verre. La figure ci-après illustre la démarche expérimentale utilisée pour la préparation des extraits Ethanoïques.

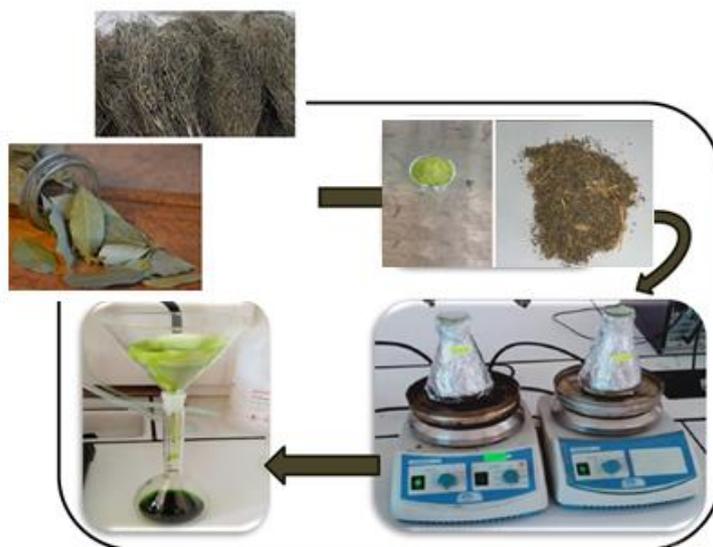


Figure I.7 : Extraction par macération successive.

Les filtrats sont additionnés et concentrés à sec en utilisant un évaporateur rotatif de type « Büchi » (Figure I.8) puis ont été conservés jusqu'à analyses.



Figure I.8 : Evaporateur rotatif de type « Büchi ».

2. Détermination du rendement d'extraction :

Selon la norme AFNOR (1986) [3], ce paramètre est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenu (E) et la masse du matériel végétal à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R_E (\%) = (m_E/m_0) \times 100$$

R_E = Le rendement d'extraction (%)

m_E = la masse d'Extrait récupérée (g)

m_0 = la masse de la matière végétale initiale (g)

3. Caractérisation des huiles essentielles :

L'importance des huiles essentielles dans divers domaines (pharmacie, cosmétique, parfumerie...) nous amène à vérifier leur qualité. La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur) ;
- Déterminer ses indices physico-chimiques (rendement, densité, indice de réfraction, et indice d'acide... etc.) ;
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

3.1. Caractéristiques organoleptiques :

Chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques tels que :

❖ L'odeur :

L'odorant est un sens chimique très sensible et l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air [4].

❖ La couleur :

La couleur des huiles essentielles dépend des composés qui la constituent, elle peut être déterminée à l'œil nu, ou en présence d'une solution étalon, qui on peut l'utiliser pour évaluer le degré de ressemblance entre la couleur du produit étalon et celle de l'huile.

❖ L'aspect physique :

De même, l'aspect d'une essence végétale change selon les composés qui la constituent, qui peut nous apparaître une huile légère ou lourde.

❖ La Saveur :

C'est le goût de l'huile.

3.2. Analyses physico-chimiques des huiles essentielles :

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) étaient autre fois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d'une huile essentielle et sa valeur sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.

Les méthodes utilisées pour déterminer ces indices physico- chimiques sont celles indiquées par le recueil des normes de l'Association Française de Normalisation [3].

3.2.1. Analyses physiques :

❖ Densité :

La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume, donc c'est le rapport du poids d'un certain volume d'un corps et le poids du même volume d'un corps de référence (eau).

$$d = \mu_{corps} / \mu_{eau}$$

Avec :

d : densité (sans unité)

μ_{corps} : masse volumique du liquide (kg.m^{-3})

μ_{eau} : masse volumique de l'eau (kg.m^{-3})

❖ Détermination de pH :

PH c'est l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+) (appelés aussi couramment protons) en solution, il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre La détermination de pH est effectuée par un papier pH, il suffit de déposer quelques gouttes de l'HE sur la bandelette et de comparer la couleur apparaît avec l'échelle de couleur qui se trouve au verso.

❖ Indice de Réfraction :

L'indice de réfraction d'un milieu homogène, transparent, isotrope peut être défini comme le pouvoir que possède ce milieu de dévier un rayon lumineux arrivant sur sa surface [5].

L'indice de réfraction varie avec la température et la longueur d'onde de la lumière utilisée. C'est la raison pour laquelle, par souci de cohérence, on travaille à 20°C avec la raie D de la vapeur de sodium (589.3 nm).

Le mode opératoire consiste les étapes suivantes :

- L'instrument est réglé à une température ambiante (20°C).
- Verser une goutte d'H.E sur la surface du prisme.
- Fermer le couvercle du prisme, et assurer que le film d'H.E ne contient pas de bulles d'air,
- puis pointer le réfractomètre en direction d'une source lumineuse.
- Quand il y a du liquide sur le prisme, le champ est divisé en une partie claire et une partie sombre. Le point auquel la ligne de démarcation entre ces deux parties traverse l'échelle verticale donne la mesure. On peut ajuster la ligne sur l'échelle verticale à l'aide de vis située au-dessus ou au-dessous de la boîte contenant le prisme.
- Lire avec précision la valeur affichée.



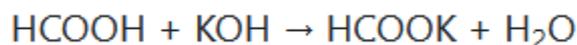
Figure I.9 : Réfractomètre

❖ Miscibilité dans l'EOH :

Toutes les HE sont solubles dans l'alcool mais à différents degrés. Nous avons mesuré la miscibilité des deux huiles dans l'éthanol à 80% V/V à 20°C : dans une éprouvette de 25ml, On introduit 1ml de l'huile essentielle à examiner. Puis on la porte à 20°C. A l'aide d'une burette de 20 ml, on ajoute par fractions de 0,1ml l'alcool à (96°) jusqu'à dissolution complète, puis on continue à ajouter le solvant par fractions de 0,5ml jusqu'à 20ml, en agitant fréquemment et énergiquement. On note le volume n d'alcool utilisé lorsqu'une solution limpide a été obtenue, si la solution devient trouble ou opalescente avant que le volume ajouté n'atteigne 20 ml, on note le volume n ml utilisé au moment de l'apparition du trouble ou de l'opalescence [6].

3.2.2. Analyses Chimiques :**❖ Détermination de l'indice d'acide (I_A):**

L'indice d'acide I_A est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g de substance [7]. L'hydroxyde de potassium réagit avec l'acide selon la réaction suivante :



Le principe consiste à neutraliser des acides libres par une solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium titrée.

Le mode opératoire consiste d'introduire 1g d'huile essentielle dans une fiole ou on ajoute 5 ml d'éthanol. Puis, on fait l'agitation et le titrage avec une solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium titrée (C (KOH) = 0.1 mol/l), en présence de phénolphthaléine (indicateur coloré). La couleur jaune clair du liquide (la couleur de l'huile essentielle) vire à la neutralisation vers une couleur rose. Le volume de KOH qui a servi à la neutralisation est lu directement sur la burette.

L'indice d'acide est exprimé par la formule :

$$I_A = (56,11 * N * V) m$$

Avec :

I_A : Indice d'acide.

N : normalité de KOH.

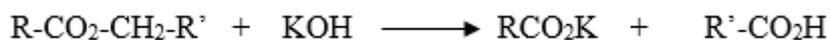
V : Volume en ml de la solution éthanóique de KOH utilisée pour le titrage.

m : masse en gramme de l'huile essentielle.

❖ **Détermination de l'indice d'Ester (I_E) :**

L'indice d'ester, est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile [7].

Hydrolyse des esters par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanóiques titrée d'hydroxyde de potassium, et dosage de l'excès par une solution titrée d'acide chlorhydrique.



Le mode opératoire consiste d'introduire dans un ballon de 100 ml, 1 g d'HE et 25 ml d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5 M. L'ensemble est porté au reflux pendant 1 h .Après refroidissement de la solution on ajoute 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphtaléine.

L'excès de KOH est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1N Jusqu'à la disparition de la couleur rose.

Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. L'indice d'ester (I_E) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_E = (2.0/m) (V_0 - V_1) - I_A$$

Avec :

V_0 : Volume en ml de la solution d'HCL (0.1 N) mesurée pour l'essai à blanc.

V_1 : Volume en ml de la solution d'HCL (0.1 N) mesurée pour le calcul d' I_E .

m : Masse en gramme de la prise essai ;

I_A : Valeur d'indice d'acide.

❖ Détermination de l'indice de saponification (I_S):

L'indice de saponification (I_S) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance [7].

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_S = I_A + I_E$$

Avec :

I_S : Indice de saponification.

I_A : Indice d'acide.

I_E : Indice d'ester.

4. Détermination de la Composition chimique:

Les propriétés physico-chimiques sont des indices propres constants d'une substance pure. Elles sont toujours mesurées, mais elles sont indiquées à titre indicatif, car la complexité des huiles essentielles ne permet pas de détecter les fraudes uniquement grâce à elles. L'analyse physico-chimique reste donc indispensable et la mieux adaptée pour connaître la composition exacte d'huile essentielle, et donc la plante de laquelle elle est extraite.

L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes nous parlons sur les méthodes microanalytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces. Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques.

4.1. Analyse et identification des huiles essentielles :

Les deux échantillons d'huile essentielle obtenus à partir des deux plantes médicinales étudiées dans ce travail ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse GC/FID et par couplage GC/MS, au niveau de département de chimie et des sciences géologiques, université de Cagliari -Italie- (Department of Chemical and Geological Sciences, University of Cagliari-Italy-).

❖ Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG-DIF) :

La chromatographie en phase gazeuse analytique a été réalisée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) qui contient un seul injecteur et deux détecteurs à ionisation de flamme (DIF) et un processeur de traitement des données. La séparation a été réalisée en utilisant (Agilent Technologies, référence 5021-7148) utilisée pour l'échantillonnage simultané de deux colonnes capillaires de silice fondue Supelco (Supelco Inc., Bellefont, PA, USA) avec différentes phases stationnaires: SPB-1 (polydiméthylsiloxane 30 m × 0,20 mm id, épaisseur du film 0,20 µm) et Supelco Wax 10 (polyéthylène glycol 30 m × 0,20 mm id, épaisseur du film 0,20 µm).

Concernant le programme de température utilisé: Il augmente à une vitesse de 3 ° C par minute, en commençant par 60 ° C jusqu'à 250 ° C pour se stabiliser pendant 20 min, et donc le temps nécessaire à l'analyse est de 82 min. avec d'autres conditions expérimentales représentées par: l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (pureté ≥ 99,9999% - Air Liquid Italy); ajusté à une vitesse linéaire de 30 cm / s; rapport de division 1:40 à l'injection de 1 µl d'un échantillon dilué (1: 100 dans le n-hexane, p / p) et une température du détecteur limitée à 250 ° C.

❖ Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectroscopie de masse (CG/SM) :

Les analyses C G– SM ont été exécutées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 6890 composé de Colonne de silice fondue HP1 (polydiméthylsiloxane 30 m × 0,25 mm id, épaisseur de film 0,25 µm), associée à un détecteur sélectif de masse Hewlett Packard 5973 (Agilent Technologies) exploité par le logiciel HP Enhanced ChemStation, version A.03.00. En plus des conditions SM suivantes qui sont: température d'interface: 250 ° C; Température de la source SM: 230 ° C; Température quadripolaire MS: 150 ° C; tension d'énergie d'ionisation: 70 eV; courant d'ionisation: 60 µA; Les spectres de masse ont été scannés dans la plage: 35–350 u; amu, avec un temps de scan de 5 scans / s. Les conditions chromatographiques sont regroupées dans le tableau I.2.

Tableau I.2 : Conditions opératoires d'analyse CG/SM

Technique	GC / FID	GC / MS
Appareil	(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (Agilent Technologies, référence 5021-7148)	Hewlett Packard 6890 HP (Agilent Technologies) 5973
Colonne capillaire	Polaire: Supelco Wax 10 (30 m × 0,20 mm × 0,20 µm)/(polyéthylène glycol) Apolaire: SPB-1 (30 m × 0,20 mm × 0,20 µm)/(polydiméthylsiloxane)	
Détecteur	T°: 250°C	Détecteur de masse: (HP 5973) T° de la source: 230°C T° de l'interface: 250°C T° quadripolaire: 150°C Mode d'ionisation: Electronique (70ev) Mode scan: intervalle de masse (35–350 m/z)
Injecteur	Injecteur automatique: Agilent 7683B T°: 250°C Mode split: 1/40	T°: 250°C Mode split: 1/40
Four	T°: de 60°C(3min) jusqu'à 250°C (20min) Vitesse de programmation: 9,5°C/min	
Gaz vecteur	Helium Débit: 30cm/s	

d'HE.

❖ **Identification des huiles essentielles :**

Les chromatogrammes et les spectres de masse ont été capturés et traités par le programme MSD ChemStation (Agilent, rév. E.01.00.237). Les concentrations relatives des composants ont été obtenues par normalisation de la surface des pics et les pourcentages de chaque composant ont été calculés sur la base de ces résultats. Les indices de rétention sont calculés par la formule de Van Den Dool définie comme suit :

$$IR = 100 * n + 100 * (t_r(A) - t_r(CB)) / t_r(CB+1) - t_r(CB)$$

Avec : **IR** : Indice de rétention du composé inconnu.

t_r(A) : Temps de rétention du composé inconnu A.

t_r(CB) : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone.

t_r(CB+1) : Temps de rétention de l'alcane à (n+1) atomes de carbone.

Ces indices de rétention de Kovats des composants ont été déterminés en fonction des temps de rétention d'une série de n-alcane (deux mélanges standards C₈–C₂₀ et C₂₁–C₄₀) qui ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques [8] Le composé A est élué entre C_B et C_{B+1}. Les t_r sont des temps de rétention absolus.

L'identification des constituants des huiles essentielles a été basée sur la comparaison de leurs indices de rétention de Kovats et leurs spectres de masse stockés dans les banques de données informatisées NIST02 du CG / Système SM et spectres des bibliothèques Adams [9-10].

La CG/FID nous a permis de faire une analyse semi- qualitative des différents composés en relevant le pourcentage surfacique de chaque constituant donné par un intégrateur ou par un micro-ordinateur relié au chromatographe. En considérant le facteur de réponse de chaque constituant comme étant égal à 1.

4.2. Analyse et identification des composants des Polyphénols :

Les deux extraits aqueux et Ethanoïque des parties aériennes d'*Ammoides verticillata* obtenus ont été analysés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CPLH), au niveau de département de biotechnologie et biologie moléculaire, Faculté des sciences et des lettres, Aksaray université d'Aksaray – Turquie- (Department of biotechnology and Molecular Biology, Faculty of science and Letters, Aksaray, University of Aksaray -Turkey-).

❖ Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (CPLH) :

Les analyses de la composition phénolique des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata* ont été faites selon Caponio et coll [11] avec de légères modifications et réalisées à l'aide d'un HP-Agilent 1290 Infinity CPLH (Figure I.10) équipé d'une colonne C₁₈ et d'un détecteur diode (DAD). 3% d'acide acétique dans (A) d'eau et de méthanol dans (B) ont été utilisés comme phase mobile. Les volumes d'injection étaient de 10 µl et les concentrations des extraits étaient de 20 mg/ml. Les éluants ont été détectés à 278 nm.



Figure I.10 : Chromatographie en phase liquide à haute performance (CPLH)

Les échantillons ont été préparés au méthanol, et les volumes d'injection étaient de 20 µl. Le gradient d'élution appliqué à un débit de 0,8 ml/min, était comme suit : 93 % A-7 % B (0,1 min), 72 % A-28 % B (20 min), 75 % A-25 % B (8 min), 70 % A-30 % B (7 min) et le même gradient pendant 15 min était de 67% A-33% B (10 min), 58% A-42% B (2 min), 50% A-50% B (8 min), 30% A-70% B (3 min), 20% A-80% B (2 min) et 100% B en 5 min jusqu'à la fin de la boucle.

❖ **Identification des composants phénolique :**

Une large gamme de molécules de type phénolique ont été utilisés comme des standards. L'identification et l'analyse quantitative ont été effectuées par comparaison avec ces standards. La quantité de chaque composé phénolique a été exprimée en mg par gramme d'extrait à l'aide de courbes d'étalonnage, qui ont été obtenues pour chaque étalon phénolique.

5. Activités biologiques et pharmacologiques:

5.1. Activité antibactérienne:

Les deux plantes étudiées sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extrait à qualités médicales intéressantes. Cette partie vise à comparer l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de ces deux plantes.

Les tests antibactériens ont été réalisés en culture in vitro contre cinq souches, l'activité antibactérienne est déterminée par la méthode d'aromatogramme (test halo d'inhibition) après détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides par la macrométhode de dilution en milieu liquide.

5.1.1. Réactifs et standards :

Les produits chimiques utilisés dans cette partie de notre étude sont les suivants :

- Tween 80.
- Bouillon Mueller-Hinton (MHB).
- Gélose Mueller Hinton (MHA ; Liofilchem, Roseto DA, Italie)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma – Aldrich)

5.1.2. Matériels et verreries :

Le matériel et la verrerie utilisés dans cette partie sont les suivants :

- Spectrophotomètre
- Etuve
- Mélangeur Vortex
- Bain marie
- Balance avec précision
- Bec bunsen
- Tubes stériles
- boîtes de Pétri stérilisées (9 cm).
- Papier Whatman Grade 1,6 mm de diamètre
- Micropipettes
- Une pince stérile
- Pipettes pasteur

5.1.3. Souches bactériennes utilisées :

Les souches utilisées pour déceler l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de *Laurus nobilis* testée individuellement, font partie de cinq genres de microorganismes, dont trois sont des souches bactériennes référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit de: deux bactéries Gram-positives: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus Faecalis* ATCC 29212 et *Escherichia coli* ATCC 25922 à Gram négatif, fournies par laboratoire de microbiologie de l'institut pasteur d'Alger, et deux autres bactéries à Gram-négatives: *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* cliniquement isolées de patients hospitalisés et obtenues à partir de l'Hôpital universitaire Hassani Abdelkader, Sidi Bel Abbes.

Tableau I.3 : Souches bactériennes testées

Souches	Gram	Morphologie microscopique
<i>S. aureus</i>	+	coccies
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	coques
<i>E coli</i>	-	bacille
<i>P. aeruginosa</i>	-	bacille
<i>Proteus mirabilis</i>	-	bacille

Les cinq souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture (bouillon nutritif).

Le choix des souches est basé sur plusieurs paramètres :

- Des souches sont d'origine hospitalière,
- Pour leurs fréquences élevées à contaminer les gens au sein de l'hôpital,
- Les souches sont choisies pour leur résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens surtout *staphylocoques aureus* (*S. aureus* est souvent retenu comme bactérie-test).

❖ **Description des bactéries étudiées :**

a. *Staphylococcus aureus* :

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif ubiquitaire, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm, qui est commensal de l'homme et se révèle être pathogène opportuniste dans certains. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [12].

S. aureus représente la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée [13] et aussi responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients.

b. *Streptococcus faecalis* :

Streptococcus faecalis est un type de streptocoque sont une bactérie Gram positive appartenant au groupe des bactéries de l'acide lactique. Les bactéries streptocoques se développent par paires, ou chaînes en raison de leur type de division cellulaire qui est une division le long d'un seul axe. *Streptococcus faecalis* a été reclassifié en *Enterococcus faecalis*. En plus d'être gram positif, c'est aussi une bactérie proportionnelle qui vit dans le tractus gastro-intestinal d'un mammifère.

c. *Escherichia coli* :

E coli est un bacille à gram négatif [12] de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm [13]. Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies [12].

d. *Pseudomonas aeruginosa* :

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires [14]. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement.

e. *Proteus mirabilis* :

Bacille aérobie, Gram négatif et très mobile. Germe impliqué dans l'apparition d'infections urinaires. Il se trouve habituellement dans l'intestin, le tractus urinaire et les reins de l'être humain. *Proteus mirabilis* est très souvent présent chez les personnes hospitalisées pour une période prolongée.

5.1.4. La macrométhode de dilution en milieu liquide:

Cette technique est utilisée afin de déterminer les paramètres d'inhibition de la croissance bactérienne (CMI : la concentration minimale inhibitrice, CMB : la concentration minimale bactéricide), des extraits actifs [15].

La CMI est une valeur indicatrice du pouvoir bactériostatique d'un antibactérien. Cette valeur est définie comme étant la concentration minimale d'extrait qui inhibe toute croissance visible après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C.

❖ **Préparations des dilutions des huiles essentielles:**

Les dilutions des deux huiles sont préparés à des différentes concentrations dans du Tween 80 pour obtenir une gamme entre 10 mg/ml à 0,1 mg/ml.

❖ **Préparation des souches microbiennes et culture in vitro :**

On a prélevé, une colonie des souches à testées. Puis, on l'a traversé dans un tube contenant 2.5 ml d'eau physiologique stérile : les colonies sont émulsionnées sur le bord du tube en dehors de l'eau. Les micro-organismes sont cultivés, dans des tubes contenant Le bouillon nutritif, ensuite on a agité vigoureusement Les tubes, des cultures bactériennes fraîches sont préparées et sont incubés pendant 24 heures dans une étuve à 37 °C.

Une suspension bactérienne était préparée avec une concentration de 0,5 McFarland standard de 10^8 CFU / ml. 13 µL de chaque concentration des extraits à tester a été placé dans des tubes contenant la suspension bactérienne, qui ont été incubés à 37 ° C pendant 24 h, le contrôle de la croissance de la bactérie se fait également dans les mêmes conditions opératoires.

❖ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration bactéricide minimale (CBM) :**

L'activité est estimée par la présence ou l'absence de croissance bactérienne, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle (0.5-8.5 mg / ml) dissoute dans DMSO a été testée dans des tubes à essai contenant du Mueller-Hinton Broth (MHB) et les cinq souches bactériennes à tester. Après incubation, à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de chaque extrait testé qui a été déterminée par inspection visuelle des tubes. Les valeurs de la CMI ont été relevées à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne (ne montrant aucune croissance bactérienne). Chaque test a été réalisé trois fois au cours de trois expériences successives [16].

La Concentration Minimale Bactéricide (CBM) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle. Juste après la lecture des résultats de CMI, la CBM a été déterminée en faisant des repiquages à partir des tubes transparents qui ne présentaient aucune croissance puis déposés «en strie» sur gélose MH. Les boîtesensemencées sont incubées 24 heures à 37°C [16].

Chaque test a été réalisé en triple et répété deux fois. Le rapport CMB / CMI fournit des informations sur le pouvoir antibactérien. En effet, lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 4, l'extrait est dit bactéricide tandis que s'il est supérieur à 4, il est bactériostatique [17].

5.1.5. Evaluation de l'Activité antimicrobienne :

La méthode d'aromatogramme a été réalisée pour évaluer le potentiel d'inhibition et l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des feuilles de *Laurus nobilis* et des parties aériennes d'*Ammoides verticillata*. Ce test a été déterminé en utilisant la technique de diffusion sur papier disque [16].

❖ Aromatogramme :

C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien qu'il s'agit de déterminer le diamètre d'inhibition des extraits des plantes médicinales selon la méthode de Vincent pour les bactéries. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible.

❖ Préparations des dilutions des extraits:

Après détermination de la CMI des deux huiles, les dilutions aux concentrations de la CMI pour les deux étaient préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

❖ Préparation de précultures :

Toutes les cultures ont été transférées dans des tubes de bouillon Mueller-Hinton (MHB) et incubées à 37 ° C pendant 24 h dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le bouillon nutritif. Les densités optiques de toutes les cultures ont été ajustées à 0,5 McFarland standard de

10^8 unités formant des colonies. (CFU) / ml, 0,1 ml de chaque suspension bactérienne a été étalé sur la surface de la gélose Mueller Hinton distribuée sur des boîtes de Pétri stérilisées (9 cm). La mise en émulsion a été réalisée grâce à la gélose afin de favoriser le contact germe/composé. La gélose se durcit en refroidissant.

À l'aide d'une pince stérile des disques de papier Whatman ont été individuellement imprégnés avec 20 μ L de chaque extrait dilué avec différentes concentrations (CMI trouvée pour chaque suspension bactérienne) puis déposés à la surface de boîtes de pétri qui avaient été préalablement ensemencé (étalé) avec les organismes à testés. Ces derniers ont été laissés 30 min à température ambiante dans des conditions stériles pour permettre la diffusion des extraits puis incubés à 37 ° C pendant 24 heures.

❖ Le halo d'inhibition :

Après un temps de latence, l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible [18]. Le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré et enregistrées en mm. Chaque halo, une zone claire montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des extraits testés.

Les tests ont été répétés trois fois, des disques imprégnés de DMSO et d'éthanol sont aussi utilisés (témoins négatifs).

❖ Lecture des résultats :

L'Effet des huiles se traduit par l'apparition autour du disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance dont la mesure de la distance de la zone est interprétée comme étant : sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis du principe actif étudié.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité [19] :

- (-) souche résistante ($D < 8$ mm)
- (+) souche sensible ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$)
- (++) souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm)
- (+++) extrêmement sensible ($D > 20$ mm)

5.2. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante des extraits naturels est une autre propriété biologique de grand intérêt parce qu'ils peuvent conserver des nourritures des effets toxiques des oxydants [20].

Afin de discuter cette activité par rapport à la composition chimique des plantes étudiées, deux études différentes ont été réalisées, une étude expérimentale pour évaluer l'activité antioxydante des extraits polyphénoliques et la deuxième étude est purement théorique dans le but de discuter la réactivité des molécules détectées expérimentalement dans ces extraits, qui ont un pouvoir antioxydant et faire une évaluation théorique de ce dernier.

Les polyphénols sont des molécules connues par leurs propriétés antioxydantes [21]. Afin d'évaluer cette activité antioxydante des extraits naturels des deux plantes étudiées, la méthode de DPPH a été adoptée.

Dans le but de comparer les résultats expérimentaux avec une étude théorique faite (calculs quantiques) des tests d'activité individuelle ont été effectués sur deux molécules bioactifs (catéchine) détectées dans l'extrait polyphénolique d'*Ammoides verticillata*.

5.2.1. Réactifs et standards :

Les produits chimiques utilisés dans cette partie de notre étude sont les suivants :

- DPPH (Sigma – Aldrich).
- Acide Ascorbique.
- Catéchine.
- Méthanol (Sigma – Aldrich).

5.2.2. Matériels et verreries :

Le matériel et la verrerie utilisés dans cette partie sont les suivants :

- Spectrophotomètre
- Etuve
- Agitateur magnétique.
- Balance avec précision

- Micropipettes (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Les embouts
- Fioles jaugées
- Tubes stériles

5.2.3. Préparations des dilutions des extraits:

Des solutions à partir des extraits des deux plantes sont préparées dans du Méthanol (six échantillons des concentrations décroissantes pour chaque solution). La couleur des solutions préparées s'éclaircit progressivement jusqu'à obtention d'une solution transparente. Pour obtenir une gamme de différentes concentrations.

5.2.4. Préparation des solutions:

Des différentes solutions avec différentes concentrations ont été préparées 12h avant pour faire cette étude, sous une agitation (pendant 6h pour la solution de DPPH et 2H pour les autres), les solutions sont laissées reposer à l'obscurité avant de faire le test.

❖ Solution de DPPH :

Une solution (10^{-4} M) de DPPH a été préparée par solubilisation dans le méthanol.

❖ Solution d'antioxydant de référence (Acide Ascorbique) :

Des solutions d'acide ascorbique ont été préparées dans le méthanol, à différentes concentrations.

❖ Solutions à tester :

Des solutions ont été préparées toujours dans le méthanol avec différentes concentrations : catéchine, Acide coummarique. Ces composés ont une activité antioxydante connue ou trouvées parmi les constituants majoritaires dans les extraits des parties aériennes d'*Ammoides verticillata*.

