

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE

FACULTE DE CHIMIE



# THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT

En CHIMIE

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE

Par : Mme DAHMANI-HAMZAOUI Nacéra

Sujet :

**ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE  
L'ARTEMISIA HERBA-ALBA POUSSANT  
EN ALGERIE**

Soutenue publiquement le : 07 / 03 / 2010, Devant le Jury composé de :

M <sup>f</sup> M. MOUZALI	Professeur (U.S.T.H.B)	Président
M <sup>f</sup> A. BAALIOUAMER	Professeur (U.S.T.H.B)	Directeur de thèse
M <sup>f</sup> J. ALTAREJOS	Professeur (U.JAEN, ESPAGNE)	Examineur
M <sup>f</sup> S. BOUDAH	Professeur (U.S.T.H.B)	Examineur
M <sup>me</sup> A. HASSANI	Professeur (ENS Kouba)	Examineur
M <sup>f</sup> N. SABAOU	Professeur (ENS Kouba)	Examineur

# ***DEDICACES***

***À MES PARENTS***

***À MON MARI***

***À MES ENFANTS** (Anis, Hassène, Rayane et Mérina)*

***À MES SOEURS** (Karima, Hakima, Baya, Nora, Samia et Djedjigua)*

***À MES FRÈRES** (Chérif, Mohamed Saïd et Billal)*

***À MES NEVEUX** (Ahcène, Elisa, Nazim, Malek, Samy, Rabeh, Imen et Sahra)*

***À MA BELLE FAMILLE***

***À TOUTE MA FAMILLE***

***À TOUS MES AMIS***

## ***REMERCIEMENTS***

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie de l'Université des Sciences et de la Technologie HOUARI BOUMEDIENNE (U.S.T.H.B.), sous la direction de Monsieur le Professeur A. BAALIOUAMER Directeur du Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie. Je tiens particulièrement à lui témoigner ma plus profonde gratitude et mes sincères remerciements pour m'avoir guidée tout au long de ce travail. Je lui suis par ailleurs reconnaissante pour la liberté qu'il m'a accordée dans les orientations de mes recherches et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée.*

*Toutes les analyses par GC et GC/MS ont été réalisées au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimique (CRAPC) auquel est associé notre laboratoire par le projet intitulé : « Etude de la Composition Chimique de quelques Plantes Aromatiques Algériennes : Cas du Genevrier, de la Myrte, de la Santoline, du Cèdre, de l'Armoise, de la Nigelle, du Thym et de l'Origan », aussi, je suis très heureuse de témoigner ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur BY. MEKLATI Directeur du (CRAPC) et à Monsieur le Professeur A.Y. BADJAH HADJ AHMED pour leurs encouragements, leurs conseils et leur aide précieuse. J'exprime mes remerciements à tous mes collègues du laboratoire d'A.O.F particulièrement à Mme S. Mecherara pour son aide précieuse ainsi qu'aux collègues du CRAPC pour l'atmosphère agréable qu'ils ont su créer et entretenir au sein de notre équipe.*

*Je suis très heureuse de témoigner ma gratitude à Monsieur N. SABAOU, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba pour m'avoir permise de réaliser les analyses microbiologiques dans son laboratoire, sans oublier Monsieur A. Zitouni Maître de conférences à L'ENS pour m'avoir initiée aux techniques de l'analyse microbiologique.*

*Toutes l'étude structurale des composés antioxydants a été réalisée au Laboratoire de Chimie Organique de la Faculté des Sciences Expérimentales de l'Université de Jaèn sous*

*la direction de Monsieur le Professeur J. Altarejos. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a accordée. Sa grande expérience et ses précieux conseils ont permis la réalisation d'une partie de la Thèse. Je suis également reconnaissante aux Professeurs Sofia Salido et Pablo J. Linares-Palomino pour leur grande disponibilité. Je remercie particulièrement Sofia Salido pour son dévouement incomparable, pour ses encouragements constants à mon égard pour accomplir ce travail. Je tiens à remercier également toute l'équipe du Département de Chimie Organique et Inorganique de l'Université de Jaén (Laura Mercedes, Luisa, Maria, José et Antonio...) qui étaient là pour moi ainsi que pour leur sympathie et pour leur patience à l'égard de mes connaissances limitées en langue Espagnole.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur M. MOUZALI, de la Faculté de Chimie de l'USTHB, en acceptant de présider le Jury de cette Thèse.*

*Je exprime mes profonds remerciements à Madame A. HASSANI et Monsieur N. SABAOU, Professeurs à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba à Monsieur S. BOUDAH, Professeur à l'USTHB et à Monsieur J. ALTAREJOS, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de venir participer à ce jury.*

*Je tiens particulièrement à remercier Carmen et Nabila Lazzouzi d'avoir été présentes pour moi pendant mon séjour à Jaén et leur amitié qui m'est très chère.*

*Je remercie enfin toute ma chère famille qui m'a soutenue et encouragée, je remercie mon beau frère Nabil pour son aide précieuse ainsi que mes amis et tous ceux qui me liront et qui trouveront un intérêt dans ce travail*

# SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
<b>CHAPITRE I. Généralités sur l’A. herba-alba, les huiles essentielles et les antioxydants</b>	
I. Présentation de l’A. herba-alba	3
I.1. Définition	3
I.2. Description botanique	3
I.3. Domaines d’utilisation	4
II. Généralités sur les huiles essentielles	5
II.1. Définitions	5
a. La concrète	5
b. Pommade florale	5
c. L’absolue	5
d. Les cires	5
II.2. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante	6
II.3. Composition chimique des extraits volatils	6
II.4. Procédés d’obtention des huiles essentielles	7
II.4.1. Procédés mettant en jeu la vapeur d’eau	7
a. Hydrodistillation	7
b. Entraînement à la vapeur	7
c. Extraction par micro-ondes	8
II.4.2. Extraction par solvant organique	8
II.5. Activités antimicrobiennes	8
II.5.1. Propriétés antimicrobiennes	8
II.5.2. Mode d’action contre les bactéries	9
III. Oxydation et antioxydant	9
III.1. Stress oxydatif	10
III.2. Les radicaux libres	10
III.2.1. Définition	10
III.2.2. Principaux radicaux libres	11
III.2.3. Origine des radicaux	11
III.3. Les conséquences du stress oxydant	12
III.4. les antioxydants	13
III.4.1. Les antioxydants endogènes	13
III.4.2. Les antioxydants naturels	14
a. La vitamine E	14
b. La vitamine C	14
c. Les caroténoïdes	14
d. Le Sélénium	15
e. Le Zinc	15
f. Les phytonutriments	15
III.4.3. Les antioxydants synthétiques	16
IV. Travaux antérieurs sur la composition chimique, l’étude antimicrobienne et antioxydante de L’A. herba-alba	16

## Chapitre II. Echantillonnage et extraction des huiles essentielles

I. Résultats et discussion	26
I.1. Détermination de la durée d'extraction par hydrodistillation	26
I.2. Détermination des conditions d'extraction par micro-onde	28
I.3. Détermination du rendement selon la période de récolte	29
I.4. Les rendements d'extractions	30
I.5. Indices physiques	31
II. Partie expérimentale	33
II.1. Matériel botanique	33
II.2. Préparation des échantillons et extraction	33
II.3. Extraction par hydrodistillation	33
II.4. Extraction par micro-ondes	35

## Chapitre III. Analyse des huiles essentielles d'*A. herba-alba* par GC et GC/MS

I. Introduction	36
II. Résultats et discussion	37
III. Partie expérimentale	59
III.1. Chromatographie en phase gazeuse	59
III.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	59
III.3. Identification des composés	60
IV. Conclusion	60

## Chapitre IV. Etude des activités antibactérienne et antifongiques des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba*

I. Introduction	61
II. Résultats et Discussion	61
III. Partie expérimentale	66
III.1. Milieu de culture	66
III.2. Mode opératoire	66
IV. Conclusion	67

## Chapitre V. Etude structurale de composés antioxydants extraits à partir de l'*Artemisia herba-alba*

I. Introduction	68
II. Résultats et discussion	69
II.1 Etude de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles d' <i>A. herba-alba</i>	69
II.2 Étude préliminaire	70
II.3. Activité-guidée par chromatographie et isolement des antioxydants	76
II.3.1. Extraction et activité anti oxydante d' <i>A. herba-alba</i>	76
a. Activité de capture du radical DPPH	76
b. Analyse par chromatographie liquide HPLC-DAD	76
c. Technique combinée HPLC-DAD-DPPH	76
II.3.2. Extraction et activité anti oxydante de l'extrait éthanolique	78
a. Rendement et activité anti oxydante	78
b. Evaluation de l'activité antioxydante de capture du radical DPPH	78

c. Analyse par chromatographie liquide	80
d. Technique combinée HPLC-DAD-DPPH	83
II.3.3. Elucidation structurales des composés isolés	89
II.3.4. Activité radicalaire des antioxydants isolés	99
II.4. Intéret biologique	100
III. Partie expérimentale	101
III.1. Etude préliminaire et activité antioxydante	101
III.1.1. Matière végétale et conditions d'extraction	101
a. Matériel Botanique	101
b. Extraction par hydrolyse	101
c. Extraction par soxhlet	102
III.1.2. Etude structurale des composés antioxydants	102
a. Matériel Botanique	102
b. Extraction et isolement	102
III.2. Techniques générales et instrumentation	107
III.2.1. Réactifs et solvants	107
III.2.2. Techniques chromatographiques	107
a. Chromatographie sur colonne (CC)	107
b. Chromatographie sur couche mince (CCM)	107
c. Chromatographie liquide (HPLC)	108
e. Chromatographie liquide : On-line HPLC-DAD-DPPH	109
III.2.3. Techniques analytiques et spectroscopiques	110
a. Pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D$ )	110
b. Spectroscopie ultraviolet visible (UV/VIS)	110
c. Spectroscopie infrarouge (IR)	110
d. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	111
e. Spectrométrie de masse (MS)	111
f. Spectrométrie de masse TOF-HPLC	111
III.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	112
a. Evaluation de l'activité antioxydante par la capacité de capturer les radicaux	112
b. Evaluation quantitatif	112
VI. Conclusion	112
Conclusion Générale	115
Références Bibliographie	118
Annexes	132

## ABRÉVIATIONS

Abs:	Absorbance
AQ:	Acide quinique
3-moCQA:	Acide 3-mono-O-caféylquinique
3,4-diCQA:	Acide 3,4-di-O-caféylquinique
3,5-diCQA:	Acide 3,5-di-O-caféylquinique
3,4,5-triCQA:	Acide 3,4,5-tri-o-caféylquinique
AcOH:	Acide acétique
AcOEt :	Acétate d'éthyle
ADN :	Acide désoxyribonucléique
<i>A.herba-alba</i> :	<i>Artémisia herba-alba</i>
Ar:	Aromatique
$\alpha_D^{20}$ :	Pouvoir rotatoire à 20°C
BA:	Batna
BB:	Bordj Bou Arreridj
BHA:	Butylhydroxyanisol
BHT:	Butylhydroxytoluène
BI:	Bouira
BL:	Bordj Ghédir
BO:	Boussâada
BuOH:	Butanol
CC:	Chromatographie sur colonne
CCM:	Chromatographie sur couche mince
CE <sub>50</sub> :	Concentration efficace à 50% de DPPH
CHA:	Acide chlorogénique
CMI:	Concentration minimale inhibitrice
COSY:	Correlation spectroscopy (spectroscopie de corrélation)
%CR:	Pourcentage de capture du radical
D et D' :	Djelfa
DAD:	Détecteur à barrette de diode
$d_{20}^{20}$ :	Densité à 20°C
DC:	Drâa Ech Chih
DCM:	Dichlorométhane
DEPT:	Distortionless enhancement by polarisation transfer (augmentation sans distorsion par transfert de polarisation)
DPPH <sup>•</sup> :	Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DS:	Déviations standards
EIIIa:	1 <sup>ère</sup> partie expérimentale du chapitre III
EIIIb:	2 <sup>ème</sup> partie expérimentale du chapitre III
EIIIc:	3 <sup>ème</sup> partie expérimentale du chapitre III
EIVa:	1 <sup>ère</sup> partie expérimentale du chapitre IV
EIVb:	2 <sup>ème</sup> partie expérimentale du chapitre IV
EVa:	1 <sup>ère</sup> partie expérimentale du chapitre V
EVb:	2 <sup>ème</sup> partie expérimentale du chapitre V
EVc:	3 <sup>ème</sup> partie expérimentale du chapitre V
EVd:	4 <sup>ème</sup> partie expérimentale du chapitre V

EVe:	5 <sup>ème</sup> partie expérimentale du chapitre V
ERO:	Espèces réactives de l'oxygène
EtOH:	Ethanol
G:	Ghardaia
GC:	Chromatographie gazeuse
GC/MS:	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HD:	Hydrodistillation
HMBC:	Heteronuclear multiple band coherence (corrélation hétéronucléaire à travers plusieurs liaisons).
HPLC:	Chromatographie liquide à haut performance
HSQC:	Heteronuclear single quantum coherence (corrélation hétéronucléaire à simple quantum)
IE:	Impact électronique
IR:	Spectroscopie infrarouge
J:	Constante de couplage
LDL:	Lipoprotéines de basse densité
LG:	Laghouat
M:	Medjedel
MD:	Micro-ondes distillation
MS:	M'sila
MWHD:	Hydrodistillation assistée par micro-onde
m/z:	Rapport masse/charge électronique
N0:	Extrait EtOH
N1:	Extrait DCM
N2:	Extrait AcOEt
N3:	Extrait AcOEt PH3
N4:	Extrait BuOH
$\eta_D^{20}$ :	Indice de réfraction à 20°C
R:	Roumana
R%:	Rendement d'extraction
RMN <sup>13</sup> C:	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du carbone 13
RMN 2D:	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à 2 dimensions
RMN <sup>1</sup> H:	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton
RP-HPLC:	Chromatographie préparative
SM:	Spectrométrie de masse
SM-ESI:	Spectrométrie de masse en mode <i>electrospray</i>
SOD:	Superoxyde dismutase
UV:	spectroscopie ultraviolet
UV/VI:	Spectroscopie ultraviolet visible
VIH:	Virus d'immunodéficience humaine
v/v:	volume par volume

## GLOSSAIRE

**Abortifacient** : provoquant l'avortement, stoppant le déroulement normal de la grossesse.

**Acide désoxyribonucléique (ADN)** : substance porteuse de l'information génétique. L'ADN est la molécule où les gènes sont codés par l'enchaînement de quatre bases : l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. La séquence de ces bases détermine l'hérédité.

**Aldose-réductase-inhibiteur** : sont une classe de médicaments à l'étude comme un moyen d'empêcher des lésions nerveuses chez les personnes atteintes de diabète.

**Allelopathique** : phénomène où de nombreuses espèces végétales synthétisent des molécules capables d'agir sur le développement des plantes avoisinantes.

**Alzheimer** : La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative à prédominance corticale qui touche en premier lieu les fonctions cognitives et se répercute sur le comportement et l'adaptation sociale des patients

**Aménorrhée** : absence d'apparition ou la disparition des règles

**Analgésique** : prévient ou diminue la sensation de douleur (antidouleur)

**Anesthésique** : substance provoquant l'anesthésie

**Antibactérien** : détruit les bactéries

**Antiasthmatique** : qui combat l'asthme

**Anticariogénique** : contre les caries

**Antidiabétique** : qui agit contre le diabète.

**Antidiarrhétic** : Contre la diarrhée

**Antidysentérique** : contre la dysenterie (dysenterie : infection intestinale avec diarrhée grave)

**Antifeedant** : qui inhibe le comportement alimentaire normal, un agent chimique qui provoque un parasite, comme un insecte, d'arrêter de manger.

**Anthelminthique** : qui lutte contre les parasites, ils sont classés dans les vermifuges.

**Anti-inflammatoire** : destiné à combattre une inflammation. Il fait dégonfler et diminuer l'irritation. La plupart des anti-inflammatoires sont des antidouleurs.

**Antioxydant** : molécule capable de protéger l'organisme contre les effets toxiques des radicaux libres. Ils ne sont pas fabriqués par l'organisme mais la plupart peuvent être fournis par l'alimentation.

**Antiseptique** : substance qui tue les germes ou prévient la croissance des bactéries et des virus sur les surfaces externes du corps.

**Antispasmodique** : permet de lutter contre les spasmes (contractures, crampes, convulsions), agit généralement en empêchant la contraction des fibres musculaires de l'intestin et des voies urinaires.

**Antistaphylococcique** : qui lutte contre les infections par staphylocoques (bactérie agent de nombreuses affections)

**Antistreptococcique** : qui lutte contre les streptocoques (bactérie produisant des infections graves)

**Antiviral** : perturbant le cycle de réplication d'un ou de plusieurs virus

**Anxiolytique** : tranquilisant, contre les angoisses.

**Aphtes** : ulcération virale sur les muqueuses.

**Candidicide** : contre la mycose provoquée par les candidas

**Carminatif** : qui résorbe les gaz intestinaux.

**Cataracte** : c'est une zone sombre ou opaque dans le cristallin de l'œil qui provoque des troubles de la vue.

**Cholagogue** : une substance à effet cholérétique, évacuant la bile.

**Cholérétique** : agissant sur la sécrétion biliaire  
**Dépuratif** : qui épure l'organisme en enlevant les toxines  
**Diurétique** : qui favorise l'élimination de l'urine  
**Émétique** : qui provoque des vomissements  
**Emménagogue** : facilite et provoque l'évacuation des règles.  
**Epileptogénique /convulsant** : qui provoque une épilepsie ou des convulsions  
**Expectorant** : permet l'expulsion du mucus de la trachée ou des bronches par de l'expectoration ou de la toux.  
**Fébrifuge** : qui enrayer la fièvre.  
**Fongicide** : destinée à détruire des champignons parasites  
**Gastro-entérite** : inflammation simultanée de l'estomac et de l'intestin qui se manifeste par des douleurs abdominales, des nausées et parfois des vomissements et de la diarrhée.  
**Goutte** : maladie due à un excès d'acide urique et affectant les articulations  
**Herbicide** : qui détruit les mauvaises herbes.  
**Hypnotique** : provoquant le sommeil, relatif à l'hypnose, sommeil artificiel provoqué par suggestion  
**Insectifuge** : repousse les insectes (moustiques, mouches, poux, puces, punaises, etc. ...)  
**Insecticide** : détruit les insectes  
**Larvicide** : utilisé pour détruire des larves d'insectes nuisibles  
**Mycoses** : affection de la peau par des champignons parasites  
**Myorelaxant** : décontracte les muscles  
**Nématocides** : sont des produits qui vont servir à éliminer les vers, notamment ceux qui s'attaquent aux racines. Certains peuvent être très dangereux pour l'homme...  
**Pesticide** : repousse, détruit ou combat les ravageurs et les espèces indésirables  
**Sédatif** : agit contre la douleur, l'angoisse et l'insomnie.  
**Spasme** : contraction musculaire violente, passagère et involontaire  
**Spasmogénique** : substance qui peut produire des spasmes  
**Stomachique** : favorise la digestion  
**Termitifuge** : détruit les termites.  
**Tonique** : qui fortifie (physiquement ou moralement)  
**Trichomonocide** : traite l'affection du gros intestin due à la présence de protozoaires flagellés, les trichomonas, qui irritent la paroi  
**Vermicide** : détruit ou expulse des vers.  
**Virocide** : substance apte à détruire les virus, des agents pathogènes caractérisés par une très faible taille (invisibles au microscope optique)

# *Introduction*

## INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine. Malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique.<sup>1,2</sup>

Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales, trouvent des applications dans divers domaines tels que la médecine, la pharmacie, la cosmétologie (parfumerie, savonnerie...) et l'agriculture. L'évaluation de leurs propriétés phytothérapeutiques notamment comme antioxydantes et antimicrobiennes, demeure une tâche de plus en plus recherchée.<sup>3</sup>

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie ou le traitement de nombreuses pathologies. En effet, on met actuellement en évidence le rôle néfaste des processus oxydatifs incontrôlés et des réactions de type radicalaires dans la genèse, l'entretien ou les séquelles d'un nombre croissant de maladies, généralement liées au vieillissement, que leur mécanisme soit bien connu (athérosclérose) ou encore à l'étude comme les maladies neurodégénératives telles que Parkinson et Alzheimer.