5.2.5. Activité de piégeage des radicaux libres :

L'activité anti-radicalaire des extraits polyphénoliques des deux plantes étudiées et des composés à testés a été évaluée spectrophotométriquement (in vitro), par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à couleur jaune, selon la méthode décrite pour la première fois par Blois [22] avec quelques modifications.

Dans des cuves de 2 ml, 100 µL de chacune des solutions méthanoïques testées et celle de l'acide ascorbique (anti-radicalaire synthétique de référence) à différentes concentrations ont été ajoutée à 900 µl de solution de DPPH. Après une période d'incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité, la diminution de l'absorbance du DPPH a été mesurée à 518 nm, à cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par un antioxydant (AH ou un autre radical), sa couleur passe de violet au jaune, et son absorbance diminue. Plus le pouvoir anti radicalaire est important plus l'antioxydant est considéré comme efficace.

Les absorbances sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre présenté dans la figure I.11. Une solution contenant le même volume de la solution de DPPH a été utilisée comme référence.



Figure I.11 : Spectrophotomètre.

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution par rapport à la valeur de contrôle (DPPH). IC50 (en µg/ml) qui exprime la concentration inhibitrice médiane de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50 % de DPPH a été également estimée par extrapolation à I=50% à partir de courbes tracées (I%= f (C)) pour chaque échantillon testé, une faible valeur d'IC50 indique une activité antioxydante forte.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des composants testés, a été déterminé selon la relation suivante :

$$I\% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) * 100 / A_{\text{blanc}}$$

Avec :

I% : Pourcentage d'inhibition du DPPH.

A_{blanc} : Absorbance du blanc (DPPH).

A_{échantillon} : Absorbance de la solution à tester.

5.3. Evaluation de la réactivité antioxydante :

Dans le but de comprendre, au niveau moléculaire, atomique voire électronique, la différence de l'activité biologique de certaines molécules considérées potentiellement thérapeutique, nous avons entrepris une étude au moyen de la chimie théorique, qui nous a permis de représenter, comprendre et interpréter les phénomènes voire les processus se déroulant dans le domaine de vivant, on parle alors de la modélisation moléculaire.

La modélisation moléculaire constitue aujourd'hui un outil pédagogique utilisé dès l'enseignement secondaire. Elle permet d'obtenir différents modes de représentation des molécules et d'identifier certaines de leurs caractéristiques. Il est possible d'élaborer des images fixes, des animations vidéo, des scripts avec menus intégrés, etc.

Dans le cadre de cette contribution théorique à nos travaux expérimentaux, nous avons réalisé une étude structurale et physicochimique des molécules présentes dans l'extrait éthanolique des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata*. Des propriétés physico-chimiques voire électroniques, nous les avons calculées dans le cadre de la mécanique quantique.

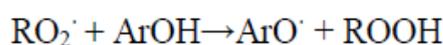
5.3.1. Caractéristiques structurales et leurs effets sur les propriétés antioxydantes :

Les propriétés chimiques et biochimiques de la catéchine sont bien décrites dans la littérature. De plus, cette molécule a été largement démontrée comme un antioxydant naturel [23].

On a remarqué que l'activité antioxydante des composés poly phénoliques, dont la catéchine, dépend de leurs caractéristiques structurales [24] ainsi que de leur

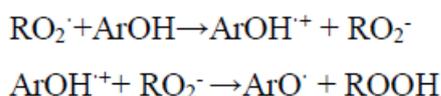
capacité à donner des protons et des électrons pour résister aux effets d'oxydants énergétiques tels que les radicaux libres. L'activité biologique des composés phénoliques est régie par les interactions électroniques des biomolécules au sein de la cellule. Par conséquent, l'étude des propriétés électroniques et moléculaires est d'une grande importance pour comprendre le mécanisme de l'activité antioxydante des composés [25]. Il existe trois voies de réaction possibles par lesquelles les composés phénoliques (ROH) éliminent les radicaux libres (RO_2^\cdot) [26].

- Le premier mécanisme impliquait le transfert d'atomes d'hydrogène (TAH) de l'antioxydant au RO_2^\cdot radical libre.



Ce mécanisme est régi par l'enthalpie de dissociation des liaisons O – H (BDE), l'énergie de dissociation d'une liaison est parfois appelée l'enthalpie de dissociation d'une liaison. Plus la valeur de BDE est bas, plus la rupture de la liaison O – H est facile et le potentiel antioxydant est fort [27].

- Le deuxième mécanisme implique le transfert d'électrons de la molécule au radical conduisant à une H-abstraction indirecte :



- Dans le troisième mécanisme, la dissociation des liaisons hétérolytiques O – H a lieu tandis que le potentiel d'ionisation de ArO^\cdot est un autre paramètre de contrôle. Du point de vue de l'action antioxydant, le résultat net des trois mécanismes est le même, c'est-à-dire la formation d'un radical phénoxy. Cependant, il est possible que dans certaines conditions, l'un des mécanismes possibles prévale.

L'objectif de cette partie du travail était d'évaluer les propriétés antioxydantes de la catéchine et de ses radicaux libres au moyen de la théorie fonctionnelle de la densité (DFT), dans le but de recueillir des informations plus précises pour une meilleure compréhension de son mécanisme de piégeage. Les trois principaux

mécanismes : transfert d'atomes d'Hydrogène (HAT), transfert séquentiel d'un électron suivi de la perte d'un proton (SPLET) et transfert d'électrons suivi du transfert de protons (SET – PT) ont fait l'objectif de cette étude théorique.

On a commencé cette partie par une étude structurale de (+)-catéchine et de son isomère (-)-épicatéchine, ainsi qu'une comparaison des propriétés du potentiel chimique de ces deux molécules toujours dans le cadre de discuter leur potentiel antioxydant. Les géométries d'équilibre de (+)-catéchine et de ses radicaux libres ainsi que de nombreux autres paramètres importants ont été calculées, tels que l'enthalpie de dissociation de la liaison (BDE), les propriétés électroniques, y compris les énergies HOMO et LUMO, des structures électroniques des espèces neutres et radicalaires, les moments dipolaires, le potentiel d'ionisation (IP), l'affinité électronique (EA) et les densités de spin ont également été étudié.

5.3.2. Présentation des molécules étudiées :

L'étude est faite pour deux isomères qui ont été identifiées dans l'extrait éthanoïque des parties aériennes d'*Ammoides verticillata*. Les critères de choix sont basés sur le pourcentage élevé de (+)-catéchine dans l'extrait (0.31 mg/g de l'extrait) et sur l'effet antioxydant important des molécules testés. Les deux molécules étudiées sont présentées dans la figure I.12 :

Catéchine : Elle comporte deux cycles benzène, un cyclohexane possédant une fonction éther (oxacyclohexane) et cinq fonctions organiques alcool.

La catéchine existe sous forme de plusieurs stéréo-isomères provenant de deux carbones asymétriques. Les formes énantiomères dans les positions 2 et 3 de l'hétérocycle central, nommée configuration R/S, donnent quatre structures. Dans la nature, les isomères les plus fréquents sont la (+)-catéchine (2R, 3S) et la (-)-épicatéchine (2R, 3R).

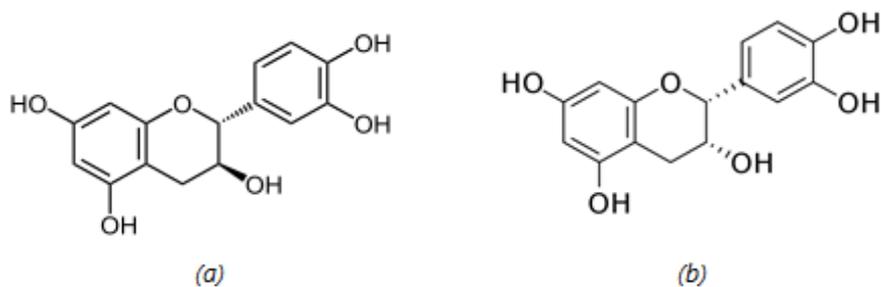


Figure I.12 : Structures des deux isomères (a) (+)-catéchine et (b) (-)-épicatechine.

5.3.3. Présentation des Logiciels utilisés :

Les progrès accomplis en informatique depuis une vingtaine d'années permettent à tout chimiste de visualiser des molécules en s'aidant d'un micro-ordinateur grâce à des programmes dont certains appartiennent au domaine public ou sont libres d'utilisation. Loin de se limiter à une simple représentation statique, ces programmes permettent de déplacer la molécule en trois dimensions et d'afficher les principaux paramètres moléculaires : distances interatomiques, angles entre les liaisons, rayons de Van der Waals etc.

Un logiciel de modélisation moléculaire comprend de manière générale les modules suivants [28] :

- Construction, visualisation et manipulation des molécules.
- Calculs
- Sauvegarde des structures et gestion des fichiers
- Etude des propriétés moléculaires.

Tous les calculs pour cette partie ont été effectués à l'aide d'un logiciel Gaussian 09. Par moyen de modélisation nous avons dessiné les molécules à étudier sur l'interface graphique GaussView5 du logiciel Gaussian.

❖ Gaussian :

D'actualité dans le monde scientifique, le programme Gaussian a permis de faire entrer la chimie quantique dans les laboratoires de chimie, de biochimie, de biotechnologie, de physique et de pharmacologie [29].

Gaussian est un logiciel de chimie numérique, de son histoire, ce logiciel est basé sur le travail de John Pople qui consistait à développer des simplifications dans l'équation de Schrödinger dans le but de la rendre aisément applicable à l'étude des molécules aussi bien simples que complexes. De part ces simplifications, John Pople a développé en 1970 [30] un programme informatique nommé Gaussian permettant de calculer la conformation moléculaire des molécules avec les longueurs des liaisons chimiques ainsi que les angles de liaison entre les atomes. Le nom Gaussian vient de l'utilisation par Pople d'orbitales gaussiennes pour accélérer le calcul par rapport aux logiciels utilisant des orbitales de Slater. Ce programme a été ensuite amélioré progressivement. En 1992, la théorie de Walter Kohn a été intégrée. Différentes approches de la chimie quantique ont été rajoutées depuis, 1992 à ce programme, notamment celle des fonctions de densité électronique de Walter Kohn [31].

Basé sur les lois premières de la mécanique quantique, Gaussian, généralement considéré comme le meilleur logiciel de chimie numérique, permet de pronostiquer des énergies, structures moléculaires et fréquences de vibration de systèmes moléculaires complexes, et d'anticiper leurs autres propriétés chimiques. Molécules et réactions sont étudiées dans une gamme étendue de conditions non seulement pour des espèces stables, ou des composés complexes mais également pour des composés impossibles à observer expérimentalement, comme des intermédiaires éphémères ou des états de transition.

Par ailleurs, Gaussian nous permet de modéliser :

- La réactivité et des spectres de grosses molécules (plus particulièrement avec la méthode ONIOM)
- Les propriétés magnétiques (déplacement chimiques, constantes de couplage RMN, ...)
- Les rotations optiques de molécules chirales,
- Les énergies grâce aux méthodes simples Hartree-Fock et Coupled Cluster. D'autre part Gaussian vous ouvre aussi la possibilité d'affiner vos analyses grâce à des méthodes de haute-précision telles que G3 et CBS-QB3
- Les spectres de vibrations (Raman pré et non résonantes), les couplages vibration/rotation.

Ce programme a révolutionné les méthodes de travail, il a permis aux chercheurs de prévoir et de visualiser par le calcul et avec des images virtuelles l'évolution d'une réaction chimique sans passer par l'expérience [28]. La version utilisée pour effectuer ces calculs était Gaussian 09.

Gaussian 09 :

Gaussian 09 la dernière version disponible de ce programme mondialement reconnu pour ses capacités de premier plan pour la modélisation électronique de structure chimique. Disponible pour la majorité des systèmes d'exploitation du marché (Windows, Macintosh, Linux...), Gaussian 09 nous permet de repousser les limites... sans autres frontières que vos ressources informatiques.

GaussView :

GaussView est l'interface graphique la plus avancée et puissante disponible pour Gaussian. Avec GaussView, nous pouvons importer ou construire les structures moléculaires qui nous intéressent, mettre en place, lancer, surveiller et contrôler les calculs de Gauss, et récupérer et afficher les résultats, le tout sans jamais quitter l'application. Pour cela nous avons dessiné les structures à étudier à l'aide de GaussView 5.0.

GaussView 5.0 :

GaussView 5.0 comprend de nombreuses nouvelles fonctionnalités conçues pour rendre le travail avec les grands systèmes d'intérêt chimique pratiques et simples. Il fournit également un soutien complet pour toutes les nouvelles méthodes et fonctions de modélisation de Gaussian 09.

5.3.4. Visualisation des molécules :

La visualisation tridimensionnelle des molécules sur un écran d'ordinateur ou infographie moléculaire permet de représenter l'image dans l'espace d'un modèle moléculaire. Pour cela, chaque atome constituant la molécule est identifié par ses coordonnées spatiales. Ces dernières sont obtenues par cristallographie, RMN, modélisation moléculaire.

De nombreuses banques de données réparties à travers le monde, proposent des fichiers décrivant les caractéristiques de molécules inorganiques et organiques. Qu'ils représentent des molécules très simples ou comportant plusieurs centaines d'atomes, ces fichiers sont facilement accessibles via le réseau Internet.

5.3.5. Description du protocole expérimental :

Dans ce travail, des calculs quantiques qui permettent de déterminer l'énergie et la structure d'équilibre des systèmes ont été faits. Nous avons utilisé la méthode de la fonctionnelle de la densité électronique (DFT), une approche très répandue à l'heure actuelle. Un double choix est nécessaire pour réaliser les calculs : le type de fonctionnelle et la base d'orbitales atomiques. Le choix d'une fonctionnelle dépend de sa performance en précision pour le système et des propriétés étudiées ainsi que du temps de calcul.

Dans les calculs DFT, la fonction de corrélation de Lee, Yang et Parr est utilisée avec la fonction d'échange de trois paramètres de Becke B3LYP [32]. Les propriétés moléculaires des composés ont été calculées en utilisant un jeu de base standard 6-31G (d, p). Le niveau B3LYP/6-31G (d,p) a été retenu ici car il présente un rapport qualité/coût satisfaisant pour effectuer des simulations sur les structures de ces molécules naturelles.

Les géométries de départ ont été obtenues à partir d'une base de données sur internet [33], Une optimisation de la géométrie a été réalisée en phase gazeuse à la théorie fonctionnelle de densité hybride B3LYP avec le même ensemble de base. Le but de cette optimisation est d'obtenir les géométries de départ pour nos calculs, et d'accélérer la convergence dans le cadre quantique.

Les fréquences vibratoires harmoniques ont été calculées au même niveau de la théorie pour confirmer l'obtention des points stationnaires. Pour les systèmes à couches ouverte (radicaux et cations radicalaires), la méthode non restreinte UB3LYP a été utilisée.

Pour se rapprocher des conditions expérimentales, ces calculs quantiques ont été réalisés dans le méthanol (solvant utilisé dans la partie expérimentale). L'énergie de solvation a été calculée en présence de méthanol simulée en utilisant le modèle de

calcul des conducteurs polarisables CPCM (conductor polarized continuum model) [34], caractérisé par une précision satisfaisante et un temps de calcul réduit [35].

Parmi les descripteurs moléculaires, les propriétés électroniques calculées dans le cadre de la mécanique quantique :

L'énergie de dissociation d'une liaison (BDE) calculée à partir des enthalpies totales. Par exemple pour un système des espèces X, H (X) à la température T les enthalpies totales peuvent être estimées à partir de la formule:

$$H(X) = E_0 + ZPE + \Delta H_{\text{trans}} + \Delta H_{\text{rot}} + \Delta H_{\text{vib}} + RT$$

où, E_0 est l'énergie électronique totale calculée, ZPE représente l'énergie du point zéro, ΔH_{trans} , ΔH_{rot} et ΔH_{vib} sont les contributions de translation, de rotation et de vibration à l'enthalpie, respectivement. Enfin, RT représente le terme de travail PV et est ajouté pour convertir l'énergie en enthalpie. L'enthalpie de dissociation de la liaison O – H est calculée à 298,15 K comme suit:

$$\text{BDE} = H_r + H_h - H_n$$

où, H_r est l'enthalpie du radical généré par H-abstraction, H_h est l'enthalpie de l'atome d'hydrogène [0,0014 Hartree] (dans le méthanol) et H_n est l'enthalpie de la molécule neutre.

Pour expliquer la stabilité relative des radicaux, des densités de spin ont également été calculées. Le moment dipolaire (μ) qui est une propriété électronique intéressante reflétant la distribution dissymétrique de charges à l'intérieur d'une molécule.

Les orbitales moléculaires frontières, qui sont deux types d'orbitales moléculaires (OM) particulières: l'orbitale HOMO (acronyme de Highest Occupied Molecular Orbital), en français HO (pour Haute Occupée) qui est l'orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée par au moins un électron, et l'orbitale LUMO (acronyme de Lowest Unoccupied Molecular Orbital), en français BV (pour Basse Vacante) qui est l'orbitale la plus basse en énergie non occupée par un électron.

Fekui démontra que seules les orbitales moléculaires frontières HOMO et LUMO présentent un réel intérêt dans l'étude des mécanismes réactionnels [36]. La HOMO contenant des électrons de plus haute énergie et a un rapport avec le caractère donneur d'électrons de la molécule, quant à LUMO nous renseigne sur le caractère accepteur d'électrons de la molécule.

La réactivité des molécules naturelles a été étudiée en utilisant plusieurs paramètres électroniques, tels que le Gap énergétique (ΔE), c'est l'écart énergétique entre l'orbitale la plus haute occupée HOMO et la plus basse vacante LUMO, les indices globaux de réactivité :

Le potentiel d'ionisation (IP) et l'affinité électronique (EA) qui peuvent être calculés comme suit [37].

$$\text{Ionization potential (IP)} = -\epsilon_{\text{HOMO}}(\text{eV})$$

$$\text{Electron affinity (EA)} = -\epsilon_{\text{LUMO}}(\text{eV})$$

L'électronégativité (χ), la dureté (η), l'indice électrophile (ω) et le nucléophile empirique N . Tous ces paramètres ont été calculés en utilisant la méthode DFT à l'aide du niveau théorique B3LYP/6-31G (d,p), car il a été démontré qu'il permettait d'obtenir des résultats fiables par rapport aux expériences [38].

Références :

- [1] : Benjilali, B. (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. *Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation*, 17-59.
- [2] : Clevenger, J. F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 17(4), 345-349.
- [3] : AFNOR, N. (1979). Recueil des normes françaises. Eaux-Méthodes d'essais.
- [4] : Rahmani Mouna et Belhathat Massouda, 2014 : Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des huiles issues de plantes médicinales (thym, Eucalyptus, Morjolaine) mémoire de master, université khemis Miliana.
- [5] : Afnor. (2000). Huiles essentielles. Echantillonnage et Méthodes d'Analyse (Tome 1) – Monographies Relatives aux Huiles Essentielles (Tome 2).
- [6] : Pharmacopée européenne. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Mai 2008.
- [7] : Murphy, C. N., & Yates, J. (2009). *The International Organization for Standardization (ISO) : global governance through voluntary consensus*. Routledge.
- [8] : Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D., & Marongiu, B. (2009). Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural product research*, 23(3), 230-237.
- [9] : Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (Vol. 456). Carol Stream, IL : Allured publishing corporation.
- [10] : NIST/EPA/NIH. (2002). *Mass spectral library*. Gaithersburg : National Institute of Standards and Technology.
- [11] : Caponio, F., Alloggio, V., & Gomes, T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203-209.
- [12] : Berche, P., Gaillard, J. L., Simonet, M., & Simonet, M. (1988). *Bactériologie : bactéries des infections humaines*. Flammarion médecine-sciences.
- [13] : Percival, S. L., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P. R., Sellwood, J., & Wyn-Jones, P. (2004). *Microbiology of waterborne diseases* (pp. 21-209). ^ eUK UK: Elsevier academic press.
- [14] : Institut Pasteur (Paris, France). Commission des laboratoires de référence et d'expertise, Richard, C., & Kiredjian, M. (1995). *Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles*

à Gram négatif aérobies stricts (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*). Institut Pasteur.

[15] : El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., & Alaoui, T. I. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Siléne vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82, 7481-7492.

[16] : Wayne, C. L. S. I. (2002). NCCLS, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twelfth Information Supplement M. National Committee for Clinical Laboratory Standards, PA: CLSI, 100-512.

[17] : Bonou, J., Baba-Moussa, F., Adéoti, Z., Ahouandjinou, H., Dougnon, V., Dossa, D., ... & Baba-Moussa, L. (2016). Antimicrobial activity of essential oils of *Lippia multiflora*, *Eugenia caryophyllata*, *Mentha piperita* and *Zingiber officinale* on five oral-dental microorganisms. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(5), 271.

[18] : Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M., & Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.

[19] : Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.

[20] : Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque, A. L., & Zygadlo, J. A. (2006). Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: Advances in research*, 37(661), 105-135.

[21] : Robak, J., & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology*, 37(5), 837-841.

[22] : Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

[23] : CHELGHOUM, F. (2015). Extraction de la catéchine à partir du thé vert et étude de son activité anti-oxydante (Doctoral dissertation).

[24] : Gomes, C. A., Girão da Cruz, T., Andrade, J. L., Milhazes, N., Borges, F., & Marques, M. P. M. (2003). Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure– activity study. *Journal of medicinal chemistry*, 46(25), 5395-5401.

[25] : Mendoza-Wilson, A. M., & Glossman-Mitnik, D. (2005). CHIH-DFT study of the electronic properties and chemical reactivity of quercetin. *Journal of Molecular Structure : THEOCHEM*, 716(1-3), 67-72.

[26] : Saqib, M., Iqbal, S., Mahmood, A., & Akram, R. (2016). Theoretical investigation for exploring the antioxidant potential of chlorogenic acid: a density functional theory study. *International Journal of Food Properties*, 19(4), 745-751.

- [27] : Saqib, M., Iqbal, S., Naeem, S., & Mahmood, A. (2013). DFT for exploring the antioxidant potential of homogentisic and orsellinic acids. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 26(6), 1209-1214.
- [28] : Kellou, S. (2009). Conformation moléculaire et calcul du potentiel intermoléculaire de la caféine (C₈H₁₀N₄O₂).
- [29] : Boukaoud, A. (2005). Structure, conformation moléculaire et spectroscopie de la théophylline monohydratée (C₇ H₈ N₄ O₂. H₂O).
- [30] : Hehre, W. J., Lathan, W. A., Ditchfield, R., Newton, M. D., & Pople, J. A. (1970). Gaussian 70 (Quantum Chemistry Program Exchange).
- [31] : W. Kohn, 1965. *Phys. Rev. A*, 140,1133.
- [32] : C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* 1988, 37, 785-789.
- [33] : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [34] : Barone, V., & Cossi, M. (1998). Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(11), 1995-2001.
- [35] : Pascual-Ahuir, J. L., Silla, E., Tomasi, J., & Bonaccorsi, R. (1987). Electrostatic interaction of a solute with a continuum. Improved description of the cavity and of the surface cavity bound charge distribution. *Journal of Computational Chemistry*, 8(6), 778-787.
- [36] : Fukui, K., Yonezawa, T., & Shingu, H. (1952). A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. *The Journal of Chemical Physics*, 20(4), 722-725.
- [37] : Kohn, W., Becke, A. D., & Parr, R. G. (1996). Density functional theory of electronic structure. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(31), 12974-12980.
- [38] : Franzen, P. L., Zilio, S. C., Machado, A. E. H., Madurro, J. M., Brito-Madurro, A. G., Ueno, L. T., ... & Neto, N. B. (2008). Experimental and theoretical investigation of first hyperpolarizability in aminophenols. *Journal of Molecular Structure*, 892(1-3), 254-260.
- [39] : Foresman, J. B. (1996). Frisch *Æ* (1996) Exploring chemistry with electronic structure methods. Gaussian Inc., Pittsburgh, 36, 118-137.

CHAPITRE II :
Résultats et Discussion

I. RESULTATS ET DISCUSSION :

1. Détermination du rendement d'extraction :

Les teneurs en huile essentielle, exprimées en ml du distillat par 100 g de matière végétale, ont été déterminées juste après extraction. Le rendement en huile essentielle a été exprimé en % (p / p) et il représente la quantité d'huile essentielle extraite de 100 g de matière végétale séchée. La même chose pour l' extrait polyphénolique des deux plantes.

Le rendement des extractions ont été calculés selon la norme (A.F.N.O.R) (1986) [1]. Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau suivant:

Tableau II.1 : Rendements des extraits des deux plantes étudiées

	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Ammoides verticillata</i>
HE (%)	1,867±0,75	2,428±0,45
EE-OH (%)	15,62±0,03	16,35±0,01

(HE): Huile essentielle, Extrait ethanoique (EE-OH).

L'hydrodistillation des feuilles de *Laurus nobilis*, récoltées dans les montagnes de Tessala a fourni une huile essentielle caractérisée par une odeur cinéolée, avec un rendement de 1,867% sur la base du poids de matière sèche.

Des études antérieures des différents organes des deux plantes étudiées, ont signalé des différents rendements, quelques résultats sont représentés dans les Tableaux II.2 et II.3 :

Nous remarquons que la valeur de rendement en huile essentielle obtenu à partir des feuilles sèches de *Laurus nobilis*, de la région de Tessala est similaire à celle de la région d'Alger, indiqué par Ouafi et col (2017) qui était 1,80% sur la base du poids de matière sèche [2]. Et dans cette étude, la même méthode d'extraction est utilisée pour le même organe de même type d'espèce dans trois régions différentes a donnée des quantités en huiles essentielles différentes et cela a confirmé que le lieu de la récolte (le type de sol, l'environnement....) implique sur le rendement.

Tableau II.2 : Rendements d'extraction de *Laurus nobilis* rapportés dans la littérature

Lieu de récolte	Période de récolte	Organe/Etat	Méthode d'extraction	Rendement %	Référence
Tunisie (Rafraf)	Février / 2017	Feuilles / sèches	HD	0.55	[3]
Algérie (Tizi-Ouzou)	Février / 2010	Feuilles / sèches	HD	0.46	
Tunisie (Tunis)				0.584	[4]
Maroc (Marrakech)				0.655	
Algérie (Alger)	—	Feuilles / sèches	HD	1.80	[2]
		Feuilles / fraîches		0.78	
Jordanie (Amman)	printemps / 2007	Feuilles / sèches	HD	0.17	[6]
Italie (Sardaigne)	—	Feuilles / sèches	S-CO ₂	0.82	[7]

HD : Hydrodistillation, EV : Entraînement à la vapeur, S-CO₂ : CO₂ supercritique.

La teneur en HE (rendement) des feuilles de laurier variait dans une large gamme, de 0,5 à 4,3% [3-5]. Les différences de rendements en HEs pour les mêmes espèces rapportés dans la bibliographie, dépendent de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques comme la période de récolte, le type d'organes récoltés, le sol et la pluviométrie [8].

D'après les études réalisées sur les parties aériennes d'*Ammoides verticillata* (Tableau II.3), l'hydrodistillation de la partie aérienne de la plante marocaine donne : 2% d'HE d'*Ammoides verticillata* de la région d'Ahfir par rapport à la matière végétale sèche [9]. Bnouham et col (2015) signalent un rendement de 2.51% par hydrodistillation du matériel sèche de la région de Oujda [10]. L'*Ammoides verticillata* d'Ain Temouchent montre que le rendement en HE est de 2.58 % (ml/100 g) [11]. Daira et col (2016) Obtiennent différentes valeurs de rendement en HE : 1.77-2.16 % pour différents espèces récoltés dans plusieurs stations dans la région de Souk Ahras [12], Ziani (2017) obtient 3.85% à partir des parties aériennes d' *Ammoides verticillata* de guelma [13], autre étude sur *Ammoides verticillata* d'Oran, Seddik (2010) enregistre plusieurs valeurs de rendements entre 3.33 et 4.41 %, des HEs extraites par des différentes méthodes d'extraction [14].