L'Algérie est un pays doté d'une riche biodiversité, où beaucoup de plantes sont utilisées comme aromatisants, aliments naturels et/ou thérapeutiques. Peu d'efforts ont été consacrés dans le pays au développement des agents chimiothérapeutiques et prophylactiques de ces plantes. Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'*Artémisia herba-alba* (Armoise blanche ou Chih) qui pousse à l'état spontané dans la steppe Algérienne et au Sahara. Elle est fréquemment employée par la population contre de nombreuses pathologies telles que les aménorrhées, les syndromes neurologiques, les troubles hépatiques, les troubles gastriques et certains empoisonnements.

Au fil de la recherche bibliographique relative à cette plante, il s'est progressivement imposé qu'elle mérite une attention particulière à cause de sa grande variété chimique intraspécifique et de son potentiel aromatique et thérapeutique.

L'étude va porter sur les huiles essentielles de l'armoise blanche originaire de onze régions d'Algérie : Batna, Bordj Bou Arréridj, Bordj Ghédir, Draâ Ech Chih, Djelfa, M'sila, Boussaâda, Roumana, Medjedel, Ghardaia et Laghouat extraites par hydrodistillation utilisant un appareil de clevenger et les micro-ondes.

Dans une première partie, le travail sera consacré à la détermination de l'aspect qualitatif et semi quantitatif des essences extraites, selon les régions et les localités de cultures régies par les conditions géographiques et climatiques. Il s'agit également de connaître l'impact de la technique d'extraction sur le rendement en essence et sur la composition chimique de cette dernière.

Cette étude va être complétée par des essais d'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles.

- L'activité antioxydante est évaluée sur les huiles obtenues par hydrodistillation par le pouvoir réducteur et l'inhibition du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).
- L'activité antimicrobienne est évaluée par la méthode des dilutions sur quatorze microorganismes.

La seconde partie de ce travail traite de l'isolement et de la caractérisation de molécules actives d'*A. herba-alba*. La détection des composés antioxydants dans certaines fractions et la séparation des plus actives vont être réalisées par la technique "on-line" HPLC-DAD-DPPH.

Les structures des molécules isolées par chromatographie sur colonne et par HPLC semi-préparative en phase inverse seront déterminées par des méthodes spectroscopiques telles que la RMN  $^1\text{H}$ , la RMN  $^{13}\text{C}$ , la RMN 2D, l'UV, l'IR et la SM.

L'activité anti-oxydante des extraits et des composés purs est déterminée par la mesure de l'activité radicalaire en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

# *Chapitre I*

**Généralités sur l'*Artemisia herba-*  
*alba*, les huiles essentielles et les  
antioxydants**

## **I. Présentation de l'*Artemisia herba-alba***

### **I.1. Définition**

L'*A.herba-alba*, chih en berbère et en arabe, appartient à la plus vaste famille du règne végétal : les composées. Cette famille comprend plus de 1000 genres et 1500 espèces repartis sur tous les continents et dans les milieux tempérés du globe.<sup>4</sup>

*A.herba-alba*, est presque spécifique du sud du bassin méditerranéen où elle affectionne les milieux secs et chauds. Elle est répandue depuis les îles Canaries et le Sud-Est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan) ainsi qu'à travers l'Afrique du Nord, l'Arabie et le Proche-Orient. En Afrique du Nord, cette espèce couvre d'immenses territoires évalués à plus de dix millions d'hectares. En Algérie, elle se rencontre à l'état spontané et il n'est pas rare de trouver des zones de plusieurs dizaines de kilomètres de rayon où seule l'armoise blanche règne dans un paysage quasi-désertique, elle couvre près de 6 millions d'hectares.<sup>5</sup>

Sur ce climat désertique, l'armoise blanche est une plante qui présente une forte résistance à la sécheresse dans la nature où elle reste physiologiquement active pendant toute la saison sèche jusqu'à aboutir à la floraison à la fin de cette période.

Etant une plante vivace, buissonnante, elle présente un intérêt économique comme pâturage permanent dans certaines zones désertiques.<sup>6,7</sup>

Par ailleurs, des analyses sur la composition en oligoéléments et acides aminés ont permis de conclure que l'Armoise blanche aide dans le développement de l'élevage en Algérie et au Maghreb en général.<sup>8,9</sup> En plus de cet aspect agro-pastoral, cette plante a des applications industrielles.

### **I.2. Description botanique**

L'Armoise blanche est une plante herbacée à tiges ligneuses et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillée avec une souche épaisse. Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites et ovoïdes. L'involucre est à bractées imbriquées, les externes orbiculaires et pubescentes. Le réceptacle floral est nu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitule toutes hermaphrodites.<sup>9,10</sup> (figure I)



*Artemisia herba-alba*

### **I.3. Domaines d'utilisation**

En alimentation, l'*A.herba-alba* sert à l'aromatisation de certaines boissons notamment le café.<sup>11, 12</sup> L'utilisation de ses huiles essentielles dans l'industrie alimentaire reste très limitée et ce, à cause de la grande hétérogénéité de leur composition.<sup>13</sup>

Elles sont au contraire très utilisés en parfumerie et cosmétologie pour leur pouvoir antiseptique et aromatisant même si leur commercialisation pose de sérieux problèmes à ce jour, à cause de la diversité de leur compositions chimiques.<sup>14</sup>

En médecine, cette plante a des activités telles que : l'activité antibactérienne, antifongique, antihelminthique ou vermifuge et antiseptique<sup>15-17</sup>. Elle est prescrite comme vermifuge, emménagogue, diurétique, stomachique, tonique, dépuratif, cholagogue, antidiabétique. L'armoise blanche est administrée également dans tous les refroidissements, elle est aussi utilisée contre les troubles hépatiques et les vertiges.<sup>2</sup>

En pharmacopée populaire, elle continue à occuper une place importante, elle est appliquée comme remède contre la toux, les troubles intestinaux, le rhume, la rougeole, les faiblesses musculaires, la goutte, les aphtes, les mycoses et contre les piqûres d'insectes et de scorpions.<sup>18</sup>

Ces vertus médicinales attribuées à la plante nous orientent sur la présence de principes actifs donc de molécules fiables appartenant à un pattern chimique constant.

## **II. Généralités sur les huiles essentielles**

### **II.1. Définition**

D'après les normes AFNOR,<sup>19</sup> les huiles essentielles sont des produits odorants et volatiles d'origine végétale, obtenues soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par expression du péricarpe frais, soit par distillation à sec. Mais cette définition est très restrictive et n'est pas toujours acceptée, car elle exclue d'une part les produits odorants d'origine animale et d'autre part les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction.<sup>20</sup>

On différencie entre les huiles essentielles, autant par leurs compositions chimiques que par leurs propriétés physico-chimiques.<sup>21</sup>

#### **a. La concrète**

Elle est obtenue à partir de l'extraction des matières végétales par un solvant volatil non aqueux, à chaud ou à froid<sup>20</sup>. En outre, les concrètes se présentent sous un aspect pâteux et coloré. Elles sont composées de plusieurs sous-produits, dont l'absolue, les cires, les tannins et les colorants.

#### **b. Pommade florale**

Elle est obtenue à partir de fleurs soit par la diffusion des constituants odorants des fleurs dans le corps gras « enflourage à chaud » soit par la diffusion ou l'immersion des fleurs dans le corps gras « enflourage à froid ».<sup>20</sup>

#### **c. L'absolue**

On épure les concrètes, les pommades florales ou les rétinoides par extraction à l'éthanol à température ambiante. Le glaçage des extraits alcooliques à basse température (8 à 15°C) durant quelques heures permet de filtrer et supprimer les cires. Le filtrat, dépouillé de l'alcool par évaporation sous vide ou par distillation, n'est autre que l'absolue de la concrète<sup>20</sup>.

#### **d. Les cires**

Elles sont composées de substances saponifiables (acides gras à longues chaînes) et insaponifiables (hydrocarbures à nombre impair de carbones rarement insaturés).<sup>20</sup> Elles représentent la fraction lourde de la concrète.

Les cires sont utilisées dans la savonnerie en raison de leur puissante note odorante et leur pouvoir conservateur.<sup>21</sup>

De ce fait, quand on examine une huile essentielle il faut considérer deux paramètres principaux : le matériel botanique et le mode d'extraction.

## **II.2. Répartition et localisation des huiles essentielles dans la plante**

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal avec des familles à haute teneur en matières odorantes. Elles peuvent être rencontrées dans tous les organes végétaux les fleurs, les fruits, les feuilles, les racines, les grains et les écorces.