Tableau II.3 : Rendements d'extraction d'*Ammoides verticillata* rapportés dans la littérature

Lieu de récolte	Période de récolte	Organe/Etat	Méthode d'extraction	Rendement %	Référence
Maroc (Ahfir)	May 2009	Partie aérienne / sèche	HD	2	[9]
Maroc (Oujda)	----	Partie aérienne / sèche	HD	2.51	[10]
Algérie (Ain Temouchent.)	Juin 2013	Partie aérienne / sèche	HD	2.58	[11]
Algérie (Souk-Ahras)	Juin 2015	Partie aérienne / sèche	HD	1.77-2.16	[12]
Algérie (guelma)	---	Partie aérienne / sèche	HD	3.85	[13]
Algérie (Oran)	---	Partie aérienne / sèche	HD ES	3.33-4.41	[14]

HD : Hydrodistillation, ES : extraction par solvant

D'après l'étude de Seddik (2010), on constate que la méthode d'extraction influence sur le rendement puisque la même partie de la plante a donné des valeurs de rendement différentes en utilisant deux méthodes d'extraction différentes [14].

L'hydro-distillation des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata* récoltées de la région de Ghazaouet a donné une huile essentielle de couleur jaune clair avec un rendement de 2,428 % (Tableau II.1). Le rendement obtenu est très proche à ceux obtenus par Bnouham et col (2012) pour l'huile issue de Maroc de 2,51% [10] et Attou et col (2017), lors d'une hydrodistillation effectuée, soit 2,58 % [11]. Nous remarquons que ces valeurs sont similaires à celles obtenues à partir des parties aériennes sèches issues du Souk Ahras, alors qu'ils sont nettement plus faibles par rapport à ceux de la partie aérienne sèche issue de Guelma et d'Oran. Et *Ammoides verticillata* de la station de Terny wilaya de Tlemcen ont donné un rendement inférieure. Le rendement en huile essentielle extraite par hydrodistillation de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* variait de 2,1 à 2,9% pour les échantillons au début de floraison et de 3,0% à 5,4% pour les échantillons à la fin de floraison [15]. Notre huile avec un rendement de 2,428 % est au début de floraison. Les observations faites, ont servi comme base pour dire que les différences des teneurs en huiles essentielles

d'*Ammoides verticillata* sont étroitement liées aux conditions culturelles, tant climatiques ; dispersion géographique, altitude et nature du sol.

La comparaison des rendements d'extraction, met en évidence une certaine différence entre les résidus issus des deux plantes étudiées (Figure II.1).

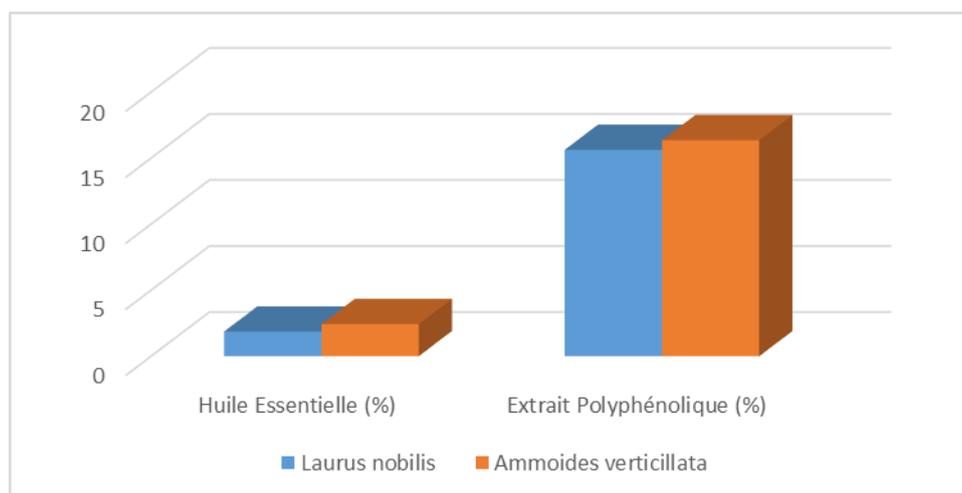


Figure II.1 : Histogramme des rendements d'extraction des deux plantes étudiées.

L'hydrodistillation a donné une teneur en HEs de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* supérieur à celle trouvée dans les feuilles sèches de *Laurus nobilis*. Il a été démontré que les rendements étaient influencés par divers facteurs, tels que la nature de l'espèce, l'environnement de croissance, la période de récolte, les parties de la plante, la méthode d'extraction, etc...

Les rendements en HE varient énormément d'une espèce à l'autre. Le rendement est bien évidemment directement impliqué dans le prix final de l'HE : plus la quantité de plante nécessaire pour produire une HE est importante, plus le prix est élevé. Concernant le laurier noble, le rendement est moyen ce qui explique un prix peu élevé dans la gamme des HE. Il se situe entre 0,8 et 4% pour une durée moyenne de 3 heures de distillation [16].

La durée d'hydrodistillation pour l'obtention des HEs varie selon les espèces. Certaines plantes nécessitent cinq heures d'extraction tandis que d'autres espèces ont besoin que de quatre voir trois heures. Plus le matériel végétal est épais et dur, plus il faut du temps pour libérer la fraction volatile.

L'extraction par macération (Extraits Ethanoïques) a fourni des rendements élevés pour les parties aériennes d'*Ammoides verticillata* en comparant par ceux trouvés lors de l'extraction des polyphénols des feuilles de *Laurus nobilis*. Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction représentés dans l'histogramme illustré dans la Figure II.1, que pour la même méthode d'extraction utilisée, les rendements différents significativement d'une espèce végétale à l'autre. De ce fait, on constate que les rendements d'extraction diffèrent significativement en fonction de la plante donc de la famille botanique et aussi en fonction des solvants et technique d'extraction utilisés qui permet d'obtenir des quantités variables de composants extractibles à partir de chaque plante.

En fait, la solubilité des composés phénoliques est régie par la nature chimique des composés de l'échantillon de plante, ainsi par la polarité des solvants utilisés [17]. Les matières végétales peuvent contenir des composés phénoliques variant de simples (par exemple, les acides phénoliques, anthocyanes) à des substances hautement polymérisés (par exemple des tanins) en quantités différentes. En outre, les composés phénoliques peuvent également être associés à d'autres composants tels que des glucides et des protéines [18]. Par conséquent, il n'y a pas de procédure d'extraction universelle appropriée pour l'extraction de tous les composés phénoliques de plantes.

2. Caractérisation des huiles essentielles :

2.1. Caractéristiques organoleptiques :

Les caractéristiques organoleptiques des HEs des feuilles de *Laurus nobilis* et de la partie aérienne d' *Ammoides verticillata* sont résumées dans le tableau suivant:

Les huiles essentielles des deux plantes ayant un aspect liquide mobile. La mise en évidence l'influence de genre et de la partie de la plante sur la couleur des huiles, du jaune clair enregistrée pour l' huile extraite par *Ammoides verticillata* au incolore à jaune pâle qui caractérise l'huile obtenue par hydrodistillation des feuilles de *Laurus nobilis*. Des notes olfactives proches sont enregistrées pour les deux huiles essentielles extraites: les odeurs des deux HEs *Ammoides verticillata* et *Laurus nobilis* sont fortes et piquantes rappelant l'odeur des deux plantes, des arômes originels des espèces fraîches utilisées, avec un caractère aromatique.

Tableau II.4 : Caractéristiques organoleptiques des HEs des deux espèces étudiés

espèce	Odeur	Couleur	Aspect physique	Saveur	Image
<i>Laurus nobilis</i> (feuilles)	odeur cinéolée typique	Incolore à jaune pâle	Liquide Mobile	épicée très forte	
<i>Ammoides verticillata</i> (partie aérienne)	Odeur fort piquant	jaune clair	Liquide mobile	épicée	

les H.E. forment un groupe très homogène en ce qui concerne leurs propriétés physico-chimiques, ce sont généralement, des liquides d'odeur et de saveur forte, rarement colorés et volatils à température ambiante, sans aspect gras ni onctueux ce qui les différencie des huiles fixes [19]. On note que nos huiles essentielles ayant des caractéristiques organoleptiques du même ordre à des propriétés en accord et comparables avec ceux donnés par la littérature et par la direction de normalisation aromatique [20].

2.2. Analyses physico-chimiques des huiles essentielles :

2.2.1. Analyses physiques :

La Densité, l'indice de réfraction, PH ...etc., constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Ces propriétés physico-chimiques sont déterminées selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (A.F.N.O.R) [20].

. Les résultats des analyses physiques obtenus pour les deux huiles étudiées sont portés dans le tableau suivant:

Tableau II.5 : Analyses physiques des HEs des deux espèces étudiés

	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Ammoides verticillata</i>	Norme
Densité d ²⁰	0,9121± 0.01	0,968± 0.001	NF ISO 279
Indice de réfraction n _d t	1,468± 0.001	1.512± 0.001	NF ISO 280
PH	6.34	5.22	5-6.5
Miscibilité dans l'EOH	9 volumes d'EOH/ 1 volume d'HE	7 volumes d'EOH / 1 volume d'HE	NF ISO 875

EOH : Ethanol, HE : Huile Essentielle

La densité relative constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une huile essentielle dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, etc...). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité des produits ainsi que les tentatives de fraudes et d'altération.

D'après le Tableau II.5 nous avons enregistré des valeurs de densité d'environ 0,9121 pour les feuilles de *Laurus nobilis*, ce résultat est proche de ceux trouvés par d'autres auteurs : 0,915 et 0,924 pour la même huile essentielle [21-22]. Et 0,968 pour les parties aériennes d'*Ammoides verticillata*, le même résultat déterminé se rapproche de celui relevé dans la littérature [14].

La première remarque observée c'est que les deux valeurs des densités des deux HEs sont inférieures à celle de l'eau ($d_{\text{eau}}=1$), donc les deux huiles essentielles sont moins denses que l'eau. Et ce résultat confirme les paramètres édictées par l'association française de normalisation (A.F.N.O.R), la densité des HEs est en général inférieure à celle de l'eau [20].

Et si on compare ces deux valeurs on trouve que la densité d'*Ammoides verticillata* est supérieure à celle de *Laurus nobilis*, cela peut être expliqué par la différence dans la composition chimique des deux huiles essentielles, l'huile d'*Ammoides verticillata* contient des phénols (thymol et carvacrol) qui rend l'huile plus dense surtout avec la grande teneur du premier phénol (thymol: 58,5%) [23].

Selon les normes (A.F.N.O.R), le pH des HEs est compris entre 5-6,5 et les deux huiles avec les pH 6.34 et 5.22 sont conformes à cette exigence.

L'indice de réfraction est un paramètre d'identification qualitative et une manière de vérifier le degré de pureté des huiles essentielles [24]. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. L'indice de réfraction n est une constante spécifique à chaque HE. Mesuré grâce à un réfractomètre, cet indice provient du phénomène de réfraction qui désigne le changement de direction de la lumière au passage d'un milieu à un autre.

Les HE ont un indice de réfraction élevé, de l'ordre de 1,447 à 1,469 pour le laurier noble [16]. L'indice de réfraction de l'HE extraite par hydrodistillation des

feuilles de *Laurus nobilis* récolté dans la région de Tessala qui est de 1,468 confirme ces résultats déjà trouvés.

L'indice de réfraction trouvé pour l'HE des parties aériennes d'*Ammoides verticillata* est de 1,512, proche de celui trouvé par Attou (2017) [25].

Et si on compare les indices de réfraction mesurés pour les deux Huiles étudiées, on note que l'HE d'*Ammoides verticillata* enregistre l'indice le plus élevé. Les indices de réfraction des huiles essentielles étudiées 1,468 et 1.512, sont les deux normatifs selon les standards français des huiles essentielles. Cet indice dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température [21].

La bonne miscibilité des HEs montre la possibilité de l'utiliser dans les préparations pharmaceutiques [26]. Après l'ajout de l'alcool par fraction de 0,1 ml puis 0,5 ml la solution reste limpide jusqu'à 20 ml. Donc notre huile est soluble dans n ml d'éthanol avec n compris entre 0 ml et 20 ml. La miscibilité des huiles essentielles étudiées dans l'éthanol à 80% (V/V) à 20°C, nous a donné des volumes de 9 d'EOH / 1 volume d'HE de *Laurus nobilis* et 7 volumes d'EOH / 1 volume d'HE d'*Ammoides verticillata*.

2.2.2. Analyses Chimiques :

Les constantes physiques sont toujours mesurées et présentes dans le bulletin d'analyse, mais elles ne permettent pas à elles seules de faire Le contrôle de qualité d'une HE.

L'analyse des HE doit donc être complétée par un contrôle chimique, indispensable pour connaître avec précision la composition de l'HE. Les valeurs des analyses chimiques de nos huiles sont résumées dans le Tableau II.6.

Tableau II.6 : Analyses chimiques des HEs des deux espèces étudiés

	Indice d'acide (I _A)	Indice d'Ester (I _E)	Indice de saponification (I _S)
<i>Laurus nobilis</i>	2.5± 0,11	44.036 ± 0,19	46.536 ± 0,63
<i>Ammoides verticillata</i>	5.568± 0,15	37.490 ± 0,63	43.058 ± 0,48
Norme	NF ISO 1242	NF ISO 709	NF ISO 523

L'indice d'acide témoigne de la « fraîcheur » d'une huile et correspond à la masse nécessaire d'hydroxyde de potassium (en milligramme) à ajouter pour un gramme d'huile, il indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans nos huiles essentielles. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité des huiles à subir des altérations, notamment l'oxydation. Donc il indique d'une part le degré de conservation des huiles extraites et d'autre part leur qualité.

D'après nos résultats (Tableau II.6), l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* présente un indice d'acide égale à 2,5 mg de KOH/1g d'HE, et celle de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* était trouvé 5,568, ces résultats nous renseignent que ces deux huiles sont dans les normes, point de vue acidité.

En comparant les valeurs d'indice d'acide obtenues. On remarque que l'indice d'acide de l'HE d'*Ammoides verticillata* est supérieur à celle de l'HE de *laurus nobilis*. Sachant qu'une faible valeur d'acidité caractérise la pureté et la stabilité d'une huile à la température ambiante [27], on peut dire que l'HE de *laurus nobilis* est la plus pure et stable par rapport à celle d'*Ammoides verticillata*.

La valeur de l'indice d'ester de l'huile des parties aériennes d'*Ammoides verticillata*, soit $(37.490 \pm 0,63)$ mg KOH/g d'huile, est plus faible que l'indice d'ester de l'HE des feuilles de *laurus nobilis*, soit $(44.036 \pm 0,19)$ mg de KOH/g d'huile.

L'indice de saponification de l'huile de *laurus nobilis* ($46.536 \pm 0,63$ mg de KOH/g d'huile) est plus grand de celui de l'huile d'*Ammoides verticillata* ($43.058 \pm 0,48$). La connaissance de l'indice de saponification d'un corps gras nous renseigne sur la longueur de la chaîne carbonée des acides constituant ce corps gras. L'indice de saponification d'un corps gras est d'autant plus élevé que la chaîne carbonée des acides gras est courte [28]. Ce qui veut dire que ces deux huiles contiennent une quantité moyenne d'acides gras libres. L'indice de saponification élevé rend l'huile destinée à la fabrication des savons et des baumes.

Ces caractéristiques montrent que ces deux huiles étudiées présentent des propriétés physicochimiques intéressantes dans l'ensemble. Toutefois, la densité, l'indice de réfraction, miscibilité dans l'alcool et l'acidité, l'indice d'acide, l'indice d'ester et de saponification montrent que des précautions de pré-raffinage et de conditionnement doivent être prises afin de limiter une dégradation de la qualité physico-chimique et fonctionnelle des deux huiles [29]. L'analyse globale de ces différentes propriétés permet de dire que ces deux huiles pourraient être valorisées dans l'agroalimentaire et/ou dans la phytothérapie. Toutefois, des études supplémentaires doivent être entreprises pour apprécier sa composition chimique en acides gras et sa toxicité avant d'envisager son utilisation dans l'alimentation.

3. Détermination de la Composition chimique :

Le choix de ces deux plantes s'est basé sur ses vertus médicinales connues. Pour cela, il était nécessaire de connaître leur composition chimique en huile essentielle et en polyphénols poussant spontanément dans deux régions différentes en Algérie.

a. Identification des huiles essentielles :

La composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles sèches de *Laurus nobilis*, est illustrée dans le Tableau II.7. A l'aide de l'analyse chimique GC / MS, vingt-sept composés ont été identifiés dans cette huile, répertoriés selon leur élution sur une colonne capillaire HP-5 SM.

Tableau II.7 : Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extraite à partir des feuilles sèches de *Laurus nobilis*.

No.	Composé	Formule	Classe	Quantité %	Tr	Ik
1.	α -thuyene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.3	5.0467	929
2.	α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	3.2	5.2172	937
3.	camphene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.3	5.5844	952
4.	sabinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	5.6	6.2095	976
5.	β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	2.6	6.3101	979
6.	myrcene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.4	6.6685	991
7.	limonene	C ₁₀ H ₁₆	MH	1.6	7.8576	1031
8.	1,8-cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	30.1	7.9363	1034
9.	γ -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.6	8.8499	1061
10.	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	1.0	10.3188	1099
11.	terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	1.9	13.3396	1178
12.	α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	2.8	13.886	1190
13.	isobornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	MO	0.8	17.8467	1286
14.	δ -terpynil acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	MO	0.8	19.1625	1317
15.	α -terpynil acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	MO	21.6	20.5264	1351
16.	β -elemene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.6	22.2619	1391
17.	methyl eugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	Ph-Pr	16.9	22.8303	1404
18.	(E)-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	SH	1.1	23.3286	1418
19.	α -guaiene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.5	24.133	1438
20.	germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	SH	1.0	25.8117	1479
21.	β -selinene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.6	26.0084	1484
22.	bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.8	26.4281	1494
23.	α -bulnesene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.2	26.7559	1502
24.	elemicin	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	Ph-Pr	0.9	28.8674	1558
25.	β -eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	0.4	32.2379	1648
26.	α -eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	0.6	32.3865	1652
27.	apiole	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	Ph-Pr	0.9	33.4925	1681
Totale identifié				27 composés		
Totale identifié %				98.1 %		
MO				59%		
MH				14.6%		
SO				1%		
SH				4,8%		
Ph-Pr				18,7%		

MH Monoterpènes Hydrocarbure, MO Monoterpènes oxygénés, SH Sesquiterpènes Hydrocarbure, SO Sesquiterpènes oxygénés, Ph-Pr phénylpropènes, Tr Temps de retentio, Ik index Kovats.

Comme la montre le Tableau II.7, les composants identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis*, représentent 98,1% de composés volatils qui sont principalement constitués des monoterpènes oxygénés (MO), avec la contribution la plus élevée 59%.

1,8-cinéole est le principal composant de cette huile avec la plus grande quantité (30,1%) suivi de α -terpynil acétate dont son pourcentage est de (21,6%) de l'huile (Figure II.2). Dans les feuilles d'huile essentielle tunisienne, les mêmes composants majoritaires ont été trouvés, le 1,8 cinéole et l'acétate d' α -terpinyle [30]. L'étude de Kilic et al aussi pour l'huile essentielle de laurier turque indique que dans les feuilles de laurier fraîches 26 composants ont été identifiés, le 1,8-cinéole était le composant principal, suivi par α -terpinyle acétate [31]. Beaucoup de travaux ont trouvés que les principaux constituants de toutes les huiles étudiées de laurier étaient le 1,8-cinéole, le méthyleugénol et l'acétate d' α -terpinyle. [32] et nos résultat confirment leurs résultats.

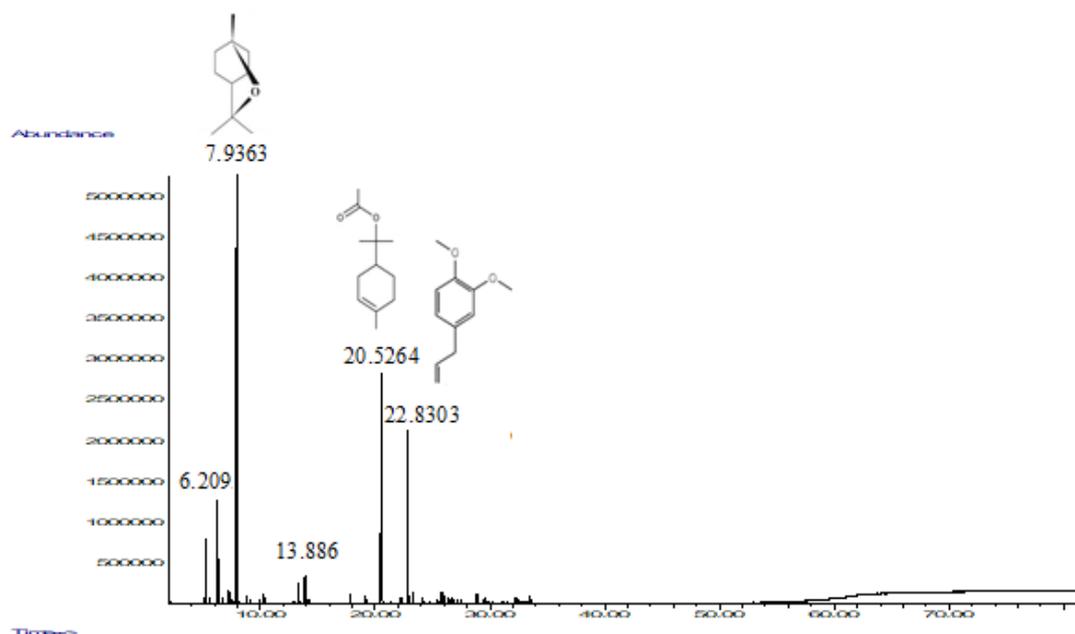


Figure II.2 : Chromatogramme CG/SM de l'HE des feuilles de *Laurus nobilis*. Temps de rétention des composants majoritaires sont : 1, 8-cineole (7.9363), methyl eugenol (22.8303), α -terpynil acetate (20.5264).

La classe avec la deuxième teneur la plus élevée était les composés phénylpropènes à 18,7%, représentés par le méthyl eugénol comme composé majoritaire de cette famille avec (16,9%), l'élémicine et l'apiole (0,9%) pour chaque composé.

D'autres composants tels que l'assabinène (5,6%), le α -pinène et le β -pinène avec (3,2%), (2,6%) respectivement, appartiennent à la classe des hydrocarbures monoterpènes (MH) qui représentent 14,6% de cette huile essentielle.

Les sesquiterpènes représentent la classe de composés mineurs 5,8% de l'huile, les sesquiterpènes hydrocarbures (SH) 4,8% composés essentiellement de : (E)-caryophyllène (1,1%), bicyclogermacrène (0,8%), β -sélinène (0,6%) et les sesquiterpènes oxygénés (SO) 1%: α -eudesmol (0,6%) et β -eudesmol (0,4%).

Des études antérieures des feuilles de *Laurus nobilis* ont détecté les quantités les plus élevées obtenues à partir d'huiles essentielles comme suit : 1,8-cinéole (21,15%), suivi du linalol (12,15%) et du méthyleugénol (4,63%) [33], 1, 8-cinéole (41,0%), acétate d' α -terpinyle (14,4%), sabinène (8,8%) et β -linalol (4,9%) [34], 1,8 cinéole (31,9%) sabinène (12,2%) et linalol (10,2%) [4], 1,8 Cineole (46,16%) [35], 1,8 Cineole (27,2%), acétate d' α -terpinyle (10,2%), linalol (8,4%) et méthyleugénol (5,4%) [36], acétate d' α -terpinyle (28,43%), méthyleugénol (19,57%) [37].

En général, ces résultats ont confirmé que, bien qu'il y ait presque les mêmes composants dans l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* dans différentes régions du monde, les différences quantitatives entre tous les principaux composés étaient assez grandes. Les différences dans la composition quantitative et qualitative de l'HE et leurs compositions déterminées dans notre étude et dans des travaux précédents pourraient être dues à de nombreux facteurs, tels que les différentes conditions géographiques et environnementales et les périodes de croissance des plantes [38] ainsi que la méthode d'extraction de l'huile essentielle.

Selon la classification de P. Franchomme publiée dans son ouvrage « l'aromathérapie exactement », l'HE de laurier noble peut être classée parmi les HE dites « polymoléculaires » car elle contient, à côté de quelques molécules majoritaires, une abondance de molécules (plus de 276 composés actifs) [23].

La composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir de l'hydrodistillation des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata*, est illustrée dans le tableau suivant :

Tableau II.8 : Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extraite par hydrodistillation des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata*.

No.	Composé	Formule	Classe	Quantité %	Tr	I _k
1.	α -thuyene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.2	5.0421	925
2.	α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.9	5.2172	932
3.	sabinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.2	6.2093	971
4.	β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.1	6.3099	975
5.	myrcene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.5	6.6684	990
6.	o-cymene	C ₁₀ H ₁₄	MH	8.9	7.7132	1023
7.	limonene	C ₁₀ H ₁₆	MH	13.2	7.8574	1027
8.	γ -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	8.5	8.8585	1056
9.	terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.1	9.9033	1087
10.	terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	0.6	13.3394	1177
11.	α -terpinen-7-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	MO	7.2	17.9121	1286
12.	thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	PhM	58.5	18.2487	1294
13.	carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	PhM	0.7	18.559	1301
Totale identifié				13 composés		
Total identifié %				99.6 %		
MH				32.6%		
MO				7.8%		
PhM				59.2%		

MH Monoterpènes Hydrocarbure, MO Monoterpènes oxygénés, PhM phénol monoterpénoïde T_r Temps de retentio, I_k index Kovats.

L'analyse chimique de l'huile essentielle obtenue par technique GC / MS des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata*, comme la montre le Tableau II.8, représente treize composés qui ont été identifiés, 99,6% des composés des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata* sont volatils constitués seulement de trois classes :

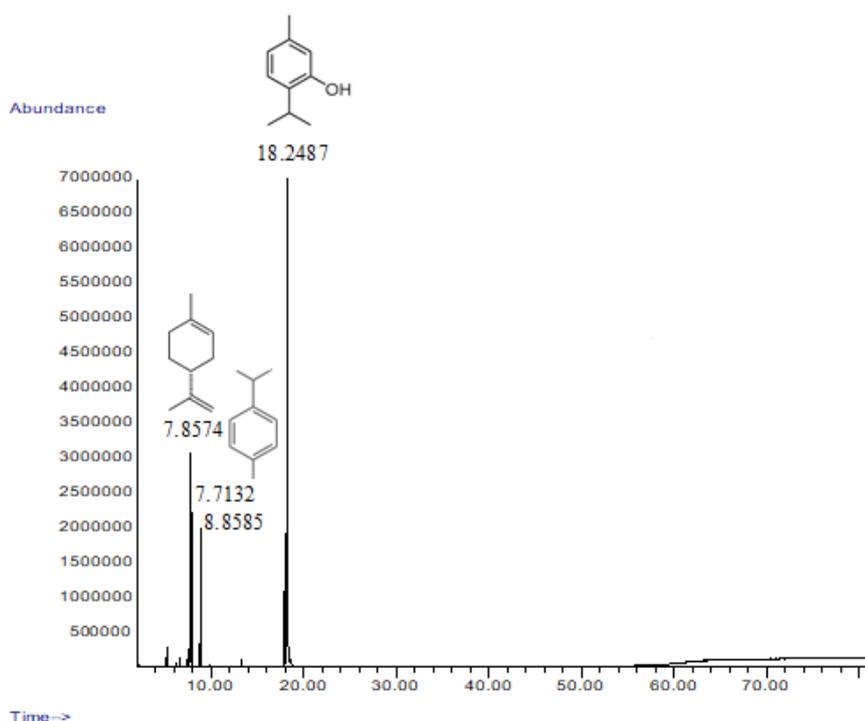


Figure II.3 : Chromatogramme CG/SM de l'HE des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata*. Temps de rétention des composants majoritaires sont : thymol (18.2487), limonène (7.8574), ρ -cymene (7.7132).

Les phénols monoterpénoides avec la contribution la plus élevée 59.2% qui regroupe seulement deux constituants, le composé majoritaire de cette huile qui est le thymol avec le pourcentage le plus élevé (58,5%) (Figure II.3), et le carvacrol (0,7%).

La deuxième classe constituée de deuxième composé majoritaire était les hydrocarbures monoterpènes (MH) avec une teneur de 32,6%, représentés par limonene avec (13,2%), ρ -cymene et γ -terpinène (8,9%) et (8,5%) respectivement, et d'autres composants tels que α -pinène (0,9%), myrcène (0,5%), le α -thuyène et sabinène avec (0,2%) pour chaque composé.

Le α -terpinen-7-ol (7,2%), et le terpinen-4-ol avec (7,2%), (0,6%) respectivement, constituent la troisième classe de l'huile essentielle des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata* qui est les monoterpènes oxygénés (MO).

Très peu d'études ont été menées sur la composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* à travers le monde. Une nette différence dans sa composition chimique a été notée et ceci, d'un organe à l'autre (graines, tiges, fleurs et fruits) et d'un pays à l'autre, il est à souligné que pour un même pays tel que l'Algérie, il existe trois propositions de chémotypes [39].

D'après le Tableau II.8, La composition chimique de l'huiles essentielle de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* de la région de Ghazaouet (Tlemcen) extraite par hydrodistillation est identique à celle identifié pour le même espèce de la région de Oujda (Maroc) par Bnouham et col (2012), qui ont identifié dix composants seulement, les principaux composants étaient thymol (57,38%), D-limonène (17,50%), γ -terpinène (12,25%), m-cymène (8,73%), α -pinène (1,34%), carvacrol (0,83%), 1-terpène-4-ol (0,62%), β -thujène (0,47%) et β -myrcène (0,42%) respectivement. Thymol, D-limonène, γ -terpinène et m-cymène représentent 95,86% du pétrole total [10].

Des études antérieures d'*Ammoides verticillata* ont détecté les compositions et les quantités les plus élevées obtenues à partir d'huiles essentielles comme suit :

Une analyse chimique de l'huile essentielle des parties aériennes d'*Ammoides verticillata* récoltée à Terni (région de Tlemcen) faite par Bendahou (2007) révèle l'importante présence du thymol (50.1%), suivi par le Ortho-cymène (15.6%), le limonène (15.0%), le γ -terpinène (6.6%) [40], on remarque que les mêmes constituants presque ont été détectés dans nos résultats, avec des quantités différentes. Les

principaux composants dans l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région de Beni Snous proche de Tlemcen étaient le carvacrol (44,3%), le limonène (19,3%), p-cymène (19,2%) et γ -terpinène (11,1%) [41]. La composition chimique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de Maroc (Ahfir) était caractérisée par 19 composés, était dominée par des composés phénoliques (48,0%), avec des quantités élevées de carvacrol (44,6%) et le thymol (3,4%). Les autres composants majeurs étaient le limonène (18,4%), g-terpinène (9,5%), p-cymène (9,4%) et géranyl acétate (4,7%) [9]. Si on compare cette huile avec nos résultats on observe qu'en général les mêmes composés caractérisent les deux huiles mais avec grande différences de teneurs surtout concernant les composés majoritaires, malgré que les deux lieux de récoltes sont très proche (mêmes conditions climatiques et environnementales), mais cette différence peut être due aux autres facteurs influençant comme période de récolte...

Les composés majoritaires de cette espèce diffèrent d'une région à une autre : Tefiani (2015) a déclaré que d'après le screening de la documentation traitant la composition chimique, pour la première fois qu'on constate que l'alcool cumine soit le composé majoritaire des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, et que son huile essentielle extraite d'*Ammoides verticillata* du Zedigua (Tlemcen) appartient au groupe chimique à Alcool cumine/limonène/p-cymène/thymol [42]. La plupart des études ont rapporté que le thymol est le principal composant de l'huile d'*Ammoides verticillata*. Bekhechi et col (2010) qui ont fait l'extraction des HEs des plantes récoltées sur cinq différents endroits dans le nord-ouest de l'Algérie, toutes les deux semaines pendant la phase de floraison, ont démontré que l'isothymol était le composant majeur lorsque la plante a été récoltée près de la mer à basse altitude et au début de la phase de floraison. Dans d'autres cas, le thymol est le constituant prédominant [15].

Ces études ont montré une variation de la composition chimique et cette différence a été enregistrée pour les deux huiles des feuilles de *Laurus nobilis* et des parties aériennes d'*Ammoides verticillata* et leurs pourcentages dépendent de chaque région et les différences de biotypes et origines géographiques et ces différences sont également attribuées aux variations de l'environnement comme le type de sol, les radiations solaires et les insectes ravageurs. Il est généralement attribué à de nombreux facteurs y compris la période de récolte et la méthode de séchage des plantes ainsi qu'aux organes sélectionnés et la méthode d'extraction. Ces facteurs pourraient

conduisent à l'activation et l'inactivation de certains groupes enzymatiques entraînant une régulation à la hausse ou à la baisse de certaines voies de biosynthèse [43].

Lorsqu'on compare la composition chimique des HEs pour les deux espèces étudiées avec celles rapportées dans la littérature, on constate que la composition chimique des deux HEs est presque identique à celles énoncées dans la littérature, c'est-à-dire on retrouve les mêmes composés avec différentes quantités.

Les composés des deux huiles essentielles ont été triés en fonction de leurs familles chimiques et une valeur moyenne a été calculée pour chaque famille ainsi que pour les composés identifiés (Tableau II.9).

Tableau II.9 : Composition chimique des HEs extraites par hydrodistillation des deux plantes étudiées.

famille chimique	<i>Laurus nobilis</i>		<i>Ammoides verticillata</i>	
	Teneur %	Composé	Teneur %	Composé
OXYDES TERPENIQUES C ₁₀ H ₁₈ O	30.1%	1,8-cineole (30.1%)		
MONOTERPENES (C ₅ H _x) ₂	14.6%	sabinene (5.6%) α-pinene (3.2%) β-pinene (2.6%) Limonene (1.6%) γ-terpinene (0.6%) Myrcene (0.4%) α-thuyene (0.3%) camphene (0.3%)	32.6%	Limonene (13.2%) o-cymene (8.9%) γ-terpinene (8.5%) α-pinene (0.9%) Myrcene (0.5%) α-thuyene (0.2%) sabinene (0.2%) β-pinene (0.1%) Terpinolene (0.1%)
ESTERS C ₁₂ H ₂₀ O ₂	23.2%	acetate de α-terpynil (21.6%) acetate d'isobornyl (0.8%) acetate de δ-terpynil (0.8%)		
MONOTERPENOLS C ₁₀ H ₁₈ O	5.7%	α-terpineol (2.8%) terpinen-4-ol (1.9%) Linalool (1.0%)	7.8%	α-terpinen-7-ol (7.2%) terpinen-4-ol (0.6%)
SESQUITERPENES C ₁₅ H ₂₄	4.8%	(E)-caryophyllene (1.1%) germacrene D (1.0%) Bicyclogermacrene (0.8%) β-elemene (0.6%) β-selinene (0.6%) α-guaiene (0.5%) α-bulnesene (0.2%)		
PHENYLPROPENES (ETHERS) C ₁₁ H ₁₄ O ₂ , C ₁₂ H ₁₆ O ₃ , C ₁₂ H ₁₆ O ₄	18.7%	methyl eugenol (16.9%) elemicin (0.9%) apiole (0.9%)		
SESQUITERPENOLS C ₁₅ H ₂₆ O	1.0%	β-eudesmol (0.4%) α-eudesmol (0.6%)		
PHENOL MONOTERPENOÏDE C ₁₀ H ₁₄ O			59.2%	Thymol (58.5%) Carvacrol (0.7%)
Total		98.1%		99.6%

D'après le Tableau II.9, si on compare les deux huiles essentielles, on trouve que celle des feuilles de *Laurus nobilis* est plus riche en composés (27 constituants) par rapport à l'HE des parties aériennes d'*Ammoides verticillata* que (13 constituants) ont été identifiés.

Les deux HEs sont avérées riches en monoterpènes (>20%) de l'HE de *Laurus nobilis* et (>40%) de l'HE d'*Ammoides verticillata*, dont les monoterpènes caractérisent les HEs des espèces appartenant aux Lamiacées, Apiacées et Astéracées [16], et cela explique la différence des pourcentages entre les deux huiles.

Les monoterpènes sont les molécules les plus banales constituant des HE. Ce sont les plus retrouvés car il faut savoir que plus une molécule contient d'atomes de carbones, plus elle sera « lourde » et donc difficile à extraire lors de la distillation.

Parmi les monoterpènes : mono-insaturés, on trouve les mêmes constituants pratiquement dans les deux huiles essentielles de *Laurus nobilis* et d'*Ammoides verticillata*: α et β -pinènes, sabinène, myrcène, α -thuyène qui présentent avec différents pourcentages. Ainsi que les monoterpènes bi-insaturés sont les plus courants avec notamment le limonène contenu dans les deux huiles avec différence de quantité, le limonène (13.2%) est un des produits majoritaires de l'HE d'*Ammoides verticillata*.

γ -terpinène est un autre monoterpène monocyclique bi-insaturé présents avec des concentrations moindres dans l'HE de laurier < 1%, et celles de Noukha à des concentrations plus élevées proche de 10%.

Les oxydes terpéniques sont des molécules très fréquemment rencontrées dans les HEs des Lauraceae. Le 1,8-cinéole également appelé eucalyptol est le constituant le plus présent dans l'HE de *Laurus nobilis* (30%).

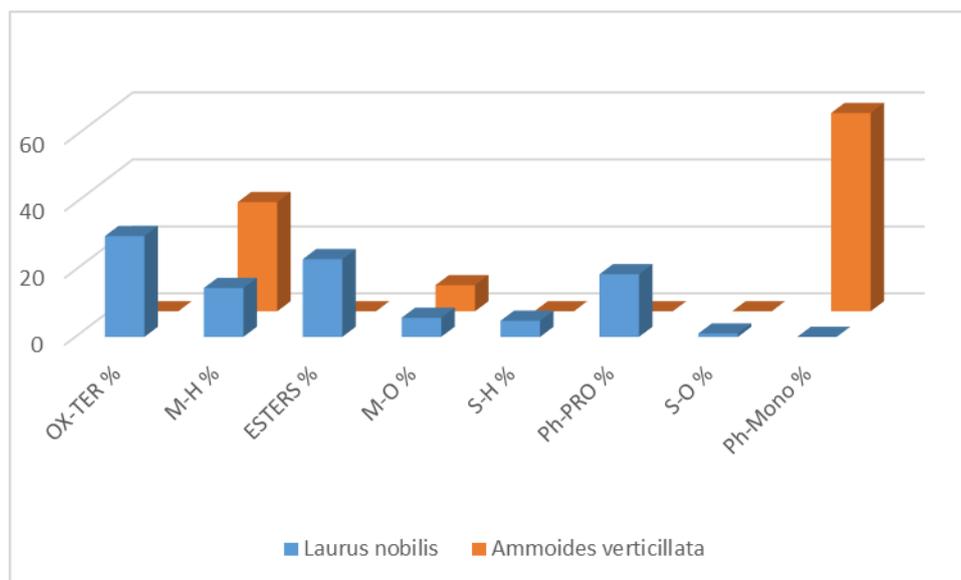


Figure II.4 : Histogramme de la composition chimique des deux plantes étudiées.

D'après les résultats obtenus concernant la composition, on observe qu'il y a une variabilité chimique importante entre les deux huiles étudiées (Figure II.4).

D'après l'histogramme, une nette prédominance des phénols mono terpénoides (Ph-Mono), a été notée pour l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (59,2%), Contrairement à l'huile essentielle de *Laurus nobilis* qui ne contient pas des phénols.

Les Monoterpénols ou alcools monoterpéniques (MO) présentent une toxicité moindre que les phénols (hépatotoxicité, toxicité cutanée) mais sont également moins puissants, Ils sont bien représentés dans les deux huiles essentielles par ces deux molécules : α -terpinéol et terpinène-4-ol ainsi que linalol dans l'HE de Laurier.

Les sesquiterpènes (SH) sont des terpènes à 15 carbones, présents en petites quantités à environ 5% dans l'HE de laurier noble et ne trouve pas dans l'huile essentielle de Noukha. Les trois molécules constituant les principaux sesquiterpènes retrouvés à faible dose dans l'HE des feuilles de *Laurus nobilis* (< 2%) : β -caryophyllène, Bicyclogermacrène et β -élémane

Les sesquiterpénols (SO) sont présents en faible quantité dans l'HE de laurier (1%) avec essentiellement α -eudesmol, et β -eudesmol.

Les esters sont absents dans l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* et sont bien représentés dans l'HE de laurier ; à hauteur de (23,2%). L'acétate d' α -terpényle,

avec un pourcentage de 21,6% c'est le deuxième produit majoritaire dans l'HE de *Laurus nobilis* et l'acétate d'isobornyle ainsi que l'acétate de δ -terpényle avec de petites quantités 0,8% pour chacun.

Le troisième composé majoritaire de l'HE de *Laurus nobilis* c'est le méthyleugénol (16,9%), qui appartient à la classe des phénylpropènes ; il présente également une fonction éther. Le méthyleugénol fait partie des phénylpropènes-éthers. Cette famille représente environ 20% de l'HE de *Laurus nobilis*, et ne constitue pas la composition de l'HE d'*Ammoides verticillata*.

De point de vue composition chimique, on remarque que l'HE d'*Ammoides verticillata* est riche en phénols (Thymol) et les alcools mono- terpéniques caractérisent l'HE de *Laurus nobilis* comme le 1,8-Cinéole (30,1%) et α -terpynil acetate (21,6%).

b. Identification des polyphénols :

La chromatographie liquide à haute performance est la technique analytique qui domine essentiellement le domaine de la séparation et la caractérisation des composés phénoliques tels que les flavonoïdes. Nous avons donc analysé les composés polyphénoliques contenus dans l'extrait méthanoïque des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata*, 3 longueurs d'ondes ont été choisies, chacune d'elle caractérise l'absorbance d'une classe de composés : 254,4 nm (les composés possédant un noyau aromatique), 278,4 nm (les acides phénoliques et les flavonols), 330,4 nm (les flavonols). Ces longueurs d'ondes ont été choisies selon une étude bibliographique préliminaire concernant les composés polyphénoliques et leurs limites d'absorption en UV [44]. Les profils chromatographiques obtenus sont illustrés sur la Figure II.5.

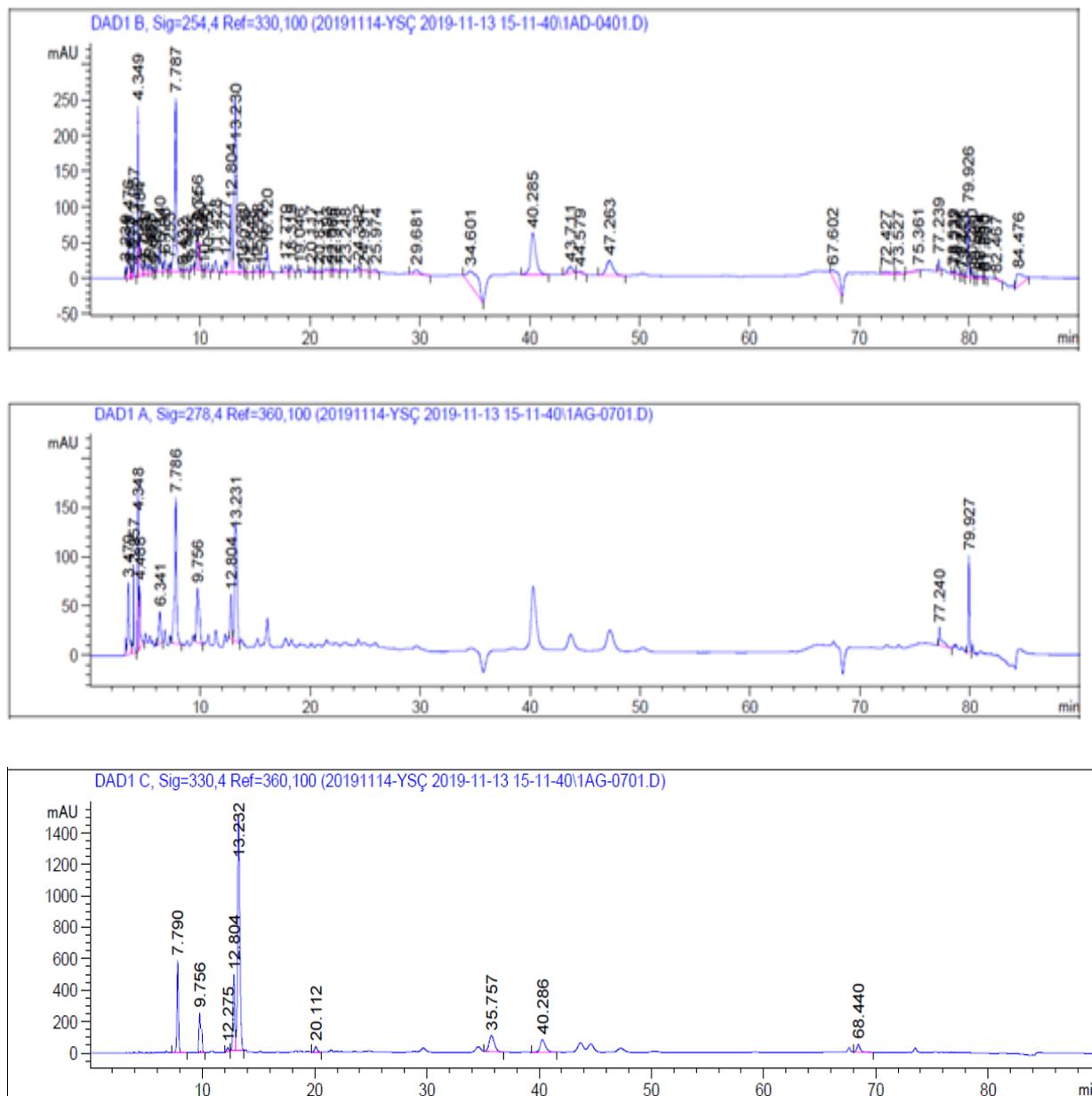


Figure II.5 : Profils Chromatographiques obtenus par HPLC de l'Extrait éthanoïque (EOH) des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata* à 254, 278 et 330 nm. . Temps de rétention des composants majoritaires sont: Acide hydroxybenzoïque (7.786), Acide benzoïque (4.348), catéchine (13.231).

La composition phénolique d'extrait éthanoïque d'*Ammoides verticillata* est indiquée dans le Tableau II.10 et les structures des principaux composants sont indiquées sur la Figure II.6.

Tableau II.10 : Teneur en composés phénoliques d'extrait éthanoïque des parties aériennes sèches d'*Ammoides verticillata*.

Pics	Rt (min) de l'extrait	Area [AU.S]	quantité [AU]	Identification	C (mg/g de l'extrait)
1	7.786	5575.72021	587.688262	Acide hydroxybenzoïque	0,82
2	4.348	676.21637	209.48628	Acide benzoïque	0,44
3	13.231	2140.68115	164.91562	catéchine	0,31
4	7.790	1519.9292	108.19612	Acide rosmarinique	0,28
5	79.927	670.87274	98.23108	Acide gallique	0,27
6	35.756	3832.5957	92.85575	Acide coumarique	0,22
7	3.957	375.40363	88.59271	Acide caféique	0,15
8	40.285	2768.20508	80.3939	Acide transferrulique	0,15
9	3.479	908.84241	73.35969	Hesperidine	0,14
10	4.488	600.32239	64.54588	Acide sinapique	0,13
11	9.756	947.40796	55.74296	quercitine	0,10
12	12.804	470.28821	45.18754	Epicatchine	0,06
13	68.277	690.37811	24.17306	Acide Cinamique	0,04
14	68.441	839.73969	35.53756	Acide chlorogénique	0,04
15	20.112	523.86853	35.29807	Acide synergique	0,03
Totale identifié			15 composés		
Totale des acides phénoliques			2.54 mg/g of extract		
Totale des flavonoïdes			0.61 mg/g of extract		
Totale des composés phénoliques			3.15 mg/g of extract		

La composition phénolique d'extrait éthanoïque de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, déterminé par CPLH, a présenté : quinze composés (onze dérivés d'acide phénolique et cinq flavonoïdes) ont été identifiés et cette identification a été faite en comparant les résultats obtenus à partir des spectres et les données de la littérature. L'extrait contient principalement les dérivés des acides phénols. L'acide hydroxybenzoïque, l'acide benzoïque et la catéchine, étaient les composants les plus abondants avec des masses de 0,82, 0,44, et 0,31 mg / g de cet extrait, respectivement. Ziani et col. [45] ont rapporté que le principal composé phénolique d'*Ammoides verticillata* était un acide chlorogénique (L'acide 5-O-caféoylquinique) suivi d'un flavone (lutéoline-3-O-glucoside). Deux autres acides chlorogéniques (les acides 3-O- et 4-O-caféoylquinique), la quercétine (quercétine-O-acétylhexoside) et lutéoline-3-O-

rutinoside ont été déclarés comme d'autres composés phénoliques identifiés. Une autre étude, Saleem et col. [46] ont analysé l'extrait éthanoïque d'*Ammoides verticillata*, et ils ont déterminé ses composants phénoliques. Selon leurs résultats, l'acide rosmarinique, rutine, catéchine et l'acide caféique, ont été détectés comme composants principaux.

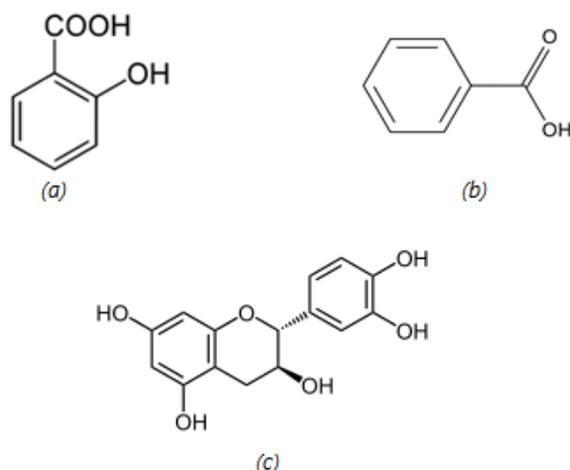


Figure II.6 : Structures des composants majoritaires de l'extrait : (a) Acide hydroxybenzoïque, (b) Acide benzoïque, (c) catéchine.

Les composés 4, 6, 7, 8, 10 et 14 ont été identifiés comme des dérivés d'acide cinnamique qui sont : acide rosmarinique, coumarique, caféique, transferrulique, sinapique, chlorogénique, ainsi que l'acide cinnamique avec un temps de rétention de 68.277 min, l'extrait contient aussi de l'acide benzoïque (composés 2) et ses dérivés : acide hydroxybenzoïque, gallique, synergique qui sont les composés 1, 5 et 15 respectivement.

Les composés 3, 11, et 12 ont été identifiés comme des dérivés de flavonol : catéchine, epicatéchine, quercitrine, selon leurs spectres, quantités et leur temps de rétention par rapport aux normes.

Le composé 9 permettant son identification comme flavonone qui est dérivé 2,3-dihydrogénés des flavones (Hesperidine).

Les acides hydroxybenzoïque et benzoïque étaient les plus abondants composés, suivi d'un dérivé de flavonol catéchine.

Les résultats d'une étude faite sur *Ammoides verticillata* collectée dans six stations de la willaya de Souk-Ahras durant la période de floraison (Juin 2015), révèlent que cette plante possède un éventail de substances potentiellement bioactives (composés phénoliques, composés terpéniques) susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique...) [12] et nos résultats ont confirmé sa richesse en composés phénoliques et terpéniques.

4. Activité antimicrobienne :

Les activités biologiques des huiles essentielles sont étroitement liées à sa composition chimique, et chaque huile essentielle est un mélange très complexe constitué de plusieurs dizaines de composés en proportions très variés [15].

Dans le cadre de notre recherche sur les produits naturels actifs pour lutter contre les infections microbiennes, la présente étude a pour objectif de déterminer les effets antimicrobiens de chaque huile essentielle contre un panel de microorganismes pathogènes d'importance clinique : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. Le choix de ces souches bactériennes était pour leur large impact pathologique dû à leur pouvoir pathogène en relation avec des problèmes plus généraux de résistance aux antibiotiques habituels.

a. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration bactéricide minimale (CBM) :

Afin d'obtenir des données plus précises sur les propriétés antibactériennes des huiles essentielles des deux plantes étudiées, la CMI et la CBM testées ont été déterminées, La CMI a été définie comme la concentration la plus basse qui inhibait complètement la croissance des micro-organismes (Figure II.7) et la CBM est la plus faible concentration nécessaire pour tuer une bactérie.

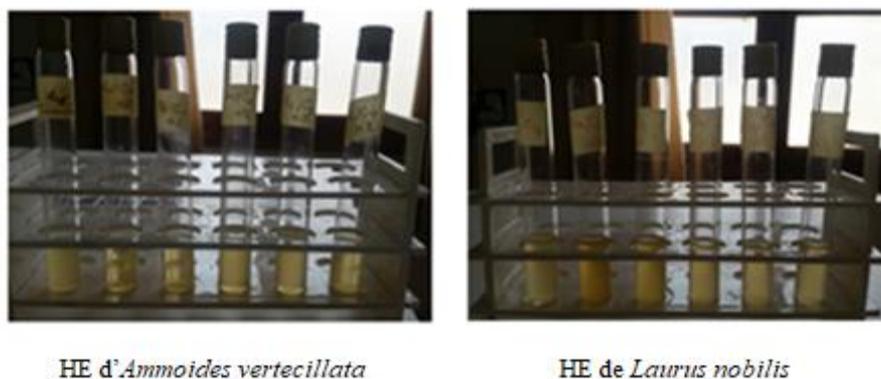


Figure II.7 : Observation de la croissance d'*Escherichia coli* à différentes concentrations des deux huiles essentielles testées.

Le Tableau II.11 présente les valeurs CMI et CBM de l'huile essentielle des deux huiles essentielles testées, ces résultats ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* testée s'est avérée active contre *Streptococcus Faecalis* et *Staphylococcus aureus* à une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,25 mg / ml pour les deux souches bactériennes, et par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, l'huile a montré plus de sensibilité, avec des concentrations inhibitrices minimales (CMI) de 0,75 et 0,5 mg / ml respectivement, les mêmes valeurs sont obtenues par Goudjil et col [47].

Rappelons que le ratio CMB/CMI permet de déterminer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle, si ce rapport est inférieur ou égale à 4, l'extrait est alors bactéricide et s'il est supérieur à 4 on dit que l'extrait est bactériostatique [48]. À partir des résultats obtenus on peut calculer CBM/ CMI et discuter l'effet de cette huile. Puisque on a trouvé des valeurs inférieures à 4 (Tableau II.11), nous pouvons dire que l'HE extraite des feuilles de *Laurus nobilis* a un effet bactéricide contre toutes les souches testées, le même résultat trouvé par Rao et col [49].

Tableau II.11 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CBM) des deux huiles essentielles testées.