Dans une même plante les essences peuvent être présentes à la fois dans différents organes avec une composition chimique différente, comme dans le cas de la feuille et la fleur du citronnier.<sup>22</sup> Dans les organes de la plante, les essences peuvent être localisées dans des sites sécréteurs spécialement différenciés et variables suivant les familles botaniques. Le plus souvent, celles-ci sont regroupées en poches chez les *Rutacées* et les *Myrtacées*, en canaux sécréteurs chez les *Apiécées* et les *Astéracées*, en poils sécréteurs chez les *Lamiacées*, ou en cellules à essence chez les *Lauracées* et les *Zingibéracées*.

Quantitativement, la teneur des plantes en huile essentielle est généralement faible; elle est de l'ordre de 1% avec quelques exceptions comme dans le cas du bouton floral du giroflier où le taux en huiles essentielles atteint 15%.<sup>23</sup>

Dans beaucoup de plantes aromatiques, les huiles essentielles sont localisées dans les poils glandulaires qui se développent à la surface des feuilles et autres organes des plantes. Ces poils pelletés contiennent une grande partie des huiles et sont désormais appelés "glandes".<sup>24</sup>

L'*A. herba-alba* est une plante médicinale contenant des sites exogènes (glandes, cellules épidermiques) et des sites endogènes (poches ou canaux). Les huiles essentielles sont présentes dans tous les organes à l'exception des racines, elles se séparent par synérèse, sous forme de petites gouttelettes qui confluent ensuite en plages plus ou moins étendues. Elles sont ensuite accumulées sous la cuticule, dans les glandes sécrétrices situées au niveau des deux épidermes, de la feuille et sur les tiges pendant la période de l'épanouissement des feuilles. Ainsi, la cuticule joue un rôle important dans le stockage des huiles essentielles.<sup>25</sup>

## **II.3. Composition chimique des extraits volatils**

Les huiles essentielles dépendent de leurs composants biochimiques. La complexité de chaque huile essentielle naturelle et pure (qui peut contenir jusqu'à 350 composants) explique la polyvalence d'action de la plupart d'entre elles.

Les principaux constituants sont les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques, les dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, acides, cétones), les dérivés aromatiques et les dérivés provenant des glucides.<sup>26, 27</sup>

Une huile essentielle est très fluctuante dans sa composition, car elle peut faire intervenir un grand nombre de paramètres d'ordre naturel ayant une origine intrinsèque (génétique, localisation, maturité...) ou extrinsèque (sol, climat, âge de la plante.....) et d'ordre technologique, lié au mode d'extraction du matériel végétal.

La composition d'une huile essentielle varie au sein d'un même genre, mais aussi dans une même espèce (cas de l'*A. herba-alba*). On parle alors de races chimiques ou chémotypes.

#### **II.4. Procédés d'obtention des huiles essentielles**

Plusieurs techniques d'extraction des huiles essentielles et des principes aromatiques végétaux sont à ce jour connues. Toutefois les normes liées à l'utilisation de ces essences limitent en général le choix de la méthode d'extraction. En effet, la localisation histologique des composés aromatiques dans le végétal ainsi que la destination finale du produit extrait peuvent orienter le choix technologique. Les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés les plus importantes des huiles essentielles notamment leur volatilité dans l'air et dans la vapeur d'eau et leur solubilité dans les solvants organiques.

##### **II.4.1. Procédés mettant en jeu la vapeur d'eau**

Ces procédés sont basés sur le fait que la plupart des composés odorants volatiles (huiles essentielles) sont susceptibles d'être entraînés par des vapeurs d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Ils ne sont donc ni retenus, ni solubles dans l'eau. Il existe deux types de procédés : l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation.

###### **a. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation est une technique basée sur le même principe que l'entraînement à la vapeur d'eau, seulement la matière végétale baigne dans l'eau. L'ensemble est porté à ébullition, la vapeur d'eau entraîne les éléments odorants et passe ensuite dans un système de refroidissement. Les vapeurs hétérogènes formées sont condensées et l'essence se sépare par différence de densité.

###### **b. Entraînement à la vapeur**

Pour ce type de distillation, le végétal n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur nécessaire à l'extraction arrive à l'intérieur de l'alambic par le fond et repart de manière homogène au

moyen d'un tube circulaire muni de nombreuses ouvertures. Notons toutefois que de nouvelles techniques éliminant les inconvénients dus à l'hydrodistillation (artéfacts, dégradation, temps trop long...) sont apparues il s'agit entre autres de la « superheated water extraction »,<sup>28</sup> l'hydrodistillation assistée par micro-onde (MWHD)<sup>28, 29</sup> ou encore la distillation assistée par induction directe.<sup>30</sup>

### **c. Extraction par micro-onde**

Le procédé d'extraction par micro-ondes consiste à extraire les solutés d'une matrice solide par un liquide qui doit être polaire, transparent et à haute constante diélectrique pour pouvoir absorber l'énergie micro-onde et la restituer sous forme de chaleur. Le chauffage étant assuré par irradiation micro-ondes. L'effet de ces dernières est double, d'une part, il y'a un phénomène de rotation des molécules qui a tendance à s'aligner avec le champ électrique des micro-ondes, il s'en suit un échauffement très rapide du milieu, d'autre part une migration des ions provoquent également un échauffement du milieu. Par conséquent, le chauffage par micro-onde se produit directement au cœur de la matière végétale et il présente la particularité d'être instantané.<sup>31, 32</sup>

## **II.4.2. Extraction par solvant organique**

Elle consiste à épuiser la matière végétale de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, elle est ensuite dépouillée du solvant par évaporation sous vide à 40°C afin d'éviter la dégradation thermique des molécules odorantes. Cette extraction conduit à l'obtention d'essences, concrètes ou oléorésines, de rétinoides et d'absolues.<sup>33</sup>

## **II.5. Activités antimicrobiennes**

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XXIème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues principalement à la fraction d'huile essentielle contenue dans les plantes.

### **II.5.1. Propriétés antimicrobiennes**

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier

de la nature de leurs composés volatils majeurs. Néanmoins, la composition de l'huile essentielle d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée... Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également.

Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudos mycélium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.<sup>34</sup>

- Chaque huile essentielle possède une activité spécifique variable selon les microorganismes et les conditions environnementales.
- Le seuil d'efficacité ou concentration minimale inhibitrice (CMI) est défini comme étant la plus faible concentration en huile capable d'inhiber toute croissance bactérienne.<sup>34</sup>

### **II.5.2. Mode d'action contre les bactéries**

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases :

- attaque de la membrane plasmique 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.

### **III. Oxydation et antioxydant**

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ces réactions en chaîne en réagissant avec les radicaux libres, annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se retrouvent principalement dans les familles des thiols et des phénols.<sup>35</sup>

Une déficience ou une absence de production d'enzymes antioxydantes entraîne un stress oxydatif pouvant endommager ou détruire les cellules. Le stress oxydatif a été mis en cause dans la pathogénèse de nombreuses maladies humaines.

### **III.1. Stress oxydatif**

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs.<sup>36</sup> Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire.<sup>37</sup>

La production des ERO est normale pour tous les organismes vivants et ne constitue pas en soi une situation de stress oxydant. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense contre les radicaux libres (ERO), la cellule dispose d'un système de détoxification comprenant des enzymes comme les superoxydes dismutases, les catalases, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et de petites molécules telles que la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, certains polyphénols et les huiles essentielles.... Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant ou par suite d'une surproduction des radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant».<sup>38</sup>

### **III.2. Les radicaux libres**

#### **III.2.1. Définition**

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif.<sup>39</sup>

L'oxygène indispensable à la vie, est un radical libre qui possède deux électrons non appariés. Ceci explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes.

Dans notre corps, la majorité des électrons existent par paires. Les électrons appariés sont tout à fait stables, mais sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, de métaux de transition ou au cours de réactions enzymatiques, il y a des sauts d'électrons sous l'effet d'une énergie incidente. Ce qui entraîne une instabilité et une réactivité plus forte des molécules.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est appelé **espèces réactives de l'oxygène ERO**.<sup>39-41</sup>

Cette appellation n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ).<sup>41</sup>

### **III.2.2. Principaux radicaux libres**

Les radicaux libres ne sont pas tous néfastes, ils sont même indispensables à la vie. Mais lorsqu'ils sont en excès, ils deviennent particulièrement dangereux et provoquent l'oxydation ; c'est "la rouille" de notre organisme.

- L'anion radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est le produit de la réaction de la molécule de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transfert d'électrons de la membrane mitochondriale ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus.
- Le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ) est issu de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques. C'est l'espèce chimique la plus réactive et elle joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique.
- Le radical peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ),
- Le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$  : produit par des systèmes enzymatique le NO synthase, est un vasodilatateur physiologique et joue le rôle de messenger interneuronal (médiation par les neurones). Il peut avoir un rôle néfaste.
- Le radical peroxyde d'azote ( $ONOO^{\bullet}$ ) est issu de la réaction entre  $O_2^{\bullet-}$  et  $NO^{\bullet}$ . Très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de crohn.
- L'oxygène singulet ( $O_2$ ) est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence musculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau.

### **III.2.3. Origine des radicaux**

La formation de radicaux libres dans l'organisme est constante et est indissociable de la vie dans une atmosphère oxydante, mais les excès dépendent de facteurs extérieurs. Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle que la mort cellulaire programmée ou apoptose. Toutefois, au contact entre

l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.<sup>38</sup>

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par des cellules phagocytaires activées.

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit l'oxydation des molécules comme les quinones dans l'organisme. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau des cytochromes. Les rayonnements et les particules inhalées (amiante, silice) sont capables de provoquer la formation des radicaux libres.<sup>38</sup>

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, c'est également le cas des antibiotiques et des anticancéreux.<sup>42</sup> L'infection au virus d'immunodéficience humaine (VIH) a pour effet d'accroître la production des radicaux libre dans l'organisme.<sup>43</sup>

Certaines maladies génétiques causent une surproduction d'ERO ou une efficacité réduite du système de défense. Une surproduction d'ERO a été observée lors des maladies d'Alzheimer et de Parkinson.<sup>44</sup>

### **III.3. Les conséquences du stress oxydant**

Nous rappelons que dans les systèmes vivants, les radicaux libres se forment constamment. Toutefois, lorsque la production dépasse la capacité antioxydante de l'organisme, ces espèces radicalaires attaquent les lipides, les protéines, les glucides et l'ADN, donc endommagent l'intégrité structurale et la fonction des membranes des cellules, les enzymes et le matériel génétique.<sup>44</sup>

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible de l'attaque par le radical hydroxyde, c'est la réaction de peroxydation lipidique. Les conséquences seront différentes ; l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées qui, captées par des macrophages, fermeront dès le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires. L'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.<sup>38, 45</sup>

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brin.<sup>42</sup> Ils inhibent la sécrétion d'insuline<sup>46</sup> modifiant les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines.<sup>47</sup>

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>•</sup>, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement de cétoaldéhyde.

Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine.

Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies : le cancer, la cataracte,<sup>48</sup> la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire, le vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer,<sup>49</sup> le rhumatisme, les maladies cardiovasculaires,<sup>38</sup> la maladie de Parkinson,<sup>50</sup> l'inflammation gastro-intestinale, l'ulcère,<sup>51</sup> et le vieillissement prématuré de la peau.<sup>52</sup>

### **III.4. les antioxydants**

Les antioxydants peuvent être définis comme des substances capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation des substrats biologiques,<sup>36</sup> ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs.<sup>39</sup>

Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que leur structure est relativement stable.<sup>39</sup>

Les antioxydants sont des groupes divers de produits chimiques qui peuvent être endogènes naturels ou synthétiques.

#### **III.4.1. Les antioxydants endogènes**

Ils peuvent se diviser en un système de défense primaire composé d'enzymes et de substances antioxydantes telles que :

- le superoxyde dismutase (SOD) qui diminue la durée de vie du radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ).
- le glutathion peroxydase qui détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.
- la catalase qui transforme le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en une simple molécule d'eau.
- les molécules piègeurs telles que : les protéines à groupement thiols, l'acide urique, ubiquinone ...etc.

Et en un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytique, des phospholipases et des ADN endonucleases....<sup>53</sup>

### **III.4.2. Les antioxydants naturels**

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants naturels ou diététiques in vivo comme la vitamine E, la vitamine C, la vitamine A, les caroténoïdes, les acides phénoliques, les dérivés de sélénium, les flavonoïdes, les œstrogènes, l'albumine, l'acide urique,... Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont la capacité de lier les acides gras libres.<sup>54</sup>

**La vitamine E :** Elle empêche les radicaux libres d'attaquer les graisses des membranes cellulaires et d'oxyder la vitamine A. Elle joue un rôle préventif dans le développement des cancers et sur le vieillissement.<sup>55</sup> Cette vitamine limite les effets néfastes du cholestérol et donc prévient de l'athérosclérose.<sup>56</sup>

La vitamine E se trouve dans des huiles végétales principalement l'huile de germe de blé et de tournesol, les huiles d'olive, d'arachide, de carthame, de sésame, de maïs et de soja sont aussi de bonnes sources ainsi que les céréales, les fruits oléagineux et les graines.<sup>39</sup>

**La vitamine C** est un antioxydant puissant qui permet la régénération de la vitamine E et du glutathion nécessaire à l'enzyme glutathionne peroxydase pour arrêter les réactions en chaîne des radicaux libres.<sup>57</sup> Elle est largement répandue dans les fruits et légumes frais : le citron, le kiwi, l'orange, le pamplemousse, la mandarine, le melon, la fraise, la groseille, les feuilles vertes, le poivron rouge et vert, le chou...<sup>39</sup>

**Les caroténoïdes** (précurseur de la vitamine A) sont des antioxydants, qui sont aussi impliqués dans la vision nocturne, la croissance, la différenciation cellulaire et la reproduction ; ils empêchent les dommages génétiques et protègent contre les dommages

oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication. Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de certains cancers, tels que celui de la prostate, du sein, de l'appareil digestif et des poumons.<sup>57</sup> Ils se trouvent en abondance dans les fruits, les légumes et également dans le lait.

**Le Sélénium :** Il entre dans la composition de la glutathionne peroxydase. Il protège les cellules de l'oxydation et est nécessaire pour le métabolisme de l'iode. Il se trouve dans les œufs, les fromages, la levure alimentaire, les céréales complètes, les fruits oléagineux (principalement la noix du Brésil), les graines...

**Le Zinc :** Il est essentiel pour la synthèse de l'ADN, des protéines et de l'insuline ainsi que pour le métabolisme des acides gras polyinsaturés. Il est nécessaire pour la reproduction, la croissance, la maturation sexuelle, la cicatrisation, et protège contre les radicaux libres. On le rencontre dans les germes de blé, les graines, les fruits oléagineux, les fromages, les haricots, les légumes, les céréales complètes...

**Les phytonutriments :** Ce ne sont ni des vitamines, ni des minéraux, mais se trouvent naturellement dans les aliments du règne végétal. Ils ont été découverts ces dernières années. De nombreuses études sont faites à leur sujet et les articles scientifiques ne cessent d'être publiés. Ils sont reconnus pour être des antioxydants puissants. Ils protègent principalement contre le cancer, les maladies cardiovasculaires et le vieillissement prématuré. Ils réduisent aussi la réponse inflammatoire et augmentent notre résistance aux corps étrangers. Les plus connus sont les polyphénols végétaux qui regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins, les acides phénoliques (acide férulique, acide cafféique, acide chlorogénique, acide vanillique, acide gallique...), les catéchins et les terpènes,<sup>58</sup>

Ainsi, il faut privilégier la consommation des légumes frais, fruits mûrs, et plantes aromatiques de qualité.

### **III.4.3. Les antioxydants synthétiques**

Bien qu'il existe des composés antioxydants synthétiques, comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), qui sont couramment utilisés dans les aliments, il a été rapporté que ces composés ont des effets secondaires.<sup>59, 60</sup>

#### **IV. Travaux antérieurs sur la composition chimique, l'étude antimicrobienne et antioxydante de L'A. herba-alba**

Les études entreprises jusqu'à présent sur l'A. *herba alba* sont plutôt d'intérêt chimiotaxonomique. Elles concernent la composition des huiles essentielles obtenues par entraînement à la vapeur, l'isolation et l'élucidation de la structure des lactones sesquitérpeniques et des flavonoïdes qu'elle contient, en vue d'une classification botanique. Ces divers travaux concernent des plantes (de l'Irak, du Liban, de la Jordanie, de l'Espagne, de la Palestine, de l'Egypte, de l'Algérie, de la Tunisie, de la Lybie et du Maroc). Nous les présentons par ordre chronologique.

- **Grimal (1904), Jeancard et Satie (1904) et Schimmel et al (1909)** publient les premiers travaux effectués sur l'huile essentielle de l'A.*herba-alba* d'Algérie et d'Egypte en étudiant les propriétés physico-chimiques et la composition chimique. Le camphène, le cinéole, le camphre, la thujone et l'alcool sont les composés identifiés et l'huile est caractérisée par la forte odeur de la thujone.<sup>61, 62</sup>
- **Bermudez R, Suarez Y. (1914)** étudie la composition chimiques de 40 différentes plantes d'Espagne dont l'A.*herba-alba* et confirme les constituants déjà identifiés ci-dessus<sup>63</sup>
- **Roure-Bertrand. (1914-1920)** a voulu évaluer les propriétés physico-chimiques et la composition de l'A.*herba-alba* d'Algérie au cours du temps ; il déclare que l'énorme changement est certainement dû aux conditions climatiques et confirme la présence du cinéole, du camphre et du menthol.<sup>64</sup>
- **Alinari Ernesto. (1922)** détermine approximativement le pourcentage du cinéole contenu dans l'A.*herba-alba* originaire d'Algérie (6,7%) sans pouvoir confirmer la présence du camphène et du camphre.<sup>65</sup> En (1924) il met en évidence la présence du camphre et de l' $\alpha$ -thujone.<sup>66</sup>
- **Maugini .(1930)** étudie six différentes plantes de Cyrenaica dont l'A.*herba-alba* et confirme la présence de 6,7% de cinéole.<sup>67</sup>