Microorganismes	HE <i>Laurus nobilis</i>			HE <i>Ammoides vertecillata</i>		
	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI
<i>Escherichia coli</i>	0.5± 0.10	0.8± 0.00	1.6<4	0.2± 0.00	0.3± 0.00	1.5<4
<i>Proteus mirabilis</i>	0.35± 0.10	0.5± 0.05	1.42<4	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2<4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.75± 0.00	0.75± 0.00	1<4	3.1 ± 0.6	6.2 ± 1.1	2<4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25± 0.05	0.5± 0.10	2<4	1.5 ± 0.2	6.2 ± 0.9	4.13>4
<i>Streptococcus Faecalis</i>	0.25± 0.05	0.65± 0.15	2.6<4	1.5 ± 0.3	3.8 ± 0.2	2.53<4

L'huile essentielle des parties aériennes d'*A.verticillata* a présenté un pouvoir antimicrobien contre les cinq souches, les résultats microbiologiques montrent que les CMI et CMB les plus faibles ont été observées chez *Escherichia coli*, (0,2 et 0,3 mg/ml, respectivement), *Pseudomonas aeruginosa* a été la souche la plus résistante et la croissance bactérienne s'absente à une concentration minimale CMI égale à 3,1 mg /ml, les souches de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus Faecalis* sont inhibées à partir d'un même seuil de concentration de l'huile essentielle, soit 1,5 mg /ml, les microorganismes les plus sensibles sont *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* inhibés à des concentrations inhibitrices minimales (CMI) nettement inférieures, soit 0,2 et 0,4 mg /ml respectivement. Concernant le pouvoir antimicrobien de cette huile (Tableau II.12), nous pouvons dire que l'HE extraite des parties aériennes d'*Ammoides vertecillata* a un double effet, en dépendant de type de la souche testée, son effet est bactériostatique (CBM/ CMI > 4) contre *Staphylococcus aureus*, et elle a un effet bactéricide (CBM/ CMI < 4) contre le reste des souches testées [48], le même résultat trouvé par Laouer et col [50].

b. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

La méthode de diffusion sur disque également nommé aromatoگرامme, c'est un procédé qualitatif qui nous permettra de tester la sensibilité ou la résistance des microorganismes aux huiles essentielles. Le Tableau 19 présente les résultats de sensibilité des souches microbiennes (les diamètres d'inhibition) vis-à-vis les deux huiles testées par la méthode de disque. Les valeurs indiquées sont la moyenne de trois mesures.

Tableau II.12 : Zones d'inhibition des HEs des deux plantes étudiées.

	HE <i>Laurus nobilis</i>	HE <i>Ammoides vertecillata</i>
Microorganismes	Zone d'inhibition (mm)	
<i>Escherichia coli</i> Gram –	9.0± 0.04	13.3 ±0.01
<i>Proteus mirabilis</i> Gram –	7.4± 0.02	22.4 ± 0,05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram –	7.6± 0.00	13.1 ± 0,03
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram +	13.6± 0.05	25.5 ± 0,05
<i>Streptococcus Faecalis</i> Gram +	11.2± 0.01	24.7 ±0.01

Les valeurs sont représentées comme moyennes \pm SEM ;

Cette étude a montré que les deux huiles essentielles testées étaient efficaces contre toutes les souches bactériennes qui ont réagi différemment puisque ces microorganismes sont morphologiquement et physiologiquement différents et les résultats obtenus sont représentatifs des activités bactériennes. La sensibilité ainsi que la résistance des bactéries testées aux deux huiles essentielles sont représentées dans la Figure II.8.

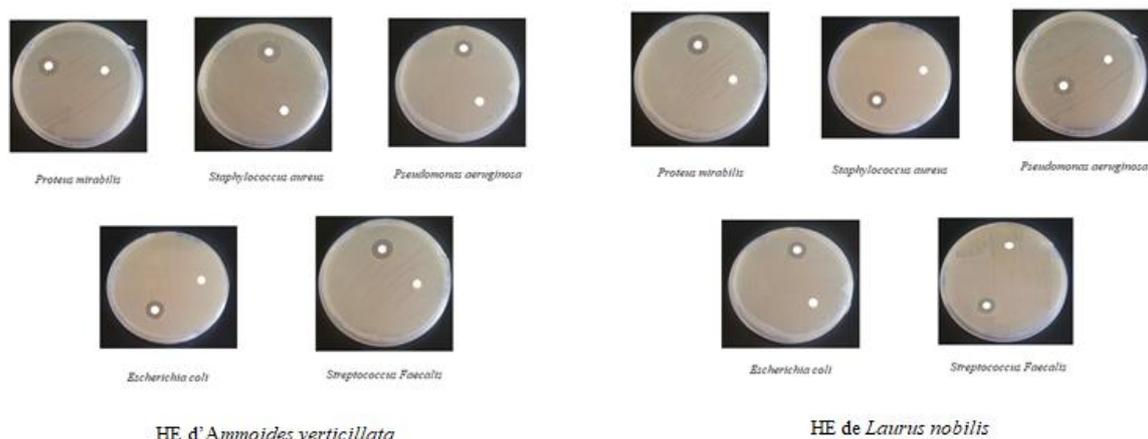


Figure II.8 : Zones d'inhibition des deux huiles essentielles testées.

Les différentes souches bactériennes ont réagi différemment à l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* testée ; *Staphylococcus aureus* était la souche testée la plus sensible avec la zone d'inhibition la plus forte de 13,6 mm, cette mesure a également été rapportée dans des études comme celles de Goudjil et col et Derwich et col [47,51]. *Streptococcus Faecalis* est révélé sensible aussi avec une zone d'inhibition de 11,2 mm et une activité modeste a été observée contre *Escherichia coli* avec des zones d'inhibition de 9 mm, cette valeur est très proche de celle trouvée par un test réalisé sur l'HE de laurier bulgare [33], *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient les souches les plus résistantes testées à l'huile de *Laurus nobilis* avec des zones d'inhibition les plus faibles, inférieures à 8 mm (7,6 et 7,4) mm, respectivement. Fidan et col ont également découvert dans ses travaux qu'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient résistantes à l'HE des feuilles de *Laurus nobilis* [33], et un autre travail fait par El et col qui ont étudié les effets antimicrobiens des feuilles de *L. nobilis* collectées à Izmir et ont rapporté que les HE était efficace sur toutes les bactéries testées (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimirium* et *Escherichia coli*) à l'exclusion de *Listeria monocytogenes* [51].

Selon les résultats, l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* sans réserve, présentait une activité antibactérienne notable contre toutes les espèces bactériennes testées. Comme le montre le Tableau II.12. Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition mesurés montrent de larges écarts allant de 13,1 à 25,5 mm selon les souches. On remarque également que cette huile été extrêmement sensible contre les bactéries à Gram (+) que les Gram (-) et elle a montré des effets inhibiteurs contre les agents pathogènes testés avec des diamètres variés. *S. aureus* (25 mm), *S. Faecalis* (24 mm), *P. mirabilis* (22 mm), *E. coli* et *P. aeruginosa* (13 mm) pour les deux souches bactériennes. Les différents tests de sensibilité d'*Ammoides verticillata* démontrent une activité antimicrobienne considérable vers des souches testées, Nos résultats sont en bon accord avec ceux rapportés par Toubal et col [53]. Si on compare les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches testées, on voit que l'huile essentielle des parties aériennes d'*Ammoides verticillata* est, moins active sur *E. coli* et *P. aeruginosa*, Laouer et col ont aussi trouvé que l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, riche en thymol (44,5%) avait une activité antimicrobienne significative contre tous les microbes utilisés à l'exception des *Pseudomonas aeruginosa* [50], ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Didry et col., *Pseudomonas aeruginosa* s'est révélé résistante à plusieurs agents antimicrobiens [54].

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis les deux huiles testées, nous constatons que l'efficacité de l'huile d'*Ammoides verticillata*, diffère d'une bactérie à une autre. *P. aeruginosa* est la plus résistante, *S. aureus* est la plus sensible à l'huile testée. *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient les souches les plus résistantes testées à l'huile de *Laurus nobilis* contrairement à *Staphylococcus aureus* qui était la souche testée la plus sensible. Les deux huiles ont montré leur efficacité contre toutes les souches bactériennes à Gram-positives testées, tandis que les souches à Gram-négatifs étaient plus résistantes, ces résultats sont en accord avec la littérature selon lesquelles les bactéries à Gram-positives sont généralement plus sensibles à l'action des huiles que celles à Gram-négatives. Cela est dû à la présence d'une membrane externe supplémentaire dans les bactéries à Gram négatif, qui pourrait mieux protéger la membrane cytoplasmique des composés antibactériens, tels que les HEs [55]. D'autre part la résistance de *P. aeruginosa* avec les deux huiles testées est en accord avec la littérature qui montre que cette espèce est généralement peu sensible aux huiles essentielles [56], ceci est en relation avec la

nature de sa membrane externe. Cette résistance a été rapportée par Chalchat et col [57] où l'espèce s'est montrée insensible aux 13 huiles essentielles testées. Cette bactérie est également résistante aux huiles essentielles de *Salvia tomentos* [58], d'*Achillea Millefolium* [59], d'*Ammoides pusilla* [50] et à bien d'autres huiles essentielles.

Chaque huile essentielle représente toujours un mélange complexe de différents composants chimiques qui peuvent avoir contribué au spectre étendu de l'activité antibactérienne. Les oxydes terpéniques étaient les groupes dominants de constituants chimiques dans l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis*, le principal constituant de l'HE de laurier dans cette étude et dans certaines études précédentes était le 1,8-cinéole, qui a montré une activité antibactérienne contre plusieurs micro-organismes, en raison de l'effet synergique ou antagoniste du 1,8-cinéole avec les terpènes oxygénés de l'huile [60]. Il est déjà prouvé que les activités antibactériennes, antifongiques et insecticides de certaines huiles essentielles sont dues à la présence de certains constituants tels que l'eugénol, β -pinène, 1,8 cineole, linalool and α -terpineol [50]. 1,8- Cinéole, est connu par sa forte action antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* [36]. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* est attribuée à sa teneur en composants dérivés du phénylpropanes tels que l'acetate de α -terpynil (21.6%) [61].

En effet, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Ammoides vertecillata* pourrait être attribuée à la présence du thymol appartenant au groupe des phénols connus par son activité antimicrobienne très significative [62], des travaux ont été rapportés que les huiles riches en composés phénoliques possèdent un effet antimicrobien très important [63]. Laouer et col ont aussi trouvé une importante activité antimicrobienne de l'huile d'*Ammoides vertecillata* contre plusieurs organismes, et ont expliqué leurs résultats par la haute teneur de l'huile en thymol et l'effet synergique de ce composé avec d'autres constituants tel que le carvacrol, p-cymène, α -terpinéol, α -pinène, limonène, linalol, β -pinène et myrcène [50]. La présence de carvacrol et de p-cymène dans l'HE d'*A. verticillata* explique aussi bien sa forte activité antimicrobienne due à l'effet synergique remarquable résultant entre ces deux molécules [64]. Les composés chimiques les plus efficaces et qui possèdent un large spectre d'action antimicrobienne sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol),

les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, menthol, géraniol, linalol), les aldéhydes (géraniol, citral et néral), les cétones (carvone, pulégone et camphre) [62], thymol, carvacrol, α -terpinen-7-ol, terpinen-4-ol sont parmi les constituants majeurs de l'huile d'*Ammoides verticillata* à des pourcentages de 58.5%, 0.7%, 7.2% et 0.6% respectivement. Plusieurs rapports ont montré que le carvacrol et le thymol exercés un effet antibactérien important, ces deux molécules semblent capables de libérer les lipopolysaccharides et d'augmenter la perméabilité membranaire en désintégrant la membrane externe des bactéries [65]. Carvacrol et thymol ont montré une activité antimicrobienne significative contre toutes les bactéries à l'exception de *Pseudothionas aeruginosa* [66]. L'activité biologique des huiles essentielles a une relation avec les groupes fonctionnels des composants, leurs proportions et l'interaction entre eux [62], elle n'est pas due seulement à l'activité d'un seul composant mais aussi à la synergie entre les autres constituants [61]. La relation activité antimicrobienne et synergie totale et partielle entre le carvacrol et le thymol, contre plusieurs bactéries, ont déjà été examinée [54]. Les effets antagonistes et synergiques entre les constituants de l'huile et leur activité antimicrobienne ont également été étudiés [66].

En comparant les diamètres des zones d'inhibition des deux huiles essentielles pour souche bactérienne, ils se sont avérés être les agents pathogènes sont plus inhibés par l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*, ces résultats démontrent que l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a une activité antimicrobienne beaucoup plus importante que celle de l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis*.

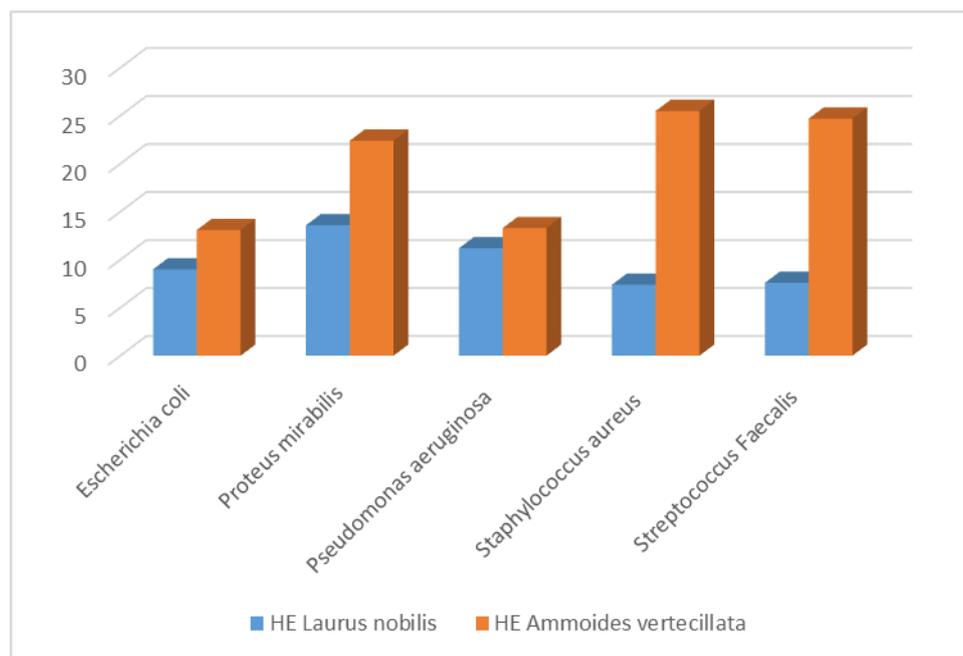


Figure II.9 : Histogramme des zones d'inhibition des deux huiles essentielles étudiées.

Des résultats très spéciaux ont été obtenus avec l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* qui est actif sur toutes les souches et a montré une activité maximale de 25 mm. *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* semblent être les bactéries les plus résistantes, *proteus mirabilis* a une résistance moyenne et l'huile d'*Ammoides verticillata* était très actif contre *S.aureus* et *S.Faecalis*.

D'autre part, la comparaison du pouvoir antimicrobien des deux huiles essentielles testées nous a permis d'avancer que le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* est le plus important. Ceci est dû probablement à sa richesse en thymol qui est doté d'une activité antimicrobienne considérable.

De nombreux travaux rapportés que l'activité biologique d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires, plus particulièrement la nature de leurs groupements fonctionnels et les possibles effets synergiques entre les constituants [67], cette activité est encore attribuable à une ou plusieurs molécules actives présentes même en faible proportion dans les huiles essentielles qui peuvent agir de manière synergique [68].

La plupart des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont dues à la présence de terpénoïdes oxygénés, en particulier de terpènes phénoliques, de phénylpropanoïdes et d'alcools. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du

caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées [68].

Une liste, visant à classer les constituants des huiles essentielles en fonction de l'intensité de leur activité, a été établie [69]. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol (constituants de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*) et l'eugénol (Figure II.10 : a, b et c), sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, démontrent les plus hautes activités antibactériennes.

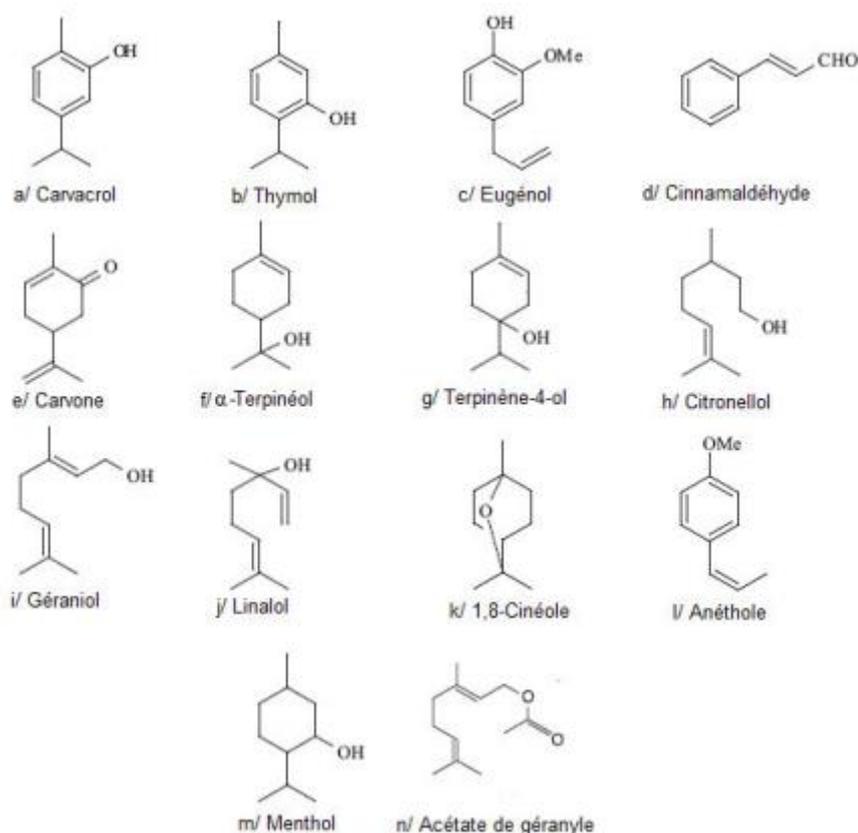


Figure II.10 : Terpénoïdes susceptibles de présenter des activités antibactériennes [69].

Les composés carbonylés, appartenant aux familles chimiques des aldéhydes et des cétones sont également décrits comme très actifs. Le cinnamaldéhyde et la caravone (Figure II.10 : d, e). De nombreux alcools comme α -terpinéol et terpinène-4-ol (Figure II.10 : f, g), le citronellol et le géraniol (Figure II.10 : h et i), sont actifs. Ou encore linalol (Figure II.10 : j), parmi les composants de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*. Les alcools sont légèrement moins actifs que les composés phénoliques et

carbonylés, leur activité antibactérienne est toute fois plus élevée que celle générée par les éthers, comme le 1,8 cinéole (le composé majoritaire de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*) ou l'anéthole (Figure II.10 : k et l), et les molécules hydrocarbonées. La structure chimique des constituants des huiles essentielles influence directement leur activité. D'autres groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyle (Figure II.10 : n) est plus actif que le géraniol. Ainsi, le limonène, qui est substitué par un groupement isopropylène en position 4, présente une plus haute activité que son homologue le cymène, substitué par un groupement isopropyle [62]. Les interactions entre les constituants des huiles essentielles peuvent également affecter leur activité, par exemple, l'efficacité de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* est due à la synergie entre ces deux constituants : le carvacrol et le thymol [70]. Une autre interaction synergique a été mise en évidence dans l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* entre le carvacrol, et le cymène, ce dernier semblerait faciliter la pénétration intracellulaire du carvacrol en potentialisant ainsi son action [64].

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles dépend également du type des microorganismes ciblés, elle est variable d'une souche bactérienne à une autre. Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques [67]. Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+). Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP [71].

En conclusion, cette étude in vitro de l'activité antimicrobienne des deux huiles a fourni la preuve qu'*Ammoides verticillata* est une source potentiellement riche des agents antimicrobiens contre de nombreux micro-organismes et a suggéré l'utilisation de cette huile comme antibiotique ou alternative. Cependant, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les valeurs pratiques des denrées alimentaires application conservatrice et thérapeutique.

5. Evaluation de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante dépend de la mobilité des atomes d'hydrogène du groupe hydroxyle des composés phénoliques. En présence d'un radical libre DPPH, l'atome H est transféré sur ce dernier ainsi transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également de l'absorbance pendant le temps de réaction à l'appauvrissement du donneur d'hydrogène donc de sa capacité antioxydante. Le DPPH a une couleur violette mais lorsqu'il est piégé par des substances antioxydants, sa couleur vire au jaune pâle. Le virage vers cette coloration et son intensité dépendent de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance anti-radicalaire.

L'activité antioxydante des extraits des deux plantes étudiées et les deux antioxydants standards (acide ascorbique et catéchine) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH[•]) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires. Le pourcentage d'inhibition (I %) pour chaque résultat a été calculé et les essais ont été réalisés en triplicata.

Les pourcentages d'inhibition des radicaux libres ainsi que les valeurs CI50 (autrement appelée concentration inhibitrice à 50%) ont été déterminés et regroupés dans le Tableau II.13 pour les extraits testés de *Laurus nobilis* et d'*Ammoides verticillata*, le standard utilisé (acide ascorbique) et la catéchine (pour la partie des calculs quantique).

L'inhibition radicalaire de DPPH est généralement présentée par la valeur CI50, celle-ci est la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du

radical libre DPPH• présent dans le milieu réactionnel. Une faible valeur d'CI50 indique une activité antioxydante forte. Cette valeur a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons préparés. Les CI50 sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important [72].

Tableau II.13 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits de l'acide ascorbique et du catéchine

Extrait		CI50
<i>Laurus nobilis</i>	HE	Concentration (mg/ml) (%) d'inhibition
		0.2 0.25 0.35 0.45 0.55 0.65 21.5 28.6 46.43 64.16 82.37 97.3
	EtOH	Concentration (mg/ml) (%) d'inhibition
		0.1 0.15 0.2 0.25 0.3 0.4 45.80 57.6 62.8 73.6 81.12 95.7
<i>Ammoides verticillata</i>	HE	Concentration (mg/ml) (%) d'inhibition
		0.1 0.2 0.3 0.4 0.55 16.4 35.8 55.8 76.4 98.12
	EtOH	Concentration (mg/ml) (%) d'inhibition
		0.1 0.15 0.2 0.25 0.3 16.6 33.09 52.38 73.44 96.17
Acide Ascorbique	Concentration (mg/ml) (%) d'inhibition	0.1
		0.025 0.05 0.1 0.15 0.2 0.25 18.34 30.35 49.83 69.01 85.17 99.6
Catéchine	Concentration (mg/ml) (%) d'inhibition	0.27
		0.15 0.25 0.3 0.4 0.45 0.5 29.5 42.46 54 70.6 81.5 91.75

Les résultats des tests ont montré que le pourcentage d'inhibition des radicaux libres augmente avec l'augmentation de la concentration pour le produit témoin d'acide ascorbique (vitamine C) ainsi que les extraits testés. Il est à noter que l'efficacité antioxydante augmente avec la concentration. A la concentration de 0,25 mg/ml, l'extrait éthanoïque d'*Ammoides verticillata* a révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH à 73,44% tandis que celui de l'extrait éthanoïque de *Laurus nobilis* était de 73,6 % et celui de la vitamine C était de 99,6%.

La Figure II.11 éclairci l'efficacité des extraits et d'acide ascorbique à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

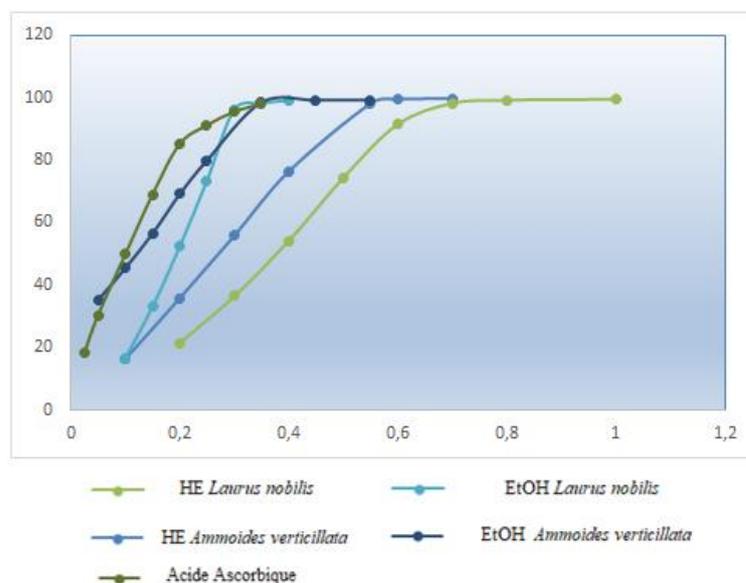


Figure II.11 : Courbes des taux d'inhibition en fonction des concentrations.

Les tests (Figure II.11) ont montré que l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* a la capacité de réduire le radical DPPH^{*} à 98.12% lorsqu'on l'utilise à une concentration de l'ordre de 0,55 mg/ml. En revanche, l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* nécessite d'être employée à des concentrations plus élevées 0,65 mg/ ml pour obtenir un pourcentage d'inhibition de 97,3% (Tableau II.13).

D'après les résultats, le pourcentage d'inhibition des radicaux libres des extraits testés est légèrement inférieur à celui d'acide ascorbique, il semble que la vitamine C (l'acide ascorbique) est l'antioxydant le plus efficace que les extraits étudiée avec une valeur de 0,1 mg/ml. Il a été rapporté par plusieurs auteurs que les antioxydants de synthèse possèdent plus d'aptitude à piéger le radical DPPH que les polyphénols naturels [73].

Sur la base du test DPPH, les valeurs de CI50 des extraits de *Laurus nobilis* : sont 0,37 et 0,12 mg/ml et celles d'*Ammoides verticillata* égaux à 0,27 et 0,19 mg/ml pour les deux extraits l'huile essentielle et l'extrait éthanoïque respectivement, les activités antiradicalaires étaient bonnes par rapport aux standard acide ascorbique (CI50: 0,1 mg/ml). Cela s'explique par leur forte teneur en polyphénol.

L'extrait éthanoïque d'*Ammoides verticillata* pourrait amener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune avec une CI50 à 0,19 mg/ml, il présente une activité antioxydante moins efficace que celle de l'acide ascorbique 0,1 mg/ml. Ce résultat est très proche d'CI50 trouvé par Merzougui (0,10 mg/ml) [74]. Cependant, certains auteurs ont détecté un effet antioxydant remarquable (CI50 = 0,03 mg/ml) dans des extraits organiques d'une autre espèce du même genre *Ammoides atlantica*. Cependant, ces résultats d'CI50 ont été réalisés avec d'autres méthodes d'activité antioxydante [75].

D'après les résultats obtenus, on peut constater que l'extrait éthanoïque de *Laurus nobilis* obtenu a montré une activité de piégeage des radicaux DPPH avec une CI50 égale à 0,12 mg/ml, ceci est en corrélation avec quantité de composés phénoliques présents dans cet extrait, qui pourrait être responsable de cette action, en raison d'un degré élevé d'hydroxylation, qui se manifeste par une forte capacité à donner des protons et stabilisent le radical DPPH [76]. Ceci est cohérent avec des résultats rapporté par Conforti et col, qui a étudié l'activité antioxydante des extraits éthanoïques des feuilles e *Laurus nobilis* et ont trouvé qu'ils ont été capables de réduire le radical libre DPPH stable en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle de couleur jaune avec une valeur CI50 de 0,113 et 0,143 mg / ml pour *L. nobilis* sauvage et cultivé, respectivement [77].

Les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* et de *Laurus nobilis*, ont présenté des bonnes activités antioxydantes. Ces résultats peuvent être expliqués par la richesse de ces fractions par la présence des phénols (thymol, carvacrol) et des composés oxygénés (1,8-cinéol). De plus, l'importance de l'activité antioxydante peut être liée à l'effet provoqué par l'interaction des constituants présents dans l'huile, que ceux en grandes proportions ou en quantités mineures.

De plus, en comparant les CI50 des extraits des deux espèces étudiés, l'extrait éthanoïque se dévoile avec plus de pouvoir antioxydant que l'huile essentielle, cette activité antioxydante est liée à la présence de composés phénoliques dans l'extrait et l'huile essentielle. Ils sont connus comme de puissants antioxydants et comme réducteurs de radicaux libres. De plus, les composés phénoliques sont des composants très importants dans les extraits et leur capacité de piégeage des radicaux libres est due à leurs groupes hydroxyle [78].

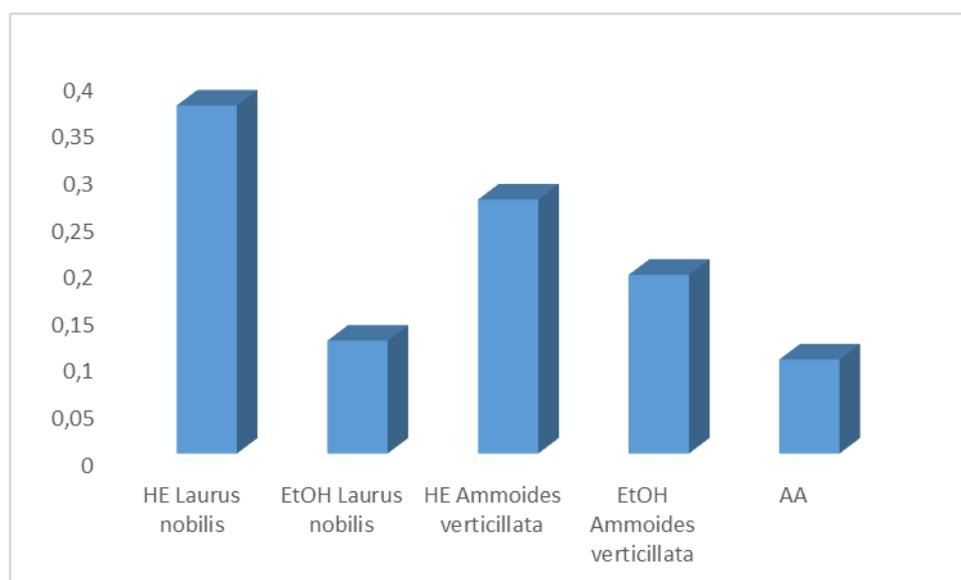


Figure II.12 : Histogramme des concentrations d'inhibition CI50.

D'après les résultats des CI50 (Figure II.12), nous remarquons que l'extrait éthanoïque active avec une CI50 de 0,12 mg/ml, suivi par l'extrait éthanoïque d'*Ammoides verticillata* avec une valeur de 0,19 mg/ml ensuite l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* avec une CI50 de l'ordre de 0,27 mg/ml et finalement l'huile essentielle de *Laurus nobilis* qui semble être la moins active avec une CI50 de 0,37 mg/ml, mais qui reste inférieur celui de l'acide ascorbique (CI50 = 0.1 mg/ml).

L'activité antiradicalaire se classe donc dans l'ordre décroissant suivant : Acide ascorbique > EtOH de *Laurus nobilis* > EtOH d'*Ammoides verticillata* > HE d'*Ammoides verticillata* > HE de *Laurus nobilis*.

D'après ces résultats, les propriétés antioxydantes des deux espèces proviennent de ses composés phénoliques et triterpénoïdes [79]. Puisque elles contiennent des quantités élevés de composés phytochimiques tels que les triterpènes, flavonoïdes, phénylpropanoïdes [80]. Il existe des huiles essentielles non phénoliques comme celle des feuilles de *Laurus nobilis* qui expriment un comportement antioxydant, ceci est dû à la chimie radicalaire de certains terpénoïdes et d'autres constituants volatils.

En conclusion, il y'a une relation entre la teneur totale en polyphénol et l'activité antioxydante. En effet, il est extrêmement important de souligner qu'il y a une corrélation positive entre le potentiel d'activité antioxydante et la quantité de composés phénoliques dans les extraits. En outre, comme indiqué dans les données de

la littérature, l'activité antioxydante de l'huile essentielle pourrait être attribuée à son teneur des composés phénoliques carvacrol et thymol [81]. Cependant, les composants responsables des activités antioxydantes des extraits n'ont pas été identifiées et les travaux ultérieurs doit être menée pour isoler et identifier ces composés bioactifs.

6. Evaluation de l'activité antioxydante par des calculs quantiques :

Dans les composés polyphénoliques, le comportement des différents groupes OH est largement influencé par les groupes voisins ainsi que par la géométrie. Par conséquent, la conformation peut être considérée comme le premier paramètre d'intérêt pour analyser la capacité antioxydante des composés phénoliques.

Afin de comprendre l'effet de l'activité antioxydante de l'extrait polyphénolique de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, nous nous sommes orientés vers les approches de chimie quantique en utilisant le logiciel Gaussian 09.

Notre travail comporte trois parties :

- Les structures des molécule étudiées, ont été entièrement optimisées au niveau B3LYP/6-31G (d,p) dans le vide, dans le but d'obtenir les géométries de départ pour nos calculs,
- Nous avons étudié les propriétés structurelles et modélisé et établi des calculs de la réactivité chimique d'un flavonol majoritaire dans l'extrait polyphénolique de la partie aérienne d'*Ammoides verticillata*, (+) –catéchine et son isomère (-) –épicatéchine.
- Expliquer théoriquement le pouvoir antioxydant de (+) –catéchine en étudiant les propriétés électroniques de (+)-catéchine et ses radicaux libres.
- Comparer le pouvoir antioxydant de (+) –catéchine et celui d'acide ascorbique (antioxydant de référence) en utilisant les résultats des calculs quantiques et ceux trouvés expérimentalement afin de mieux comprendre l'activité antioxydante de (+) –catéchine.

Toutes les conformations possibles des molécules étudiées ont été optimisées pour identifier les structures les plus stables (Energie minimale).

6.1. Etude théorique de (+) –catéchine et (-) –épicatéchine :

a. Propriétés structurales :

Les structures optimisées des deux flavonols sont illustrées dans la Figure II.13. Comme on peut le voir, les résultats de la conformation de la molécule neutre de (+) –catéchine montrent une structure non plane, dont l'angle de torsion entre les anneaux A et B [O (1) –C (8) –C (12) –C (15)] est de $-34,628^\circ$. Une liaison hydrogène intramoléculaire est observée dans le groupe catéchol du cycle B avec une distance de liaison de $3,616^\circ\text{A}$: O (6) –H (34). De même, la molécule neutre optimisée de (-) –épicatéchine montre une structure non planaire, mais son angle de torsion entre les anneaux A et B [O (1) –C (8) –C (12) –C (16)], dont la valeur est $-36,243^\circ$, est supérieur à celui de la molécule de (+) -catéchine. Par conséquent, (-) –épicatéchine a une structure plus tordue, avec une liaison hydrogène intramoléculaire dans le groupe catéchol présente une distance de liaison de $3,61 \text{ A}^\circ$ O (6) –H (34).

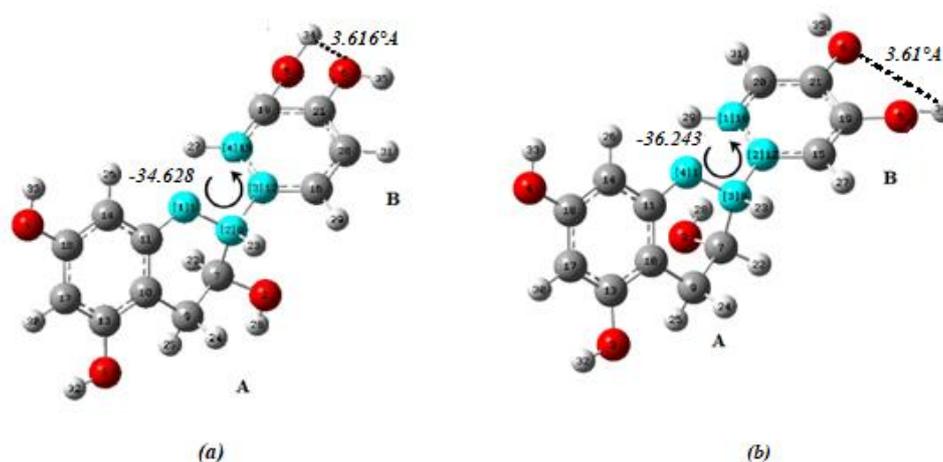


Figure II.13 : Structures moléculaires de (a) : (+) –catéchine et de (b) : (-) –épicatéchine

b. Propriétés du potentiel chimique :

Ces propriétés sont définies étroitement par différentes variables liés entre eux : affinité électronique (A), potentiel d'ionisation (IP), dureté (η), électronégativité (χ) et l'indice d'électrophilie (ω) et la nucléophilie empirique (N). Ces variables ont des significations différentes. Cependant, en tant que groupe, ils mesurent la tendance à donner ou à capturer électrons, c'est-à-dire qu'ils sont un indice du potentiel antioxydant [82] comme potentiel antioxydant ou activité antioxydante résulte de la capacité à donner des électrons [83].

Tableau II.14 : Descripteurs globaux de (+) –catéchine et de (-) – épicatechine neutres

Propriétés (eV)	(+)-catéchine	(-)- épicatechine
Affinité électronique <i>A</i>	0,0688413	0,1292475
Potentiel d'ionisation <i>IP</i>	5,7380448	5,7451194
Dureté η	5,6692035	5,6158719
Electronégativité χ	2,90344305	2,93718345
Electrophilicité ω	0,743489058	0,768095032

Les propriétés du potentiel chimique des deux molécules sont représentées dans le Tableau II.14, indiquant que les deux molécules (+) -catéchine et (-) – épicatechine ont des valeurs très proches, qui sont interprétées comme ayant un faible potentiel de réduction ou une bonne activité antioxydante [84]. Les molécules qui possèdent plus de torsion de l'anneau B par rapport à l'anneau A sont régulièrement plus faible ou inactif [85]. Cette idée est soutenue par Burton et col. [86], qui ont déclaré que l'angle dièdre est un facteur important de chevauchement des orbitales dans les cycles aromatiques. Une conformation défavorable du cycle hétérocyclique contribue pour une réactivité relativement faible. Dans ce contexte, on s'attendait à un potentiel antioxydant de (-) -épicatechine faible par rapport à celui de (+) -catéchine. Néanmoins, leur potentiel antioxydant résultait est notamment le même et les deux molécules étaient similaires à celui de la quercitrine calculée par Mendoza et col [87] considérée comme l'un des flavonoïdes qui ont une activité antioxydante importante.

c. Propriétés énergétiques :

Tableau II.15 : Propriétés énergétiques de catéchine et d'épicatechine neutres.

Propriétés énergétiques	(+)-catéchine	(-)- épicatechine
Energie totale (neutre) (u.a)	-1031.38880642	-1031.3901834
HOMO (e.v)	-5.7380448	-5.7451194
LUMO (e.v)	-0.0688413	-0.1292475
Gap ΔE (e.v)	5.6692035	5.6158719

Comme on peut le voir dans le Tableau II.15, les propriétés de l'énergie de (+) -catéchine et de (-) -épicatechine neutres sont les même. Ces résultats indiquent que la stéréochimie de groupe hydroxyle dans le cycle C des flavan-3-ols n'a aucun effet sur l'énergie totale. La valeur de l'écart énergétique pour (+) -catéchine et (-) - épicatechine est presque la même (5,6 eV) qui indique que les deux molécules ont la même réactivité, elles sont classées comme molécules peu réactives sur la base de cette

valeur, en la comparant avec celle trouvée dans une étude faite pour la quercitrine qui était de 3,38 eV, et ce flavonoïde a été considéré comme un système réactif [87]. Des études, ont été constatées qu'une grande différence d'énergie entre HOMO et LUMO, correspondant des molécules peu réactifs, alors que dans le cas contraire, les systèmes sont peu stables et très réactif [39].

6.2. Géométries d'équilibre et Stabilité moléculaire de (+) –catéchine :

La Figure II.14 montre les géométries de catéchine et de ses radicaux libres formés après l'abstraction des atomes H de différents groupes OH. Dans la catéchine neutre, une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome H de 5-OH et l'atome O de 6-OH est présente avec une longueur de 3,61629 Å.

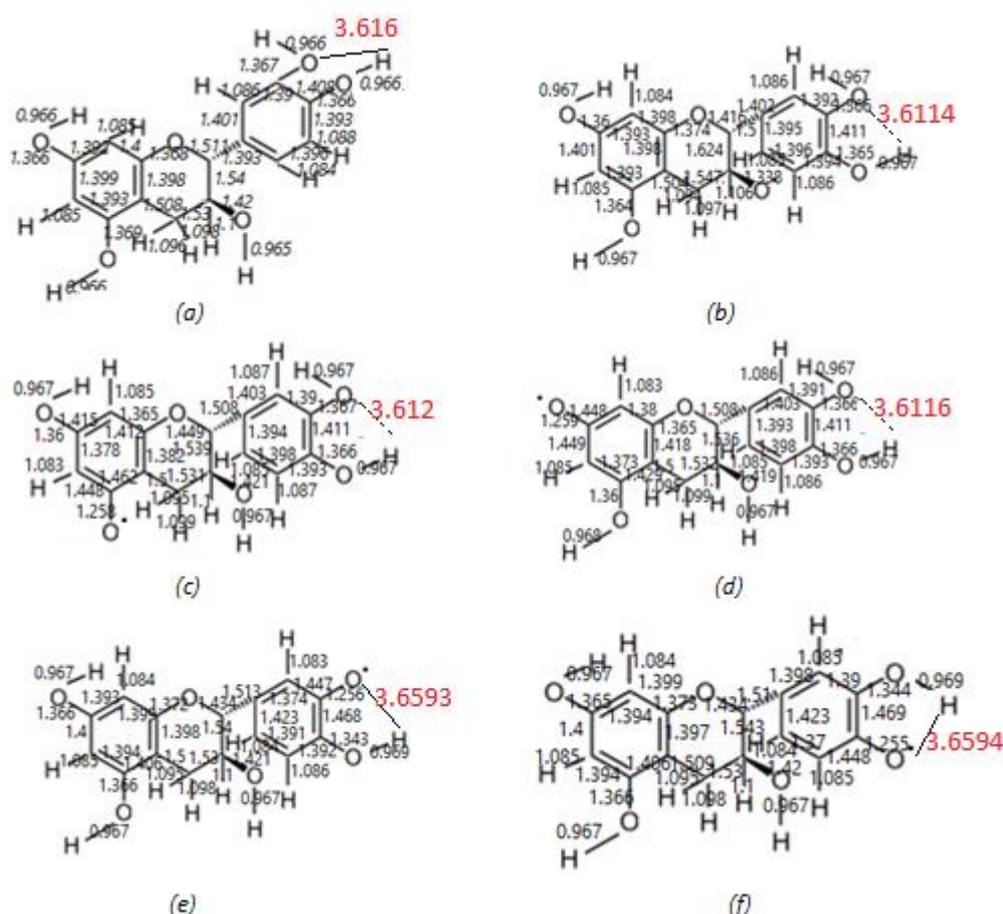


Figure II.14 : Structures de catéchine à l'état fondamental (a) et ses radicaux : 2-OH (b) et 3-OH (c) 4-OH (d) 5-OH (e) et 6-OH (f).

Une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome H de 5-OH et l'atome d'O de 6-OH est présente aussi dans la géométrie de chaque radical libre, la longueur

de l'hydrogène intramoléculaire est de 3,61142 Å dans le radical 2-OH, 3,61206 Å dans le radical 3-OH, et 3.61206 Å dans le radical 4-OH. Une liaison hydrogène intramoléculaire s'est formée entre l'Oxygène radicalaire et l'hydrogène lié à l'Oxygène voisin pour les deux derniers radicaux 5-OH et 6-OH avec des longueurs de 3,6593 et 3.6594 respectivement. Les liaisons hydrogènes intramoléculaires peuvent stabiliser la molécule neutre, résultant une difficile abstraction des atomes Hydrogènes. Les liaisons hydrogènes intramoléculaires présentent dans les radicaux libres formés après l'abstraction de l'atome d'Hydrogène, facilitent les réactions.

a. Énergies HOMO et LUMO de (+) –catéchine et ses radicaux libre :

Les énergies orbitales moléculaires frontières, ϵ_{HOMO} et ϵ_{LUMO} sont également des facteurs électroniques moléculaires et structuraux très importants. Plus le ϵ_{HOMO} est bas, plus la capacité de la molécule de donner un électron est faible, alors que le ϵ_{HOMO} plus élevé implique que la molécule est un bon donneur d'électrons. Le ϵ_{LUMO} représente la capacité d'une molécule à accepter d'électron.

D'après le Tableau II.16, les énergies ϵ_{HOMO} de (+)-catéchine et de ses radicaux sont de l'ordre de 2-OH <4-OH <3-OH <5-OH <6-OH <Neutre, cela indique que le radical 6-OH est le radical le plus élevé après la géométrie fondamentale de catéchine. Et celles des énergies ϵ_{LUMO} sont de l'ordre de 5-OH <6-OH <2-OH <4-OH <3-OH <Neutre.

Tableau II.16 : Energies des orbitales frontières de la catéchine et de ses radicaux, et les énergies de dissociation des liaisons des groupes OH

Composé	$\epsilon_{\text{HOMO}}/\text{Hartree}$	$\epsilon_{\text{LUMO}}/\text{Hartree}$	$E_{\text{total}}/\text{Hartree}$	BDE/Kcal mol ⁻¹
Neutre	- 0.19885977564	0.00867955374 1	-1031.31240331	---
2-OH	- 0.21312904199	-0.00639967096	-1030.66603227	378.239674
3-OH	- 0.21239907952	-0.00542972083	-1030.69506569	360.363811
4-OH	- 0.21265906615	-0.00587969769	-1030.69526451	360.363183
5-OH	- 0.21103914944	-0.01232936608	-1030.70176913	356.719863
6-OH	- 0.20934923633	-0.01008948125	-1030.70262392	356.258016

Les dispositions HOMO et LUMO de catéchine et de ses radicaux libres sont présentées sur la Figure II.15. Afin de comprendre la relation entre la délocalisation des électrons et la réactivité des radicaux, on peut examiner la distribution des électrons dans l'HOMO et le LUMO.

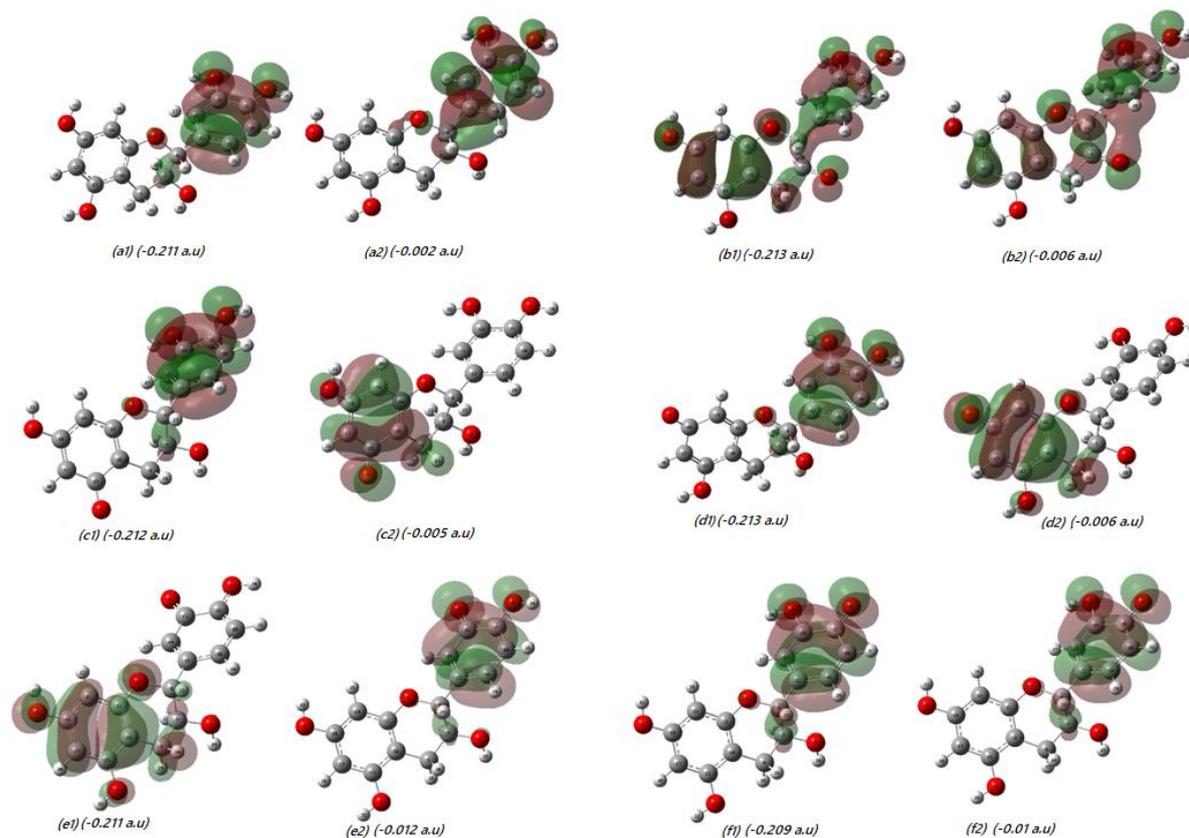


Figure II.15 : Répartition des charges HOMO : 1 et LUMO 2 de catéchine à l'état fondamental ($a_{1, 2}$) et ses radicaux : 2-OH ($b_{1, 2}$) et 3-OH ($c_{1, 2}$) 4-OH ($d_{1, 2}$) 5-OH ($e_{1, 2}$) et 6-OH ($f_{1, 2}$).

b. Énergie de dissociation des liaisons (BDE) de (+)-catéchine et ses radicaux libres :

Le BDE est également un paramètre très important pour étudier la capacité antioxydante, en particulier pour le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (HAT). Les valeurs de BDE pour différents radicaux libres de catéchine sont données dans le Tableau II.16.

L'évolution des valeurs de BDE montre clairement que le transfert H est plus énergétiquement favorable. D'après des études déjà faites, il peut être observé que les nombres de substituants hydroxyle pour chaque structure sont importants mais pas nécessairement essentiels, car la capacité antioxydante dépend largement de la valeur

BDE de chaque substituant. Cela signifie qu'un composé antioxydant efficace doit avoir des valeurs de BDE plus faibles.

Les valeurs de BDE pour les deux radicaux libres de la catéchine est dans l'ordre suivant : 6-OH < 5-OH < 4-OH < 3-OH < 2-OH. Ces valeurs indiquent que le radical 6-OH est plus stable.

Les valeurs de BDE sont comprises entre 356.258016 Kcal mol⁻¹ et 378.239674 Kcal mol⁻¹. Cette longue plage de valeurs BDE prouve la diversité présente dans la structure de la catéchine. Les valeurs BDE des groupes 6-OH et 5-OH sont très faibles par rapport aux groupes 3-OH et 2-OH. La raison des faibles valeurs de BDE correspondant aux ces deux radicaux libres par rapport à celles des autres radicaux est leur stabilité supplémentaire, ce qui indique que l'abstraction du l'atome d'hydrogène de ces deux groupes 6-OH et 5-OH est plus facile.

En se basant sur les valeurs de la BDE, on peut conclure que le pouvoir antioxydant augmente dans l'ordre suivant : 6-OH > 5-OH > 4-OH > 3-OH > 2-OH, indiquant que le radical libre 6-OH est prédit d'être un antioxydant plus puissant que les autres.

c. Propriétés électroniques de (+)-catéchine et ses radicaux libres :

Le moment dipolaire moléculaire représente une mesure généralisée des propriétés de liaison et des densités de charge dans une molécule. Il constitue essentiellement un indice de réactivité, ce qui est très important pour définir les propriétés biologiques liées notamment à l'interaction avec les sites actifs enzymatiques.

Les propriétés électroniques de catéchine et de ses radicaux libres sont présentées dans le Tableau II.17. D'après ces résultats les moments dipolaires de la géométrie fondamentale ainsi que les radicaux libres sont dans la gamme de 2.0247 à 8.4478 Debye. Le potentiel d'ionisation de catéchine et de ses radicaux libres est dans l'ordre suivant : Neutre < 6-OH < 5-OH < 3-OH < 4-OH < 2-OH.

Tableau II.17 : Propriétés électroniques de la catéchine et de ses radicaux

Composé	μ (Debye)	IP (kcal mol ⁻¹)	EA (kcal mol ⁻¹)
Neutre	2.0247	124.7864198649	-5.44650336589
2-OH	3.9703	133.740521605	4.01585504073
3-OH	3.7210	133.28246344	3.40720209643
4-OH	7.0430	133.44560715	3.68956698732
5-OH	6.4823	132.429093668	7.73679562593
6-OH	8.4478	131.368657024	6.33124626754

Comme la valeur du potentiel d'ionisation de catéchine à l'état fondamental est très faible cela indique que sa capacité antioxydante sous forme neutre est faible. Le potentiel d'ionisation du radical libre 6-OH est également faible en comparant avec les autres radicaux libres. Ceci est probablement dû à l'absence de liaison hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'Oxygène 6-O• et celui d'Hydrogène du groupe 5-OH. D'autre part 3-O•, 4-O• et 5-O• sont engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires dans les radicaux libres 3-OH, 4-OH et 5-OH, respectivement. Par conséquent, les électrons sur 3-O•, 4-O• et 5-O• ne peuvent pas donner facilement un électron, ils ont donc un potentiel d'ionisation relativement plus élevé. Le 2-OH a un potentiel d'ionisation très élevé qui peut s'expliquer par la résonance du 2-O• avec l'oxygène voisin. L'ordre d'affinité électronique de catéchine et de ses radicaux libres peut être donné comme suit ; Neutre <3-OH<4-OH<2-OH<6-OH<5-OH. L'affinité électronique de catéchine neutre est très faible (-5.446503365895374) par rapport à ses radicaux libres. L'affinité électronique de radical 5-OH est la plus élevée, ce qui indique que ce radical a une faible tendance à accepter les électrons mais une capacité de don d'électrons élevée.

d. Distributions de densité de spin :

La densité de spin est un paramètre important pour caractériser la stabilité des radicaux libres car l'énergie d'un radical peut être efficacement diminuée si l'électron non apparié est fortement délocalisé par un système de conjugaison [88]. Il est important d'analyser la densité de spin des radicaux afin de rationaliser les différences de réactivité des différents sites OH et par conséquent de trouver la différence des valeurs de BDE, parce que la densité de spin plus délocalisée dans le radical, entraîne la formation de radicaux plus facile et donc abaisse la valeur BDE

[89]. La densité de spin de l'atome d'Oxygène des radicaux libres formés après l'abstraction de l'atome d'Hydrogène dans chaque radical est illustrée à la Figure II.16.