- **Callegari. (1939)** signale l'effet vermifuge du principe amer de l'huile essentielle de l'*A.herba-alba* de Lybie suite à une étude pharmacologique.<sup>68</sup>
- **Fesneau. (1950)** identifie des cétones (11%), des phénols (10%) contenant le furfural, le pentanol, l'acétate de pentyle, le cinéole, la thujone, et les phénols.<sup>69</sup>
- **Cohen et al. (1971)** publient les premiers résultats sur certains composants de l'huile essentielle de l'*A.herba-alba* du Maroc isolés et identifiés par la chromatographie en phase gazeuse et par les techniques spectroscopiques. L'essence est constituée de  $\beta$ -thujone comme constituant principal, de cinéole, de p-cymène, d' $\alpha$ -terpinéol et de fenchol.<sup>70</sup>
- **Sanchez et al. (1978)** étudient la séparation et l'identification des composants d'*A.herba-alba* d'Espagne par chromatographie. Elle contient : 32.1% d'acide C<sub>16</sub>-C<sub>32</sub> saturés (35,2% C<sub>28</sub> et 26,5% C<sub>30</sub>), 23.2% d'hydrocarbures C<sub>21</sub>-C<sub>31</sub> (67,7% C<sub>29</sub> et 24,2% C<sub>31</sub>), 27,1% d'esters (acides C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>20</sub>) et 16.96% d'alcane C<sub>16</sub>-C<sub>26</sub> (24,71 C<sub>16</sub>, 10,34% C<sub>20</sub>, 32,88% C<sub>22</sub> et 22,96% C<sub>24</sub>).<sup>71</sup>
- **Yasef et al. (1979)** ont étudié l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de L'*A.herba-alba* du Moyen Orient contre certaines bactéries à gram-positif et à gram-négatif. L'huile essentielle a été fractionnée ensuite par chromatographie sur colonne et ces fractions ont été testées pour leur activité antibactérienne. Le composant principal de la fraction la plus active étant le santalina alcool.<sup>15</sup>
- **Khafadji et al. (1979)** identifient à partir de la partie volatile par GC/MS quatorze constituants : p-cymène, 1-méthyle-4-isopropenylbenzène,  $\alpha$ -copaène, aromadendrane,  $\alpha$ -guaïène,  $\beta$ -bisabolène,  $\gamma$ -cadinène, calamlénène, calacorène, cadalène, n-heptadécane, n-octadécane, n-eicosane et  $\alpha$ -curcumène.<sup>16</sup>
- **Benjlali et al. (1980)** rapportent pour la première fois les résultats de l'étude qualitative par GC/MS de 48 échantillons d'*A. herba alba* provenant de différentes régions du Maroc .Ils ont identifié 16 composés terpéniques et 3 composés cétoniques qui représentent 60-80% de la composition totale de l'huile essentielle classés en 4 chémotypes  $\alpha$ - thujone – camphre, camphre,  $\alpha$ - thujone,  $\beta$ - thujone.<sup>11</sup>
- **Segal et al. (1980)** ont purifié à partir de l'*A. herba-alba* et identifié par chromatographie sur couche mince, les méthodes spectrales, et la polarimétrie des alcools monoterpéniques irréguliers artemisia alcool (5%), santoline alcool (10%), yomogi alcool (6%), et lyratol (12%).<sup>72</sup>

- **Hurabielle et al. (1981)** identifient quinze constituants : yomogi alcool, p-cymène, 1,8-cinéole, iso-artémisia,  $\alpha$ -thujone,  $\beta$ -thujone, chrysanthénone, camphre, bornéol, terpinène-4-ol, verbénone, thujanol, bornyl acétate, carvyl propionate et caryophyllène époxyde dans l'huile essentielle d'*A. herba-alba*; un nouveau chémotype a été signalé 1,8-cinéole-chrysanthénone-camphre. Par la suite, en 1982, ces auteurs caractérisent sur un autre peuplement du Maroc, un autre chémotype à chrysanthénone.<sup>73</sup>
- **Lemberg. (1982)** en effectuant des études analytiques très poussées sur les mêmes échantillons du Maroc, identifie 25 nouveaux constituants. Il constate que la composition de l'huile est fortement influencée par la période et le lieu de végétation de la plante et préconise pour sa cueillette la période comprise entre juin et octobre.<sup>13</sup>
- **Benjilali et al. (1980)** en étudiant par la même technique que précédemment, des échantillons récoltés de 11 régions marocaines, arrivent à identifier 32 constituants et distinguer deux nouveaux chémotypes: chrysanthényle acétate et davanone.<sup>26</sup>
- **Villar et al (1983)** identifient 25 composés dans l'huile essentielle d'*A. herba-alba* d'Espagne par GC en utilisant deux colonnes de polarités différentes Carbowax 20M et OV-17. Les fractions des composés hydrocarbonés et oxygénés ont été séparées sur des plaques de gel de silice G par C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-EtOAc et mis en évidence par la vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les composés majoritaires sont le camphre et l' $\alpha$ -terpineol.<sup>74</sup>
- **Feuerstein et al. (1986)** réalisent une étude similaire pour différentes populations du Negev et du Sinai par GC et GC/MS ou par isolation de composés purs. 41 constituants ont été identifiés. Le 1,8- cinéol apparaît être le constituant majoritaire pour 3 régions sur 5 étudiées, les 2 autres sont dominées par le cis- chrysanthénol et l'acétate de cis- chrysanthényle.<sup>75</sup>
- **Benjilali et al. (1986)** ont comparé le pouvoir antiseptique de différentes huiles essentielles dont l'*A. herba-alba* et ont mis en évidence une activité contre certaines moisissures.<sup>76</sup>
- **Ségal et al. (1987)** étudient la composition de l'huile essentielle et la composition des lactones sesquiterpéniques des feuilles et des tiges de 5 peuplements de cette plante dans le sud de la Palestine par GC/MS et identifient des alcools monoterpéniques irréguliers. Ils définissent ainsi 2 chémotypes, à cinéol - thujone - camphre et à dérivés du pinane.<sup>77</sup>

- **Yasphe et al. (1987)** étudient la composition chimique de l'huile essentielle de la plante récoltée sur différentes surfaces de Palestine; 14 composés à différents chémotypes ont été identifiés, un type à cinéol, un à monoterpènes irréguliers, un type à bornane, un aux dérivés du pinane et un à l' $\alpha$ -thujone. Les huiles essentielles ont été testées pour déterminer leurs activités antibactériennes et antispasmodiques. Toutes les huiles présentent une activité antibactérienne à une concentration de 1-2 mg/mL. Toutes les huiles essentielles testées ont montré des effets antispasmodiques.<sup>78</sup>
- **Feuerstein et al. (1988)** identifient plus de 30 composés dans les huiles essentielles de différentes populations d'Armoise blanche d'Espagne par GC/MS, le camphre et le 1,8- cinéol sont les plus prépondérants.<sup>79</sup>
- **Mahmoud et al. (1988)** ont révélé que les alcools monoterpéniques ( $\alpha$ -terpinéol, linalool, artemisia alcool, santalina alcool et coumarine) sont doués d'activité antimicrobienne. Ces mêmes auteurs ont montré que l'effet anti-spasmodique de l'huile essentielle et de 100 fois à 1000 fois plus important que l'effet bactéricide.<sup>80</sup>
- **El-Sayed et al. (1990)** ont procédé à une étude comparative des huiles essentielles d'*A.herba-alba* d'Egypte. Elles sont caractérisées par un fort pourcentage en artemisia kétone identifié pour la première fois (32-49%) et la présence de davanone, la non présence du camphène et/ou du sabinène les distingue des huiles des autres *A.herba-alba* étudiées jusqu'à présent. Ainsi un nouveau chémotype à artemisia kétone est suggéré.<sup>81</sup>
- **Ouyahya et al. (1990)** identifient à partir de l'huile essentielle d'*A. herba-alba* marocaine analysée par GC/MS, 29 composés. L'huile a été caractérisée par un contenu élevé en  $\alpha$ -thujone (24%) et  $\beta$ -thujone (20%).<sup>82</sup>
- **Boutekdjiret et al. (1992)** identifient 30 composés cités déjà dans la bibliographie dont 5 constituants nouvellement identifiés lors de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles d'Armoise blanche d'Algérie par GC/MS. L'étude de l'activité antimicrobienne sur des micro-organismes a montré une bonne activité inhibitrice, donc un pouvoir antibactérien et anti fongique considérable.<sup>83</sup>
- **Tantaoui et al (1992), Lima et al (1992, 1993, 1995), Bourrel et al (1995), Cherchari et al (1994)** ont testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* sur certains micro-organismes pathogènes et non pathogènes

et ont montré que cette plante possède des propriétés antimicrobiennes et antifongiques non négligeables.<sup>84-89</sup>

- **Vernin et al. (1994)** identifient dix cis-chrysanthenyl esters parmi plus de 300 composés séparés par GC/MS de l'*A. herba-alba* d'Algérie.<sup>90</sup> L'objectif de **Vernin et al. (1995)** était de déterminer la composition de plusieurs populations d'*A. herba-alba* à différents stades de développement et de les comparer à celles décrites précédemment, afin de savoir à quels chémotype ils appartiennent. Près d'une centaine ont été identifiés par GC/MS sur des colonnes non polaires et polaires. Les huiles sont caractérisées par un pourcentage élevé de camphre (19-48%), de 1,8-cinéole (5-20%), de chrysanthénone (5-22.5%), d' $\alpha$ -thujone (1.0-26.7%), de  $\beta$ -thujone (1.65-9.3%), et le camphène (1.7-7.9%). La présence d'esters de nombreux chrysanthenyles caractérisent d'autres huiles. Les huiles appartiennent au chémotype camphre/thujones/ chrysanthénone.<sup>91</sup>
- **Marrif et al. (1995)** ont révélé que l'extrait d'*A. herba-alba* possède relativement une faible activité antibactérienne et pratiquement peu ou pas d'activité inhibitrice contre les levures.<sup>92</sup>
- **Cherchari et al. (1996)**. L'activité antimicrobienne in vitro de l'*A. herba-alba* Asso a été testée sur différents microorganismes. L'huile a montré une action très forte contre le Staphylococcus, le Candida et le Microsporum. Par contre l'action inhibitrice de l'huile est faible par rapport à l'entérobactérie.<sup>93</sup>
- **Sallal et al. (1996)** ont évalué l'activité anti-venin possible de 12 extraits aqueux de plantes médicinales utilisées traditionnellement en Jordanie pour l'inhibition chez l'homme de venins de serpents et scorpions. Parmi les plantes testées, 9 extraits ont pu inhiber l'activité hémolytique des deux venins. L'extrait de l'*A. herba-alba* a donné 100% d'inhibition.<sup>94</sup>
- **Vernin et al. (1998)** dans le prolongement de leurs travaux antérieurs sur l'*A. herba alba* Asso d'Algérie, ils ont comparé les résultats de la composition chimique de l'extrait d'éther de pétrole (non polaire) et l'éthanol (polaire) avec ceux de l'huile essentielles par l'analyse GC / MS. Les constituants les plus importants de l'extrait non polaires. sont le camphre (30%), l'1,8-cinéole (12,5%), le camphène (3%), l' $\alpha$ -thujone (4%), la  $\beta$ -thujone (16%), le bornéol (3,6%) et le chrysanthénone (0,32%). La fraction lourde de cet extrait, contient des alcanes linéaires (C<sub>22</sub> à C<sub>32</sub>), des alcènes (C<sub>23</sub>, C<sub>24</sub> et C<sub>25</sub>), des acides gras saturés (C<sub>16</sub>) et insaturés. (C<sub>18</sub>) et l'octadécanoate.

L'extrait d'éthanol contient une fraction cétonique similaire à celle constatée dans l'extrait non polaire et dans l'huile essentielle. La fraction lourde contient des sesquiterpénoïde-lactones.<sup>95</sup>

- **Benmansour et al. (1999)** identifient 12 composés par GC/MS dans différentes régions de Tlemcen. Le camphre apparaît être le constituant majoritaire dans toute les stations étudiées.<sup>8</sup>
- **Salido et al. (2001)** étudient la composition de l'huile de la partie aérienne de l'*A.herba-alba* originaire du sud de l'Espagne par GC/MS. Parmi les 65 constituants étudiés (représentant 93,6% de la composition de l'huile), 61 ont été identifiés représentant (90,3%) de la composition totale. Les principaux constituants détectés sont la davanone (18,1%), le p-cymène (13,5%), le 1,8-cinéole (10,2%), la chrysanthénone (6,7%), l'acétate de cis-chrysanthényle (5,6%), l' $\alpha$ -terpinène (5,5%), le myrcène (5,1%) et le camphre (4,0%). Les échantillons d'huile étudiés ne contiennent pas de thujones, contrairement à la plupart des huiles de l'*A. herba alba* décrites dans la littérature.<sup>96</sup>
- **Hifnawy et al. (2001)** ont testé l'activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* et l'activité insecticide contre la mouche domestique *Musca domestica* L. L'huile d'*A.herba-alba* a montré une activité antibactérienne non significative contre les deux espèces bactériennes testées.<sup>97</sup>
- **Benmansour et al. (2001)** révèlent que toutes les huiles d'*A.herba-alba* étudiées possèdent une activité antimicrobienne et antifongique importante.<sup>98</sup>
- **Fleisher et al. (2002)** montrent que la population de l'*A. herba-alba* au Néguev et au Sinaï consiste en un nombre beaucoup plus grand de chémovariétés inégalement réparties dans différentes stations géographiques, néanmoins aucune relation claire entre le type de plante et les conditions environnementales n'ont pu être établies. Une étude systématique détaillée des huiles essentielles d'*A.herba-alba* a mené à cinq chemotypes relativement rares de *A. herba alba* obtenus par analyse en GC et GC/MS. Les principaux chemotypes sont: le 1,8 cinéole (10,8%)- $\alpha$ -thujone (40,9%)- $\beta$ -thujone (34,9%); le 1,8 cinéole (26,0%)-camphre (42,1%) ; le 1,8 cinéole (26,6%)- $\beta$ -thuyone (44,0%); l'acétate de cis-chrysanthényle (8,9%)-cis-chrysanthénol (30,0%); le cis-chrysanthénol (6,8%)-cis-chrysanthényle acéate (69,0%).<sup>99</sup>
- **Salido et al. (2004)** étudient les huiles essentielles de seize plantes individuelles de l'*A.herba-alba* provenant de quatre lieux différents du sud de l'Espagne par GC et

GC/MS en combinaison avec les indices de rétention. Parmi les 60 constituants identifiés qui représentent 80.6-95.0% de l'huile totale, 33 ont été signalés pour la première fois dans l'*A. herba-alba* espagnol et 17 n'ont pas été décrits dans l'huile de l'*A. herba-alba*. Quatre groupes d'huiles essentielles ont montré des composants uniques avec des pourcentages de près de 30% ou plus: davanone, 1,8-cinéole, chrysanthénone et cis-chrysanthénol. Deux types d'huile en outre montrent le p-cymène et le cis-chrysanthényl acétate comme des éléments majeurs. Ces chémotypes ont déjà été signalés dans l'*A. herba-alba* par contre le chémotype à p-cymène est décrit pour la première fois dans l'*A. herba-alba*.<sup>100</sup>

- **Kim et al. (2004)** isolent et identifient par comparaison des propriétés physiques et des données spectroscopiques (MS, RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and 2D NMR) à celles d'échantillons authentiques et des données déclarées huit composés polyphénoliques. Il s'agit notamment de l'acide chlorogénique, 4,5-O-acide dicaffeoylquinic, isofraxidin 7-O-β-D-glucopyranoside, 4-O-β-D-acide glucopyranosylcaféic, la rutine, schaftoside, isoschaftoside, et vicenin-2.<sup>101</sup>
- **Dahmani-Hamzaoui et al. (2005)** étudient la composition chimique de l'huile essentielle d'*A. herba-alba* de la région de Djelfa obtenu par hydrodistillation. 104 constituants ont été identifiés par GC et GC/MS dont 42 pour la première dans les huiles essentielles d'*A. herba-alba*. L'essence présente des constituants majoritaires tels que la davanone (36,1%) et deux de ses isomères qui sont respectivement à (0,6%) et à (1,5%), le davana éther (8,8%) et deux de ses isomères qui sont respectivement à (1,7%) et à (1,8%), le 1,8-cinéol (5,8%), le camphre (5,6%), l'artedouglacia oxyde A (1,7%), et l'artedouglacia oxyde C (1,1%). L'huile est à chémotype davanone; signalé pour la première fois dans les huiles essentielles algériennes.<sup>102</sup>
- **Salah Sam Medhat et al. (2005)** testent les extraits aqueux, de l'éthanol et de l'acétate d'éthyle d'*A. herba-alba* utilisés traditionnellement contre les troubles neurologiques comme la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie et les troubles affectifs comme la dépression pour l'inhibition de l'acétylcholinestérase et l'affinité pour le GABA-site benzodiazépine et pour le transporteur de la sérotonine. L'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. herba-alba* montre une activité faible de l'acétylcholinestérase. L'extrait éthanolique a une bonne affinité pour le site récepteur GABA-benzodiazépine par contre aucune activité n'est signalée dans le dosage du transporteur de la sérotonine.<sup>103</sup>

- **Djeridane et al. (2006)** évaluent la teneur totale en flavonoïdes phénoliques de 11 plantes médicinales d'Algérie et déterminent si ces composés ont une capacité antioxydante de propagation vers les radicaux libres. Le contenu phénolique total dans l'*A. herba-alba*, analysé à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu's est de 13,06 mg/g, exprimée en équivalent d'acide gallique (GAE). Le contenu total en flavonoïdes, détecté en utilisant 2% de chlorure d'aluminium, est de 11,31mg/g en équivalent de rutine (RE). La capacité de l'activité antioxydante évaluée par l'ion radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>·+</sup>) est de 11,60 mmol/g en équivalent de Trolox. Ces résultats suggèrent que les composés phénoliques dans la plante fournissent une importante activité antioxydante.<sup>104</sup>
- **Saleh et al. (2006)** révèlent que le pouvoir antifongique d'*A. herba alba* est associé à deux composés volatils (carvone et pipéritone) isolés et identifiés. L'activité antifongique a été mesurée par rapport à *Penicillium citrinum* (ATCC 10499) et *Mucora rouxii* (ATCC 24905). Elle a été estimée à 5µg/mL, 2µg/mL contre *citrinum Penicillium* et 7µg/mL, à 1,5µg/mL contre *Mucora rouxii*, carvone et pipéritone, respectivement.<sup>105</sup>
- **Hudaib et al. (2006)** étudient la composition de l'huile essentielle hydrodistillée à partir des parties aériennes de l'*A. herba-alba* Asso de Jordanie par GC et GC/MS. Quarante constituants correspondant à 95,3% de l'huile ont été identifiés, dont (39,3% de l'huile) en monoterpènes oxygénés, avec (24,7%) en  $\alpha$ - thujone et  $\beta$ -thujone. Les autres principaux éléments identifiés sont: le santolina alcool (13,0%), l'artémisia kétone (12,4%), le trans-sabinyl acétate (5,4%), le D-germacrène (4,6%), l' $\alpha$ -eudesmol (4,2%) et l'acétate de caryophyllène (5,7%).<sup>106</sup>
- **Dob et al. (2006)** évaluent la composition chimique de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation. à partir des parties aériennes de l'*A. herba-alba* Asso de la région de M'sila (Algérie) par GC et GC / MS Soixante-huit composés s'élevant à 94,7% de l'huile ont été identifiés. Le camphre (19,4%), le trans-pinocarvéol (16,9%), le chrysanthénone (15,8%) et la  $\beta$ -thujone (15%) sont les principaux constituants.<sup>107</sup>
- **Soliman et al. (2007)** testent l'effet insecticide des huiles essentielles d'Egypte contre trois organismes nuisibles le Bemisia tabaci (Gennadius), l'Aphis gossypii (Glover) et le Thrips tabaci (Lindman). Les résultats ont montré que la CL50 est de 0,042% pour les œufs et 0,074% pour les stades immatures de B. tabaci. Aussi, l'huile a une toxicité élevée sur A. gossypii avec une CL50 de 0,023%. T. tabaci a été sensible (CL50