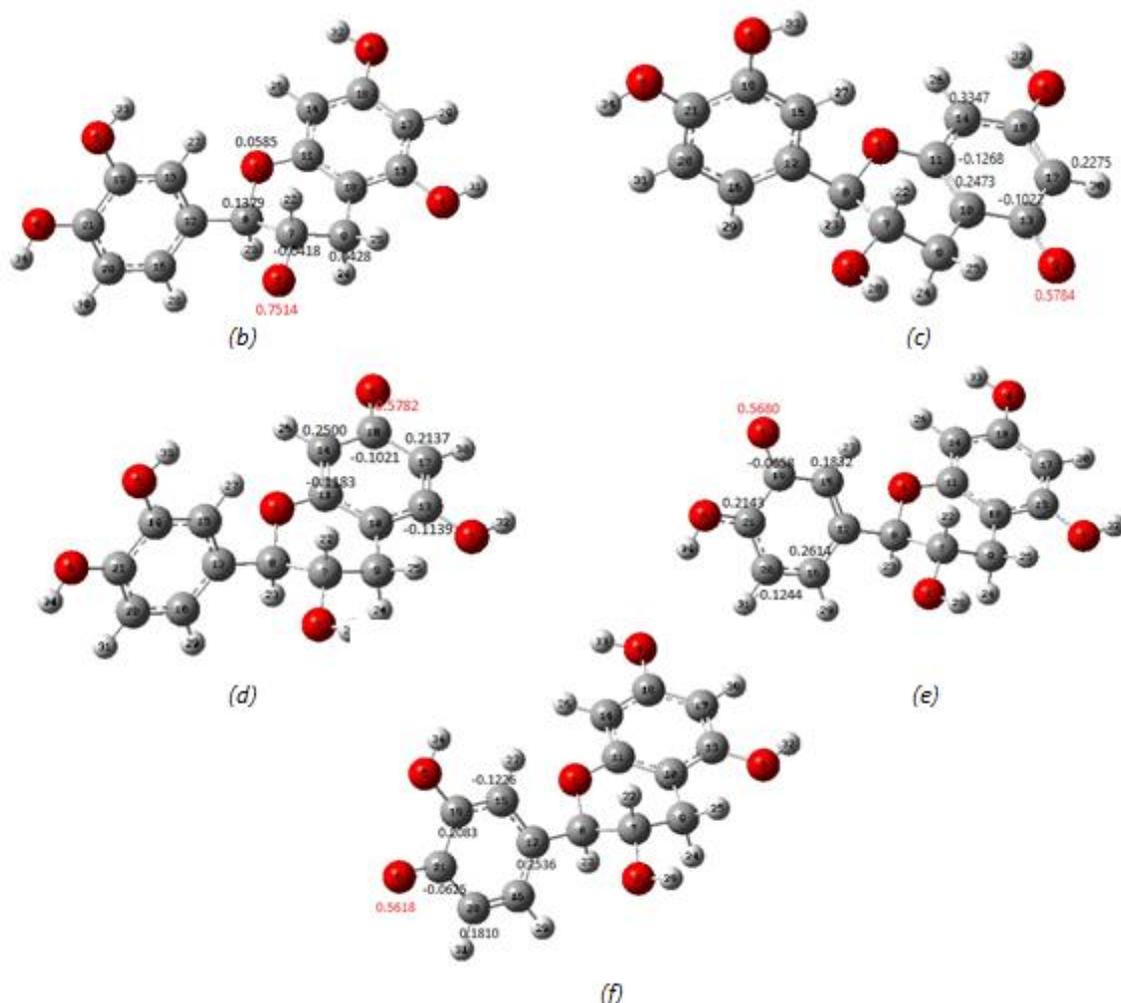


Figure II.16 : Les distributions des densités de spin des radicaux libre de la catéchine : 2-OH (b) et 3-OH (c) 4-OH (d) 5-OH (e) et 6-OH (f)

Les distributions des densités de spin sur les atomes d'une molécule constituent une représentation adéquate de la réactivité d'un système radicalaire. Les densités de spin calculées sur les atomes d'Oxygène des radicaux libres de catéchine formés après l'abstraction de l'atome d'Hydrogène montrent la tendance suivante : 6-OH < 5-OH < 4-OH < 3-OH < 2-OH.

Ces résultats montrent que la densité de spin sur l'atome d'oxygène du radical 6-OH est inférieure à celle des autres radicaux libres. Cela signifie que ce radical devrait être moins réactif dans les réactions radicalaires en comparant avec les autres systèmes. Par conséquent, le radical 6-OH est prédit d'être un antioxydant plus puissant que les autres systèmes radicalaires. Cette tendance indique une bonne

relation entre l'abstraction des atomes H et la délocalisation d'électrons non appariés. Par exemple, le radical 6-OH a une meilleure délocalisation d'électrons non appariés, de sorte que la valeur de la BDE de sa molécule parente est la plus faible. Il a des valeurs de la densité de spin et de BDE de 0,5618 et 356,258 respectivement. Ce radical libre 6-OH possède une liaison hydrogène intramoléculaire ; la longueur de cette liaison est petite égale à 3,6594, ce qui entraîne la stabilité de radical libre et diminue la valeur de la BDE

e. Mécanisme d'élimination des radicaux libres :

La capacité de don d'hydrogène et la capacité à former des radicaux peuvent être interprétées par l'enthalpie de dissociation des liaisons et le potentiel d'ionisation. On s'attend à ce que les molécules avec de faibles valeurs de BDE aient des propriétés antioxydantes.

En particulier, la faible valeur du BDE indique que l'antioxydant est capable de donner un atome d'hydrogène lors de mécanisme de piégeage des radicaux libres. Cependant, de faibles valeurs de propriétés électroniques ne garantissent pas le potentiel antioxydant élevé. Ce paramètre est favorable pour augmenter la réactivité de transfert d'électrons et permet d'évaluer la préférence thermodynamique de la première étape de la voie de réaction de piégeage des radicaux libres SET-PT. Par comparaison, nous observons que les valeurs IP sont nettement plus élevées que celles du BDE. Par conséquent, nous avons constaté que le mécanisme de transfert de l'atome H est plus préférable que le mécanisme de transfert d'un seul électron. Le potentiel antioxydant de catéchine est principalement dû aux groupes 6-OH et 5-OH, en raison de leurs valeurs de BDE extrêmement faibles.

f. Comparaison de pouvoir antioxydant de (+) –catéchine et celui d'acide ascorbique :

Les structures optimisées des deux molécules l'acide ascorbique à l'état fondamental et son radicale le plus stable sont illustrées dans la Figure II.17.

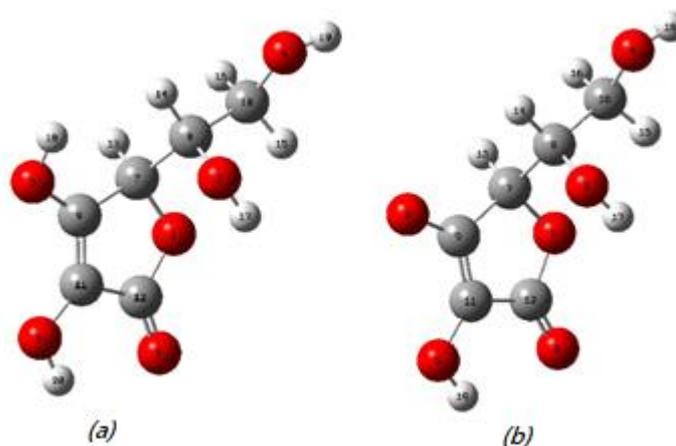


Figure II.17 : Structures moléculaires des radicaux stable de (a) : d'acide ascorbique neutre et (b) : le radical le plus stable d'acide ascorbique.

Les valeurs des énergies de dissociation (BDE) des radicaux libres les plus stables ainsi que les concentrations d'inhibition (CI50) de (+)-catéchine et d'acide ascorbique sont présentées dans le Tableau II.18.

Tableau II.18 : Energies de dissociation des radicaux libres les plus stables et les concentrations d'inhibition de (+)-catéchine et d'acide ascorbique.

Molécule	BDE Kcal/mol	CI50 (mg/ml)
(+)-catéchine	356.26	0.27
Acide ascorbique	75.2	0.1

Une petite valeur de BDE peut être expliquée par une meilleure stabilisation du radical correspondant. Cela signifie qu'un composé antioxydant efficace doit avoir des valeurs de BDE plus faibles.

Comme le montre le Tableau II.18, un grand écart entre les deux valeurs de BDE des deux molécules étudiées est observé, ce résultat explique la grande différence du pouvoir antioxydant entre elles. Les valeurs de BDE trouvées, calculées au même niveau de théorie étaient 75,2 et 356,26 Kcal/mol pour l'acide ascorbique et (+)-catéchine respectivement. Cela signifie que la capacité de don d'atome d'Hydrogène de l'acide ascorbique est très supérieure à celle du (+)-catéchine c'est-à-dire l'acide ascorbique a une activité de piégeage des radicaux DPPH plus élevée que celle de (+)-catéchine, cela concorde bien avec les résultats expérimentaux puisque la valeur de la concentration d'inhibition (CI50) obtenue pour l'acide ascorbique est de 0,1 mg/ml est très petite par rapport à celle de (+)-catéchine (0,27 mg/ml).

Dans ce travail, nous avons essayé d'expliquer l'efficacité de l'activité antioxydante de (+)-catéchine par rapport à son isomère (-) épicatechine et de ses radicaux libres au moyen de la théorie fonctionnelle de la densité (DFT). Les mécanismes HAT, SET-PT et SPLET dans le méthanol ont été considérés, de nombreux paramètres importants ont été calculés, tels que l'enthalpie de dissociation de la liaison (BDE), le potentiel d'ionisation (IP), l'affinité électronique (EA), les moments dipolaires (μ), les densités de spin, les énergies HOMO et LUMO des structures électroniques des espèces neutres et radicalaires afin de discuter le pouvoir antioxydant de (+)-catéchine.

Le potentiel antioxydant résultant de (+)-catéchine et celui de (-) épicatechine était trouvé le même donc les deux isomères sont considérés comme des flavonoïdes qui ont une activité antioxydante similaire et importante.

Le radical 6-OH est prédit d'être l'antioxydant le plus puissant que les autres systèmes radicalaires de (+) -catéchine, il a une plus grande capacité de don d'atomes H, mais elle reste toujours inférieure par rapport à celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence).

Les résultats démontrent que le mécanisme préféré thermodynamiquement est SET-PT parce que les BDE sont environ trois fois plus élevés que et les IP. Dans les milieux polaires tels que le méthanol, SPLET représente la voie de réaction la plus probable, parce que le solvant a un impact important sur la réaction enthalpies dans SET-PT et SPLET, car ces mécanismes impliquent des espèces chargées. Au contraire, les O-H BDE liés au mécanisme HAT sont proches dans tous les milieux, il faut continuer l'étude et calculer les affinités protoniques (PA), et les enthalpies de transfert d'électrons (ETE) pour pouvoir confirmer ça.

En conclusion, notre étude contribuera non seulement à l'élucidation du mécanisme chimique de l'action de piégeage des radicaux, mais aussi pour stimuler davantage l'exploitation des composés étudiés sur le terrain de la chimie alimentaire et de la pharmacie.

Références :

- [1] : AFNOR, E. (1986). Méthodes d'essai. *Recueil des normes françaises*, 64, 65.
- [2] : Ouafi, N., Moghrani, H., Benaouda, N., Yassaa, N., & Maachi, R. (2017). Evaluation qualitative et quantitative de la qualité des feuilles de Laurier noble Algérien séchées dans un séchoir solaire convectif. *Revue des Energies Renouvelables*, 20(1), 161-168.
- [3] : Haouel-Hamdi, S., Hamedou, M. B., Bachrouch, O., Boushah, E., Zarroug, Y., Sriti, J., ... & Jemâa, J. M. B. (2020). Susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Laurus nobilis* essential oil and assessment on semolina quality. *International Journal of Tropical Insect Science*, 1-9.
- [4] : Jemâa, J. M. B., Tersim, N., Toudert, K. T., & Khouja, M. L. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*, 48, 97-104.
- [5] : Amin, G., Sourmaghi, M. S., Jaafari, S., Hadjagae, R., & Yazdinezhad, A. (2007). Influence of Phenological Stages and Method of Distillation on Iranian Cultivated Bay Leaves Volatile Oil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(17), 2895-2899
- [6] : Al-Kalalkeh, J. Z., Abu-Dahab, R., & Afifi, F. U. (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, 30(4), 271-278.
- [7] : Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., & Soro, C. (2002). Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1492-1496.
- [8] : Sell, C., Baser, K. H. C., & BUCJBAUER, G. (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications.
- [9] : El Ouariachi E., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J. M., Costa J. & Paolini J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 533–536.
- [10] : Bnouham, M., Benalla, W., Asehraou, A., & Berrabah, M. (2012). Antibacterial activity of essential oil from *Ptychotis verticillata*. *Spatula DD*, 2(1), 69-73.
- [11] : Attou, A., Davenne, D., Benmansour, A., & Lazouni, H. A. (2017). Chemical composition and biological activities of *Ammoides verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytothérapie*, 1-7.
- [12] : Daira, N., Maazi, M. C., & Chefrour, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf-Briq-) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 276-290.
- [13] : ZIANI, B. E. C. (2017). Extraits de douze plantes médicinales poussant en Algérie: Etude phytochimique, activité biologique et essai d'incorporation des extraits de deux plantes dans une huile d'olive (Doctoral dissertation, ENSA).

- [14] : SEDDIK, M. (2010). Analyse physico-chimique, chromatographique et spectroscopique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région d'Adrar : Etude de son activité biologique et anti-oxydante (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- [15] : Bekhechi, C., Boti, J. B., Bekkara, F. A., Abdelouahid, D. E., Casanova, J., & Tomi, F. (2010). Isothymol in Ajowan essential oil. *Natural product communications*, 5(7), 1934578X1000500726.
- [16] : Briot, C. (2016). Le laurier noble, plante des héros : aspects historiques, botaniques et thérapeutiques (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- [17] : Sarker, D. S., & Nahar, L. (2009). *Natural products isolation : Methods and protocols*. (J. M. Walker, Ed.), Life Sciences (Third Edit, Vol. 531).
- [18] : Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Extraction and isolation of phenolic compound. *Natural products isolation*, 427-464.
- [19] : Azimova, S. S., & Vinogradova, V. I. (Eds.). (2013). *Natural compounds : flavonoids*. Springer New York.
- [20] : Afnor. (2000). *Huiles essentielles. Echantillonnage et Méthodes d'Analyse (Tome 1) – Monographies Relatives aux Huiles Essentielles (Tome 2)*.
- [21] : GOUDJIL, M. B., & Ladjel, S. (2016). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques (Doctoral dissertation).
- [22] : Guedouari, R. (2012). Etude comparative de la pharmacognosie des différentes parties du *Laurus nobilis* L. : essais de formulations thérapeutiques (Doctoral dissertation, Université de Boumerdès-M'hamed Bougara).
- [23] : Faucon, M. (2012). *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale*. Éditions Sang de la Terre et Médial, Paris.
- [24] : Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [25] : Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [26] : CHOUITAH, O. (2012). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- [27] : Tchiegang-Megueni, C. (2003). Variabilité des caractéristiques physico-chimiques des huiles de extraites des amandes *Balanites aegyptiaca* l. del en provenance du Cameroun et du Tchad. *Procédé Biologiques alimentaires*, 0001. *Revue*, (1).

- [28] : Lion, P. H. (1969). Travaux pratiques de chimie organique.
- [29] : Novidzro, K. M., Wokpor, K., Fagla, B. A., Koudouvo, K., Dotse, K., Osseyi, E., & Koumaglo, K. H. (2019). Etude de quelques paramètres physicochimiques et analyse des éléments minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile de graines de *Griffonia simplicifolia*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(4), 2360-2373.
- [30] : Bouzouita, N., Nafti, A., Chaabouni, M. M., Lognay, G. C., Marlier, M., Zghoulli, S., & Thonart, P. (2001). Chemical composition of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of essential oil research*, 13(2), 116-117.
- [31] : Kilic, A., Hafizoglu, H., Kollmannsberger, H., & Nitz, S. (2004). Volatile constituents and key odorants in leaves, buds, flowers, and fruits of *Laurus nobilis* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(6), 1601-1606.
- [32] : Nabiha, B., Abdelfateh, E. O., Faten, K., Paul, W. J., Michel, M., & Moncef, C. M. (2009). Chemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* floral buds essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(6), 694-702.
- [33] : Fidan, H., Stefanova, G., Kostova, I., Stankov, S., Damyanova, S., Stoyanova, A., & Zheljazkov, V. D. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Laurus nobilis* L. essential oils from Bulgaria. *Molecules*, 24(4), 804.
- [34] : KIVRAK, Ş. Göktürk, T., & KIVRAK, İ. (2017). Assessment of volatile oil composition, phenolics and antioxidant activity of Bay (*Laurus nobilis*) leaf and usage in cosmetic applications. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(2), 148-161.
- [35] : Moghtader, M., & Salari, H. (2012). Comparative survey on the essential oil composition from the leaves and flowers of *Laurus nobilis* L. from Kerman province. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 4(6), 150-153.
- [36] : Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N. R., ... & Marques, A. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*, 26(6), 518-529.
- [37] : Maz, M., Mirdeilami, S. Z., & Pessaraki, M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in North east of Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(16), 1063-1069.
- [38] : Goudjil, M. B., Ladjel, S., Bencheikh, S. E., Zighmi, S., & Hamada, D. (2015). Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. *J. chem. Pharm. res*, 7(1), 379-385.
- [39] : Keddad, A., Baaliouamer, A., & Hazzit, M. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Umbels of Algerian *Ammi visnaga* (L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(5), 1243-1250.

- [40] : Bendahou, M. (2007). Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatique et médicinales de l'Ouest Algérien (Doctoral dissertation, Tlemcen, Université Abou Bekr Belkaïd. Faculté des Science).
- [41] : Senouci, H., Benyelles, N. G., Dib, M. E., Costa, J., & Muselli, A. (2020). *Ammoides verticillata* Essential Oil as Biocontrol Agent of Selected Fungi and Pest of Olive Tree. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(2), 182-188.
- [42] : Tefiani, C. (2015). Les propriétés biologiques des huiles essentielles de *Curcuma longa*, *Ammoides verticillata* et *Thymus ciliatus* sp. eu-ciliatus (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en sciences de l'université de Mostaganem).
- [43] : SATRANI, B., FARAH, A., & TALBI, M. (2004). Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite du bois de *Tetraclinis articulata* du Maroc. In *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique* (Vol. 97, No. 964, pp. 75-84).
- [44] : Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
- [45] : Ziani, B. E., Barros, L., Boumehira, A. Z., Bachari, K., Heleno, S. A., Alves, M. J., & Ferreira, I. C. (2018). Profiling polyphenol composition by HPLC-DAD-ESI/MSn and the antibacterial activity of infusion preparations obtained from four medicinal plants. *Food & function*, 9(1), 149-159.
- [46] : Saleem, F., Sarkar, D., Ankolekar, C., & Shetty, K. (2017). Phenolic bioactives and associated antioxidant and anti-hyperglycemic functions of select species of Apiaceae family targeting for type 2 diabetes relevant nutraceuticals. *Industrial Crops and Products*, 107, 518-525.
- [47] : Goudjil, M. B., Ladjel, S., Bencheikh, S. E., Zighmi, S., & Hamada, D. (2015). Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. *J. chem. Pharm. res*, 7(1), 379-385.
- [48] : Bonou, J., Baba-Moussa, F., Adéoti, Z., Ahouandjinou, H., Dougnon, V., Dossa, D., ... & Baba-Moussa, L. (2016). Antimicrobial activity of essential oils of *Lippia multiflora*, *Eugenia caryophyllata*, *Mentha piperita* and *Zingiber officinale* on five oral-dental microorganisms. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(5), 271.
- [49] : Rao, B. K., Kumar, P., Rao, S., & Gurung, B. (2011). Bactericidal effect of ultraviolet C (UVC), direct and filtered through transparent plastic, on gram-positive cocci: an in vitro study. *Ostomy-Wound Management*, 57(7), 46.
- [50] : Laouer, H., Zerroug, M. M., Sahli, F., Chaker, A. N., Valentini, G., Ferretti, G., ... & Anaya, J. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. Essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2), 135-138.
- [51] : Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3818-3824.

- [52] : El, S. N., Karagozlu, N., Karakaya, S., & Sahin, S. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from *Laurus nobilis* L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
- [53] : Toubal, O., Djahoudi, A., Henchiri, C., & Bouazza, M. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial evaluation of the aqueous extracts of *Ammoides verticillata*, an Endemic Species. *Journal of Life Sciences*, 6(3), 243-247.
- [54] : Didry, N. P., Dubreuil, L., & Pinkas, M. (1993). Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Die Pharmazie*, 48(4), 301-304.
- [55] : Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- [56] : Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.
- [57] : Chalchat, J. C., Garry, R. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of essential oil research*, 9(1), 67-75.
- [58] : Haznedaroglu, M. Z., Karabay, N. U., & Zeybek, U. (2001). Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*, 72(7), 829-831.
- [59] : Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.(Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 215-220.
- [60] : Pejin, B., Savic, A., Sokovic, M., Glamoclija, J., Ciric, A., Nikolic, M., ... & Mojovic, M. (2014). Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. *Natural product research*, 28(6), 372-376.
- [61] : Radulović, N., Stankov-Jovanović, V., Stojanović, G., Šmelcerović, A., Spitteller, M., & Asakawa, Y. (2007). Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food chemistry*, 103(1), 15-21.
- [62] : Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- [63] : Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. L., & Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 39(3), 167-170.
- [64] : Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., & Smid, E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of food protection*, 63(5), 620-624.
- [65] : D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, A. Wattanasatcha, S. Rengpipat, S. Wanichwecharu, Thymol nanospheres as an effective antibacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*.2012, 434, 360-365.

- [66] : Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1202-1205.
- [67] : Oussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessenn, K. N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanova, J. (2008). Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24(1), 94-103.
- [68] : Toure, D. (2015). études chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire (Doctoral dissertation, Université Felix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire).
- [69] : Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- [70] : Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- [71] : El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., & Alaoui, T. I. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82, 7481-7492.
- [72] : Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.
- [73] : Nanasombat, S., & Wuttigol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 45-53.
- [74] : Merzougui, I., & Tadj, H. (2012). Etude de l'effet antibactérien et antioxydant d'*Ammoides verticillata* De la région de Tlemcen (Doctoral dissertation).
- [75] : Benteldjoune, M., Boudiar, T., Bakhouch, A., del Mar Contreras, M., Lozano-Sánchez, J., Bensouici, C., ... & Segura-Carretero, A. (2019). Antioxidant activity and characterization of flavonoids and phenolic acids of *Ammoides atlantica* by RP-UHPLC-ESI-QTOF-MSn. *Natural product research*, 1-5.
- [76] : Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- [77] : Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D., & Menichini, F. (2006). Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) coutinho seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(10), 2056-2064.
- [78] : Valnet, J. (1984). *Aromatherapy: treatment of disease by the essences of plants*. Maloine Ed. SA, (10).

- [79] : Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2576-2581.
- [80] : Daira, N., Maazi, M. C., & Chefrou, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf-Briq-) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 276-290.
- [81] : Bellakhdar, J. (1997). *Pharmacopée marocaine traditionnelle*. Ibis press.
- [82] : Parr, R. G., Szentpály, L. V., & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1922-1924.
- [83] : Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- [84] : Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T., & Toyoda, M. (1999). Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362(1), 79-86.
- [85] : F.T. Hatch, F.C. Lightstone, M.E. Colvin, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 279–299.
- [86] : Burton, G. W., Doba, T., Gabe, E., Hughes, L., Lee, F. L., Prasad, L., & Ingold, K. U. (1985). Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *Journal of the American Chemical Society*, 107(24), 7053-7065.
- [87] : Mendoza-Wilson, A. M., & Glossman-Mitnik, D. (2005). CHIH-DFT study of the electronic properties and chemical reactivity of quercetin. *Journal of Molecular Structure : THEOCHEM*, 716(1-3), 67-72.
- [88] : Chen, W., Guo, P., Song, J., Cao, W., & Bian, J. (2006). The ortho hydroxy-amino group : another choice for synthesizing novel antioxidants. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(13), 3582-3585.
- [89] : Parkinson, C. J., Mayer, P. M., & Radom, L. (1999). An assessment of theoretical procedures for the calculation of reliable radical stabilization energies. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (11), 2305-2313.

Conclusion Générale

Dans le but de rechercher de nouveaux agents naturels antibactériens et antioxydants aux intérêts thérapeutiques, les huiles essentielles ainsi que les extraits polyphénoliques de deux plantes médicinales de la flore Algérienne, *Laurus nobilis* et *Ammoides verticillata* ont fait l'objet d'une étude phytochimique. Différentes techniques sont appliquées à ces plantes : extraction des huiles essentielles, analyse de l'essence par la CPG, analyse de l'extrait polyphénolique par la CPLH, détermination de leur pouvoir antibactérien in vitro sur des souches pathogènes et multirésistantes ainsi que l'évaluation du pouvoir antioxydant in vitro et à l'aide des calculs quantiques.

L'extraction par macération (Extraits Ethanoïques) a fourni des rendements élevés pour les parties aériennes d'*Ammoides verticillata* (16,35%) en comparant par ceux trouvés lors de l'extraction des polyphénols des feuilles de *Laurus nobilis* (15,62%). L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation a montré une rentabilité en huile essentielle chez la partie aérienne sèche d'*Ammoides verticillata* (2,43%), alors qu'il s'affaiblit en passant aux feuilles sèches de *Laurus nobilis* (1,87%). Il a été démontré que les rendements étaient influencés par divers facteurs, tels que la nature de l'espèce, l'environnement de croissance, la période de récolte, les parties de la plante, la méthode d'extraction, etc... D'après les résultats d'extraction, on constate que les rendements d'extraction diffèrent significativement en fonction de la plante donc de la famille botanique et aussi en fonction des solvants et technique d'extraction utilisés qui permet d'obtenir des quantités variables de composants extractibles à partir de chaque plante.

Les propriétés organoleptiques (Aspect, couleur, odeur) ainsi que des analyses physico-chimiques des deux essences testées ont été déterminées, les résultats montrent que ces deux huiles présentent des propriétés physicochimiques intéressantes dans l'ensemble. L'analyse globale de ces différentes propriétés permet de dire que ces deux huiles pourraient être valorisées dans l'agroalimentaire et/ou dans la phytomédecine.

D'un point de vu composition chimique, on remarque que l'HE d'*Ammoides verticillata* est riches en phénols (Thymol) et les alcools mono- terpéniques caractérisent l'HE de *Laurus nobilis* comme le 1,8-Cinéole (30,1%) et α -terpynil

Conclusion Générale

acetate (21,6%), et l'analyse CPLH de l'extrait polyphénolique d'*Ammoides verticillata* a confirmé sa richesse en composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénolique).

L'évaluation qualitative de l'effet antibactérien montre que la plupart des souches bactériennes testées sont résistantes aux antibiotiques et que les deux huiles essentielles étudiées sont actives sur ces souches. Des zones d'inhibition de diamètres variables sont observées pour ces différentes souches testées. L'huile d'*A. verticillata* riche en thymol inhibe la croissance de plusieurs bactéries *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*. En comparant la susceptibilité des pathogènes étudiées, les bactéries Gram-positives étaient plus sensibles à l'action des huiles que bactéries à Gram négatif, ce qui concorde avec beaucoup d'études réalisées dans cette optique, cette résistance peut être due à la lipopolysaccharide hydrophobe dans la membrane offrant une protection contre différents agents. Par conséquent, cette huile essentielle pourrait être utilisée comme conservateur alimentaire efficace pour prévenir les maladies d'origine alimentaire dues à ces bactéries.

L'activité antibactérienne d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) ou ceux susceptibles d'être actifs. Mais, il est probable que cette activité dépende aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique. Il existe plusieurs méthodes pour tester l'activité antibactérienne des plantes et de leurs constituants, qui peuvent influencer de manière significative les niveaux d'inhibition observés. De plus, divers autres facteurs, tels que la saisonnalité, la partie du matériel végétal et la composition de l'extrait testé au sein d'une espèce végétale, peuvent entraîner des différences dans les résultats de l'activité antibactérienne.