0,038 %). Ces huiles ont été efficaces pour contrôler les insectes testés sur des plantes de concombre à effet de serre. Ce traitement a causé 85.97% de destructions dans la population de *B. tabaci*, 90,44% pour *Aphis gossypii* et 87,26% pour *tabaci T*. L'analyse de l'huile essentielle d'*A herba-alba* révèle la présence d'hydrocarbures terpéniques, de terpènes oxygénés, d'hydrocarbures sesquiterpéniques et de sesquiterpènes oxygénés représentés respectivement par 16,38%, 21,61%, 21,53% et 19,32% de la teneur en huile.<sup>108</sup>

- **Giordani et al. (2008)** étudient la composition de l'huile essentielle d'*A.herba alba* d'Algérie et son activité antifongique contre *Candida albicans*. 19 composés ont été identifiés. Les composés prédominants sont le camphre (31,95%); le safranal (24,75%) et l' $\alpha$ - thujone (10,21%) ainsi un nouveau chémotype est mis en évidence ; c'est le camphre-safranal. La concentration minimale inhibitrice (CMI) déterminée par la méthode de dilution est de 5,615 $\mu$ g/mL.<sup>109</sup>
- **Haouari et al. (2009)** déterminent la composition chimique de 18 échantillons d'*A.herba-alba* du sud de la Tunisie obtenus par hydrodistillation. 75 constituants sont identifiés par GC et GC/MS pour la première fois dans les huiles essentielles d'armoise blanche de Tunisie qui représente 93,5% de l'huile totale. Les huiles contiennent 10 composants avec des pourcentages plus élevés que 10%. Les principaux composants sont le cinéole, les thujones, la chrysanthénone, le camphre, le bornéol, le chrysanthényl acétate, le sabinyl acétate, l'éther davanique et la davanone. Les monoterpènes prédominent dans douze échantillons ; les sesquiterpènes sont majeurs dans trois des 18 échantillons et les trois derniers échantillons ont à peu près le même pourcentage de monoterpènes et sesquiterpènes. Les compositions chimiques ont révélé que dix échantillons ont des compositions similaires à celles des autres huiles essentielles d'*A. herba-alba* analysées dans d'autres pays. Les huit autres échantillons avaient un chémotype pour la première fois (thujone-acétate de sabinyl).<sup>110</sup>

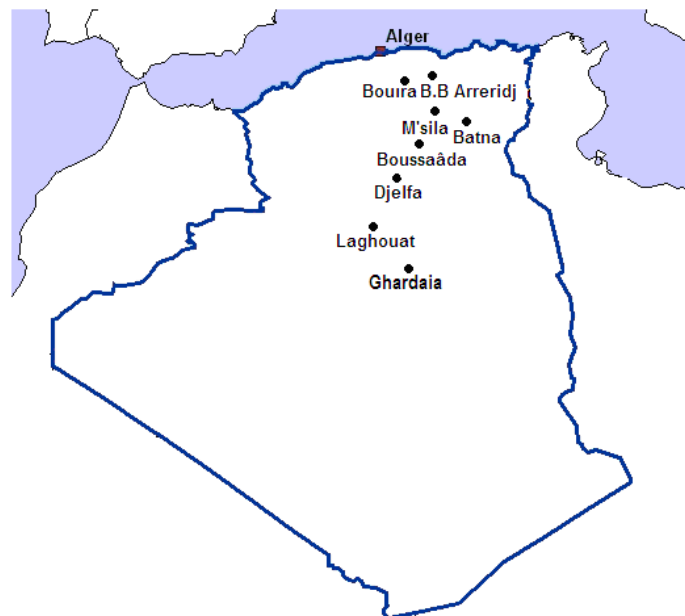
# *Chapitre II*

## **Echantillonnage et extraction des huiles essentielles**

Toutes les études publiées sur l'analyse des huiles essentielles, ont souligné l'importance de l'échantillonnage et du mode d'extraction sur la qualité de l'essence. En effet, celle-ci reste dépendante de nombreux facteurs tels que l'origine de la plante, sa maturité, la nature du sol, la situation géographique, l'ensoleillement, la pluviométrie...<sup>11, 13, 26</sup>

Les huiles essentielles de l'*A. herba-alba* ont déjà fait l'objet de recherches dans divers pays du bassin méditerranéen et en Algérie. Il en ressort, une grande variabilité dans la composition chimique.<sup>11, 13, 26, 61-110</sup>

Les échantillons d'Armoises blanches étudiés sont originaires des hauts plateaux et du sud Algériens : Batna, Bordj Bou Arreridj, Bordj Ghédir et Draâ Ech Chih (voisins de Bordj Bou Arreridj), Djelfa, Boussaâda, Roumana et Medjedel (près de Boussaâda), M'Sila, Ghardaïa et Laghouat.



### **Régions d'échantillonnages**

Les hauts plateaux et l'Atlas saharien s'étendent en diagonale depuis la frontière marocaine jusqu'au Nord-Est de l'Algérie. Ces steppes sont délimitées au Sud par une barrière montagneuse (l'Atlas saharien). D'Ouest en Est se succèdent les monts des Ouled Nail (Djelfa, M'sila et Boussaâda) et des Aurès (Batna) qui culminent à plus de 2 300 m. Au pied de ces montagnes se trouve un chapelet d'oasis qui marquent le seuil du Sahara : Laghouat et Ghardaïa, plus au Sud, dans la vallée du M'zab.

Le climat est de type méditerranéen sur toute la frange nord qui englobe le littoral et l'Atlas tellien (étés chauds et secs, hivers humides et frais), semi-aride sur les hauts plateaux au

centre du pays, et désertique dès que l'on franchit la chaîne de l'Atlas saharien. Les écarts de température dans une même journée peuvent être considérables, c'est le cas dans le Sahara où le mercure peut osciller d'un extrême à l'autre en l'espace de quelques heures seulement (au-delà de 40°C le jour, au-dessous de 5°C la nuit).

Situation géographique et climatiques des régions d'échantillonnage d'*A. herba-alba* étudiées

Région	Position	Climat	Température Janvier/Juillet	Pluviométrie (mm/an)	Altitude (m)
B.B Arreridj Draâ Ech Chih à 13km Bordj Ghédir à 25km	240km à l'est d'Alger	Été très chaud et hiver très froid	-3°C/40°C	300-700	302 - 1885
Djelfa	290 km au sud d'Alger	Été très chaud et sec, hiver froid et rigoureux	-4°C/35°C	308	1140
M'sila	248 km au sud d'Alger	Semi-saharien été chaud et hiver froid et sec	-4°C/35°C	-	470
Ghardaïa	600 km au sud d'Alger	Été torride et hiver froid	9,2°C/36,3- 47°C	13 - 68	500
Batna	425 km au sud-est d'Alger	Semi-aride été chaud et sec hiver froid glacial	-4°C /35°C	210	980
Boussaâda Roumana à 10km Medjedel 45km	245km au Sud d'Alger	été chaud et hiver froid et sec	-4°C/35°C	-	461
Laghouat	400 km au sud d'Alger	Été chaud torride et hiver froid	2C° /40°C	107	750

## I. Résultats et discussion

### 1.1. Détermination de la durée d'extraction par hydrodistillation

Pour déterminer la durée d'extraction maximale des huiles essentielles, nous avons procédé à l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle des échantillons d'*A. herba-alba* d'un même lot, en utilisant pour chacun des essais des durées de 5 min à 5 h (voir les détails dans la partie expérimentale de ce chapitre : EIIa, EIIb).

Les résultats montrent que le rendement en huile essentielle est maximal pour une durée d'extraction voisine de 2 heures. Cette dernière assure certainement le meilleur contact

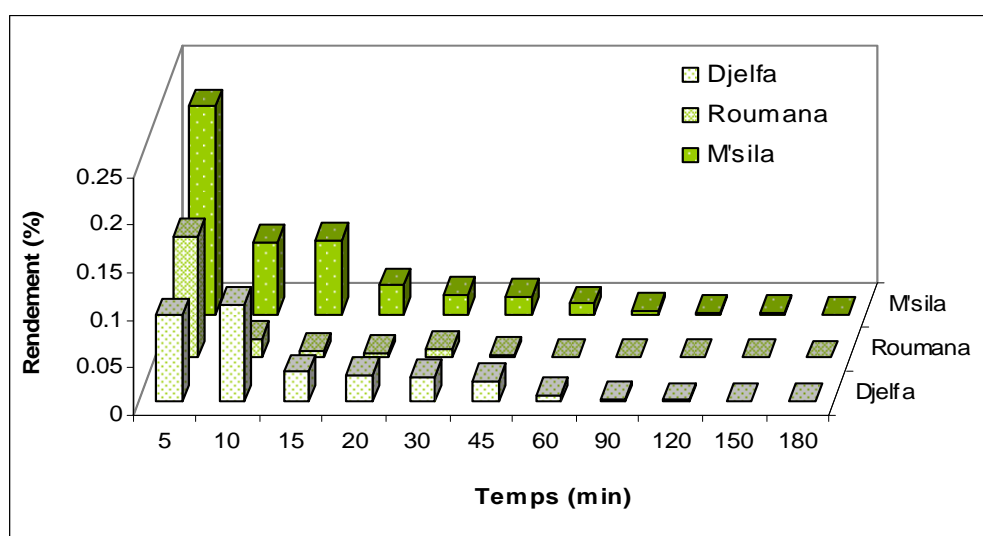
entre la vapeur et la matière végétale (tableau 1). En effet, au-delà de cette durée, le rendement de l'huile essentielle devient négligeable (figure 1).

La plus grande quantité d'huile est récupérée durant les cinq premières minutes pour les huiles de Roumana (0,128%) et de M'sila (0,218%) puis elle diminue progressivement. Par contre pour l'huile de Djelfa la plus grande quantité (0,102%) est obtenue après dix minutes. L'huile de M'sila, contrairement aux autres essences présente un palier entre 5 min et 10 min, elle varie ensuite de la même manière que les autres huiles essentielles (figure 1).

**