Les résultats des tests in vitro de l'effet antioxydant montrent que le pouvoir anti radicalaire est proportionnel à la concentration de l'extrait testé. Les extraits des deux espèces ont été trouvés comme des antioxydants efficaces puisque les valeurs des CI50 trouvées étaient légèrement inférieures à celle d'acide ascorbique, l'extrait polyphénolique des feuilles sèches de *Laurus nobilis* présentait la plus forte capacité antioxydant in vitro (CI50 = 0,12 mg/ml) et peut être considérée comme une bonne

Conclusion Générale

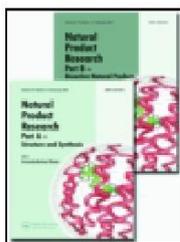
source d'antioxydants et proposés comme additifs naturels pour les aliments et utilisés en industries pharmaceutiques. L'activité antioxydant des extraits est corrélée à la concentration des polyphénols. Le niveau élevé de la teneur en acides polyphénoliques et en flavonoïdes dans les extraits influencent le haut antioxydant activité.

Les résultats des calculs quantiques obtenus dans ce travail montrent clairement la fiabilité des méthodes DFT pour l'étude des propriétés structurales et l'activité antioxydante des composés phénoliques et polyphénoliques. De plus, nous avons pu conclure dans cette partie d'étude que le potentiel antioxydant de catéchine est principalement dû aux groupes 6-OH et 5-OH, en raison de leurs valeurs de BDE extrêmement faibles. D'un autre coté, la comparaison du pouvoir antioxydant de la catéchine avec celui de l'acide ascorbique confirme cette conclusion, puisque l'acide ascorbique a été trouvé expérimentalement le plus puissant (CI50 = 0.1 mg/ml) avec une faible valeur calculée de BDE : 75.2 kcal / mol.

Comme perspectives possibles à ce travail, nous envisageons :

- Etudier l'activité antioxydante pour des structures possédant des données cristallographiques RX.
- Etudier les aspects cinétiques et thermodynamique de l'activité antioxydante pour le piégeage des radicaux libres ROS et RNS.
- Etudier l'aspect cinétique de l'activité antioxydante dans différents solvants polaires.

Annexes



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Laurus nobilis* leaves

Bekhti Nabila , Alessandra Piras , Belabdelli Fouzia , Danilo Falconieri , Guenaoui Kheira , Firdaous-Faiza Fedoul & Sekkal-Rahal Majda

To cite this article: Bekhti Nabila , Alessandra Piras , Belabdelli Fouzia , Danilo Falconieri , Guenaoui Kheira , Firdaous-Faiza Fedoul & Sekkal-Rahal Majda (2020): Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Laurus nobilis* leaves, Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2020.1839450

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1839450>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 28 Oct 2020.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20>

Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Laurus nobilis* leaves

Bekhti Nabila^a, Alessandra Piras^b, Belabdelli Fouzia^c, Danilo Falconieri^b, Guenaoui Kheira^d, Firdaous-Faiza Fedoul^d and Sekkal-Rahal Majda^a

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Exact Science, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbès, Algeria;

^bDepartment of Chemical and Geological Sciences, University of Cagliari, Monserrato, CA, Italy;

^cDepartment of Pharmacy, Faculty of Medicine, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbès, Algeria;

^dDepartment of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbès, Algeria

ABSTRACT

Chemical composition determination and *in vitro* antibacterial effect of Essential Oil (EO) of *Laurus nobilis* leaves grown North West Algerian conditions were investigated. Antibacterial activity was evaluated by the technique of the paper disc diffusion. Extractions were carried out with Clevenger apparatus and EO compositions were investigated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis. The oxygenated monoterpenes (MO) were the class with the highest contents, represent 59% of the EO. A total of twenty-seven of these compounds were identified, the major components were 1,8-cineole (30.1%), α -terpinyl acetate (21.6%), methyl eugenol (16.9%) of the total oil. The highest antibacterial power of the EO tested was recorded in *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* with the zone diameter of inhibition 13.6 and 11.2 mm respectively and a minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.25 mg/mL for both these two strains.

ARTICLE HISTORY

Received 30 June 2020

Accepted 16 October 2020

KEYWORDS

GC-MS; oxygenated monoterpenes; 1,8-cineole; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus faecalis*; MIC



CONTACT Nabila Bekhti  nabilachimie@yahoo.fr

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1839450>.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

The Mediterranean laurel, *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) is an evergreen tree or shrub famous for its aromatic leaves and flowers. A member of the family *Laurus nobilis* L. (Lauraceae), mythologically known as Apollo's Laurel is a plant native to the southern Mediterranean region and widely cultivated in many temperate and warm parts of the world, particularly in the countries bordering on the Mediterranean Basin, Europe and the USA as an ornamental plant. The commercial and medicinal value of this plant is due to its important chemical composition. *Laurus nobilis* L. Laurel essential oil is generally obtained by hydrodistillation or steam distillation. It is mainly used in the flavoring industry and could be used as a botanical bio pesticide in postharvest crop protection (Haouel-Hamdi et al. 2020). *L. nobilis* is a well-known medicinal plant in many countries; the leaves are traditionally used as a carminative, stomachic, and nervine (Popovic et al. 2003). As well as in the treatment of amenorrhea, colic, condylomata, hysteria, polyps, sclerosis, and spasms (Caputo et al. 2017). *L. nobilis* has been used as herbal medicine. Recently, pharmacological activities which include antibacterial, anti-fungal (Caputo et al. 2017; Fidan et al. 2019). To enrich our knowledge, and since no reports are available on the study chemical composition of essential oils from *L. nobilis* leaves collected from the west Northern Algeria Mountains. Thus, the objectives of this work were (1) investigate the essential oils yield of *L. nobilis* leaves collected in Algeria via hydrodistillation, (2) characterize by GC/MS analysis this essential oils and identify its complete chemical composition, (3) evaluate the antibacterial activity of the essential.

2. Results and discussion

The *L. nobilis* yield found 1.9% based on dry matter weight and composition were shown to be influenced by various factors, such as growth environment, harvest season, plant parts, extraction method, and others. GC/MS chromatogram of *L. nobilis* essential oil was represented in Figure S1 and the chemical composition of the obtained was illustrated in Table S1. Twenty-seven compounds were identified, accounting for 98.1% of the total oil. Oxygenated monoterpenes (MO) represent 59% of the EO, with 1,8-cineole the major compound with (30.1%) of the total oil, α -terpinyl acetate (21.6%) being the main components. The class with the second-highest contents was composed of the phenylpropanoids 18.7%, represented by methyl eugenol (16.9%), elemicin and apiole (0.9%) for each compound, respectively; belong to the class of monoterpenes hydrocarbons (MH) which accounts for 14.6% of the oil. Sesquiterpenes represent minor compound class 5.8% of the oil: the hydrocarbons (SH) 4.8% composed essentially of: (E)-caryophyllene (1.1%), bicyclogermacrene (0.8%), β -selinene (0.6%), and the oxygenated compounds (SO) 1%: α -eudesmol (0.6%) and β -eudesmol (0.4%). Previous studies from *L. nobilis* essential oil detected the highest amounts of 1,8-cineole (21.2%), followed by linalool (12.2%) and methyl eugenol (4.6%) (Fidan et al. 2019); 1,8-cineole (41.0%), α -terpinyl acetate (14.4%), sabinene (8.8%) and β -linalool (4.9%) (Kivrak et al. 2017); 1,8-cineole (31.9%), sabinene (12.2%), and linalool (10.2%) (Mediouni Ben Jemâa et al. 2012); 1,8-cineole (46.2%) (Moghtader

& Salari, 2012); 1,8-cineole (27.2%), α -terpinyl acetate (10.2%), linalool (8.4%) and methyl eugenol (5.4%) (Ramos et al. 2012); α -terpinyl acetate (28.43%), methyl eugenol (19.57%) (Mazandarani et al, 2013). In general, these findings confirmed that although there are almost the same components of essential oil composition of *L. nobilis* leaves in different regions in the world (Dhifi et al. 2018).

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of *L. nobilis* leaves essential oil were determined as shown in Table S2. Results showed that this tested oil was found to be active against *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* at a minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.25 mg/mL for both and these two strains displayed more sensibility to this oil compared with *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, which had a inhibitory concentration (MIC) of 0.75 and 0.5 mg/mL respectively, the same values are obtained by Goudjil (Goudjil et al. 2015). From these results, we conclude that since we get results of MBC/MIC smaller than 4, we can say that the EO extracted has a bactericidal effect against all strains tested.

The antimicrobial activity in vitro can be classified depending on MIC values according to the reference (Santos et al. 2008) as follows: the essential oil of *L. nobilis* leaves has moderate activity against the bacterial strains *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* with values of $100 \leq \text{MIC} \leq 500 \mu\text{g/mL}$ while for *Pseudomonas aeruginosa* the oil had low antimicrobial activity with a value of $500 \leq \text{MIC} \leq 1,000 \mu\text{g/mL}$.

In Table S3, the bacterial sensitivity testing towards *L. nobilis* leaves EO were noticed. The values shown are the average of three measurements. The different bacterial strains reacted differently to the essential oil tested; *Staphylococcus aureus* was the most sensitive strain tested to the oil with the strongest inhibition zone 13.6 mm.

The *Streptococcus faecalis* was, in general, found to be more sensitive among bacteria with an inhibition zone of 11.2 mm, modest activity was observed against *Escherichia coli* with inhibition zones of 9 mm, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* were the most resistant strain tested to the oil with the weaker inhibition zone less than 8 mm (7.6 and 7.4 mm) respectively. From these results and according to (Woodford et al. 1995) we conclude that *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* had found intermediate bacterial strains with areas of inhibition (>10 and <16 mm) while for the other three bacterial strains were more resistant since their zones of inhibition had found less than 10 mm. These microorganisms are morphologically and physiologically different and the results obtained are representative of microbial activities.

From Table S3, zones of inhibition greater than 10 mm were found for the two tested Gram-positive strains, which show that they were intermediate while those Gram-negative tested had zones of inhibition less than 10 mm, they were more resistant. This study showed that *L. nobilis* essential oil was effective against all tested Gram-positive bacterial strains, while the Gram-negatives were completely resistant to the tested sample. Gram-positive bacteria are generally more susceptible to the action of the oils compared with the Gram-negative ones. This is due to the presence of an additional outer membrane in Gram-negative bacteria, which may better protect the cytoplasmic membrane from the antibacterial compounds.

4  B. NABILA ET AL.

The differences in the quantitative and qualitative composition of the EOs between the Algerian laurel EO composition in this study and that from other countries reported in the literature could be due to some factors, such as the plant genotypes, soil characteristics, climatic conditions in the respective locality where the plants were grown, harvest time, and also to the plant parts processed and extracted.

Each essential oil always represents a complex mixture of different chemical components that may have contributed to the extended-spectrum of antibacterial activity. In this study most abundant leaf EOs constituents were: 1,8-cineole (30.1%) that has shown antibacterial activity against several microorganisms, due its synergistic or antagonistic effect with oxygenated terpenes of the oil (Pejin et al. 2014), it is known to process a strong antibacterial action against *Staphylococcus aureus* (Ramos et al. 2012). α -terpinyl acetate (21.6%) was the second component, followed by methyl eugenol (16.9%) which has a strong antimicrobial activity.

Overall, the results of this study showed that *L. nobilis* essential oil have significant antibacterial properties and moderate activity against the bacteria tested and these results are in line with previous literature reports (El Karagozlu et al. 2014; Caputo et al. 2017; Fidan et al. 2019).

3. Conclusion

Results confirmed that this essential oil content differs in quantity and composition from the past studies, due to the different geographical and environmental effects of the plant. This study once again recommends the exploitation of laurel EOs in the fields of pharmaceuticals and cosmetics. At the same time, it confirms their use as antibacterial compounds in crop protection and as a preservative in the food industry.

4. Experimental

The experimental details, the tables are available as [supplementary material](#).

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Professor Silvia Porcedda for welcoming us to the Department of Chemical and Geological Sciences, University of Cagliari, as well as for her help and guidance. The authors are thankful to Dr. Y. Achouri and Dr. A. Selka from the Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes.

Disclosure statement

The authors reported no potential conflict of interest.

References

- Caputo L, Nazzaro F, Souza LF, Aliberti L, De Martino L, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. 2017. *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. *Molecules*. 22(6):930.
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Ben Nasr S, El Beyrouthy M, Mnif W. 2018. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tunisian *Laurus nobilis*. *Pak J Pharm Sci*. 31(6):2397–2402. VolNo

- El SN, Karagozlu N, Karakaya S, Sahin S. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from *Laurus nobilis* L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. FNS. 05(02):97–106.
- Fidan H, Stefanova G, Kostova I, Stankov S, Damyanova S, Stoyanova A, Zheljzkov VD. 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of *Laurus nobilis* L. essential oils from Bulgaria. Molecules. 24(4):804.
- Goudjil MB, Ladjel S, Bencheikh SE, Zighmi S, Hamada D. 2015. Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. J Chem Pharmaceut Res. 7:379–385.
- Haouel-Hamdi S, Ben Hamedou M, Bachrouch O, Boushah E, Zarroug Y, Sriti J, Messaoud C, Hammami M, Abderraba M, Limam F, et al. 2020. Susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Laurus nobilis* essential oil and assessment on semolina quality. Int J Trop Insect Sci. 40(3): 667–675.
- Kivrak Ş, Göktürk T, Kivrak İ. 2017. Assessment of volatile oil composition, phenolics and antioxidant activity of Bay (*Laurus nobilis*) leaf and usage in cosmetic applications. Int J Sec Metabolite. 4:148–161.
- Mazandarani M, Mirdeilami SZ, Pessaraki M. 2013. Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in North east of Iran. J Med Plants Res. 7:1063–1069.
- Mediouni Ben Jemâa J, Tersim N, Taleb Toudert K, Larbi Khouja M. 2012. Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. J Stored Prod Res. 48:97–104.
- Moghtader M, Salari H. 2012. Comparative survey on the essential oil composition from the leaves and flowers of *Laurus nobilis* L. from Kerman province. J Ecol Nat Environ. 4:150–153.
- Pejin B, Savic A, Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Nikolic M, Radotic K, Mojovic M. 2014. Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. Nat Prod Res. 28(6): 372–376.
- Popovic M, Kaurinovic B, Cebovic T, Miloradov MV. 2003. 239 Effects of Laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves and berries ether oil, PCBs and CCl 4 on production of oxygen radicals. Toxicol Lett. 144:567–569.
- Ramos C, Teixeira B, Batista I, Matos O, Serrano C, Neng NR, Nogueira JMF, Nunes ML, Marques A. 2012. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. Nat Prod Res. 26(6):518–529.
- Santos AOD, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 103(3):277–281.
- Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DC. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin Microbiol Rev. 8(4):585–615.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Laurus nobilis* leaves'

Nabila Bekhti^{1*}, Alessandra Piras^{2*}, Fouzia Belabdelli³, Danilo Falconieri², kheira Guenaoui⁴, Firdaous-Faiza Fedoul⁴, Majda Sekkal-Rahal¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Exact Science, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes, B.P.89, 22000, Algeria.

²Department of Chemical and Geological Sciences, University of Cagliari, Cittadella Universitaria, SP 8, Monserrato – Sestu km 0.700, 09042 Monserrato (CA), Italy

³Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes, B.P.89, 22000, Algeria

⁴Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes, B.P. 89, 22000, Algeria.

*Corresponding authors: Nabila Bekhti, nabilachimie@yahoo.fr tel. +213 557671040

Abstract

Chemical composition determination and in vitro antibacterial effect of Essential Oil (EO) of *Laurus nobilis* leaves grown North West Algerian conditions were investigated. Antibacterial activity was evaluated by the technique of the paper disc diffusion. Extractions were carried out with Clevenger apparatus and EO compositions were investigated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis. The oxygenated monoterpenes (MO) were the class with the highest contents, represent 59% of the EO. A total of twenty-seven of these compounds were identified, the major components were 1,8-cineole (30.1%), α -terpynil acetate (21.6%), methyl eugenol (16.9%) of the total oil. The highest antibacterial power of the EO tested was recorded in *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* with the zone diameter of inhibition 13.6 and 11.2 mm respectively and a minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.25 mg/mL for both these two strains. This is the first report on the composition and the evaluation In vitro antibacterial properties of the EO of *Laurus nobilis* grown in the northwest of Algeria.

EXPERIMENTAL SECTION

List of contents

Table S1: Experimental linear retention index (RI), retention time (RT) and chromatographic area percentages of compounds identified in essential oil (EO) isolated from the leaves of *Laurus nobilis*.

Table S2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of *Laurus nobilis* leaves essential oil.

Table S3. Antimicrobial activity of *Laurus nobilis* L. leaves essential oil (EO).

Plant Material

Fresh plant material of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves were collected from the mountains of Tessala in the Northern West of Algeria, on February-March 2018; the plant was identified by Dr. A. Selka, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Djillali Liabes University, Algeria.

Essential Oil Isolation

The harvested material was air-dried at room temperature (20-25°C) in the shade until constant weight, then milled in a blender and stored in cloth bags for extraction.

100 g of ground plant material was suspended in 1 L of distilled water and hydrodistilled for 4 hours in a European Pharmacopeia hydrodistillation apparatus, similar to the Clevenger-type. The essential oils were separated, dried over anhydrous sodium sulfate to remove traces of moisture and stored in airtight glass vials covered with aluminum foil at 4-5°C until analysis. The yield in essential oil was expressed in % (w/w) and it represents the quantity of essential oil extracted from 100 g of dried vegetal material. The essential oil yield was calculated using the following equation.

$$R_{HE} (\%) = (m_{HE}/m_S) \times 100$$

Where:

m_{HE} = essential oil mass (g), m_S = dry leaves matter mass (g), R_{HE} = essential oil yield (%).

Essential Oil Analysis

Analysis of volatile oil was obtained by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (GC-MS):

GC-FID Analysis

Analytical gas chromatography was performed using a (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) gas chromatograph which contains a single injector and two flame ionization detectors (FID) and a data handling processor. The separation was achieved using (Agilent

Technologies, Part Number 5021-7148) used for simultaneous sampling to two Supelco (Supelco Inc., Bellefont, PA, USA) fused silica capillary columns with different stationary phases: SPB-1 (polydimethylsiloxane 30m×0.20mm i.d., film thickness 0.20 µm), and Supelco Wax 10 (polyethyleneglycol 30 m×0.20 mm i.d., film thickness 0.20 µm).

Regarding the temperature program used: It is increasing at a rate of 3 °C per minute, starting with 60°C to 250 °C to stabilize for 20 min, and thus the time required for analysis is 82 min. with other experimental conditions represented in: helium was used as carrier gas(purity ≥ 99.9999%—Air Liquid Italy); adjusted to a linear velocity of 30 cm/s; splitting ratio 1:40 to injection of 1 µl of a diluted sample(1:100 in n-hexane, w/w) and a detector temperature limited to 250 °C.

GC/MS Analysis

GC–MS analyses were executed in Hewlett Packard 6890 gas chromatograph consisting of HP1 fused silica column (polydimethylsiloxane 30 m×0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm), related to a Hewlett Packard mass selective detector 5973 (Agilent Technologies) operated by HP Enhanced ChemStation software, version A.03.00. Gas chromatographic conditions were reported in the aforementioned. In addition to the following MS conditions which are: interface temperature: 250 °C; MS source temperature: 230 °C; MS quadrupole temperature: 150 °C; ionization energy voltage: 70 eV; ionization current: 60 µA; Mass spectra were scanned in the range: 35–350 u; amu, with a scan time of 5 scans/s.

Identification of Essential Oil Components

Chromatograms and mass spectra were captured and treated by MSD ChemStation program (Agilent, rev. E.01.00.237). The identification of the essential oil constituents was based on the comparison of their mass spectra concerning those of NIST02 library data of the GC/MS system and Adams libraries spectra (NIST/EPA/NIH, 2002; Adams, 2007). Retention indices of the components were determined according to the retention times of a series of n-alkanes (two standard mixes C8– C20, and C21– C40) with linear interpolation (Marzouki et al 2009). The components' relative concentrations were obtained by peak area normalization and the Percentages of each component were calculated based on these results.

Antibacterial activity

Bacterial strains

The antibacterial activity of Essential Oil was individually tested against a panel of microorganisms, clinically isolated strains from the Microbiology Laboratory of Pasteur institute of Algeria: two Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 and *Escherichia coli* ATCC 25922 with Gram-negative,

regarding *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* which were two Gram-negative bacteria isolated and obtained from clinical samples, Department of Parasitology-Mycology, Hassani Abdelkader University Hospital, Faculty of Medicine, Djillali Liabes University, Algeria.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The broth dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (El Amri et al., 2014). The Essential oil was placed in a sterile tube containing Mueller-Hinton broth (MHB), diluted in Tween 80 to obtain a concentration range between (1-0.1) mg/mL. Prepared a bacterial suspension with a concentration of 0.5 McFarland standard of 10^8 CFU/mL. 13 μ L from each bacterial suspension was placed in each of the tubes in the range, which were incubated at 37°C for 24 h, and control of the bacterial growth is also carried out under the same operating conditions. After incubation, the MIC of the essential oil tested was determined by visual inspection of the tubes and deduced from the first tube of the range devoid of bacterial growth. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by making subcultures from the clear tubes which did not show any growth. Each test was performed in triplicate and repeated twice. The MBC / MIC report of EO provides information on the antibacterial power. Indeed, when this ratio is less than or equal to 4, the oil is said to be bactericidal while if it is greater than 4, the oil is said to be bacteriostatic (Bonou et al. 2016).

Antibacterial screening

The inhibition halo test was performed to evaluate the potential antibacterial activity of the *Laurus nobilis* leaves' essential oil. This test was determined using the technique of paper disc diffusion (NCCLS, 2002). All of the cultures were transferred into Mueller-Hinton broth (MHB) tubes and incubated at 37 ± 0.1 °C for 24 h in nutrient broth, The optical densities of all cultures were adjusted to match a 0.5 McFarland standard of 10^8 colony-forming units (CFU)/mL, 0.1 mL from each bacterial suspension was spread on the surface of Mueller Hinton agar (MHA; Liofilchem, Roseto D.A., Italy) distributed onto the sterilized Petri dishes (9 cm). The essential oil of *L. nobilis* was resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma–Aldrich) and then diluted to be subjected to biological analyses. Sterilized blank paper discs (Whatman Grade 1.6 mm in diameter) were individually impregnated with 20 μ L of this diluted oil with different concentrations (MIC found of each bacterial suspension) and then placed onto the Petri dishes which had previously been inoculated with the above organisms. These last were left for 30 min at room temperature under sterile

Annexes

conditions to allow for the diffusion of extracts and then incubated at 37 °C for 24 h. At that time, inhibition zones appearing around the paper discs were measured and recorded in mm.

Table S1: Experimental linear retention index (RI), retention time (RT) and chromatographic area percentages of compounds identified in essential oil (EO) isolated from the leaves of *Laurus nobilis*.

No.	Compound	Formula	Class	Area (%)	RT (Min)	RI exp (HP-5)
1.	α -thujene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.3	5.0467	929
2.	α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	3.2	5.2172	937
3.	camphene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.3	5.5844	952
4.	sabinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	5.6	6.2095	976
5.	β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	2.6	6.3101	979
6.	myrcene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.4	6.6685	991
7.	limonene	C ₁₀ H ₁₆	MH	1.6	7.8576	1031
8.	1,8-cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	30.1	7.9363	1034
9.	γ -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	MH	0.6	8.8499	1061
10.	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	1.0	10.3188	1099
11.	terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	1.9	13.3396	1178
12.	α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	MO	2.8	13.886	1190
13.	isobornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	MO	0.8	17.8467	1286
14.	δ -terpymil acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	MO	0.8	19.1625	1317
15.	α -terpymil acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	MO	21.6	20.5264	1351
16.	β -elemene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.6	22.2619	1391
17.	methyl eugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	Pr-BO	16.9	22.8303	1404
18.	(E)-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	SH	1.1	23.3286	1418
19.	α -guaiene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.5	24.133	1438
20.	gemmaene D	C ₁₅ H ₂₄	SH	1.0	25.8117	1479
21.	β -selinene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.6	26.0084	1484
22.	bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.8	26.4281	1494
23.	α -bulnesene	C ₁₅ H ₂₄	SH	0.2	26.7559	1502
24.	elemicin	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	Pr-BO	0.9	28.8674	1558
25.	β -eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	0.4	32.2379	1648
26.	α -eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	0.6	32.3865	1652
27.	apiole	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	Pr-BO	0.9	33.4925	1681
Total identified					98.1 %	
Monoterpenes hydrocarbons (MH)					14.6 %	
Oxygenated monoterpenes (MO)					59 %	
Sesquiterpene hydrocarbons (SH)					4.8 %	
Sesquiterpene oxygenated (SO)					1.0 %	
Phenylpropanoids (Pr-BO)					18.7 %	

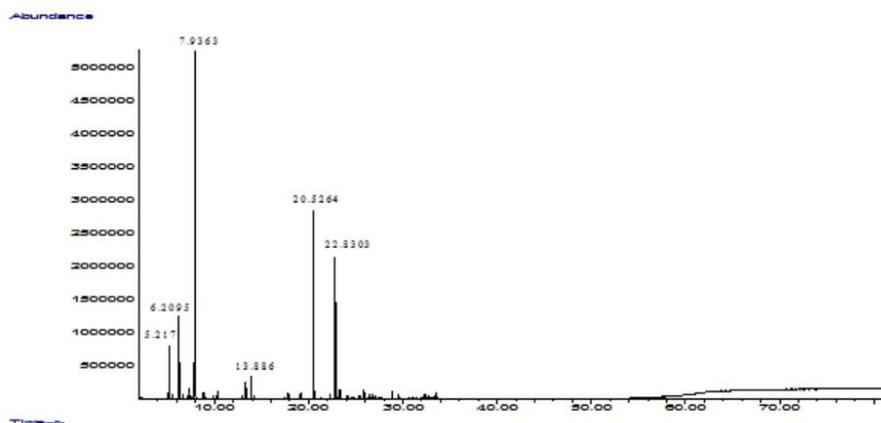
Table S2: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of *Laurus nobilis* leaves essential oil.

Test Microorganisms	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/ MIC
<i>Escherichia coli</i>	0.5± 0.10	0.8± 0.00	1.6<4
<i>Proteus mirabilis</i>	0.35± 0.10	0.5± 0.05	1.42<4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.75± 0.00	0.75± 0.00	1<4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25± 0.05	0.5± 0.10	2<4
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.25± 0.05	0.65± 0.15	2.6<4

Table S3: Antimicrobial activity of *Laurus nobilis* L. leaves essential oil (EO).

Test Microorganisms	Inhibition Zone (mm)
<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	9.0± 0.04
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	13.6± 0.05
<i>Streptococcus faecalis</i> (Gram +)	11.2± 0.01
<i>Proteus mirabilis</i> (Gram -)	7.4± 0.02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram -)	7.6± 0.00

Figure S1: GC/MS Chromatogram of *Laurus nobilis* leaves volatile oil. Retention times of the majority components are given: α -pinene (5.2172), sabinene (6.2095), 1, 8-cineole (7.9363), α -terpineol (13.886), α -terpynil acetate (20.5264), methyl eugenol (22.8303).



References

- Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. (4th ed). Carol Stream, IL: Allured publishing.
- Bonou, J., Baba-Moussa, F., & Adéoti, Z. (2016). Antimicrobial activity of essential oils of *Lippia multiflora*, *Eugenia caryophyllata*, *Mentha piperita* and *Zingiber officinale* on five oral-dental microorganisms. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5, 271.

- El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., bouharb, H., chakir, S., & Alaoui, T. (2014) Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de Silène vulgaris sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82, 7481-7492.
- Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D., & Marongiu, B. (2009). Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 23, 230-237.
- NCCLS (2002). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : Twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA.
- NIST/EPA/NIH. (2002). *Mass spectral library*. Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology.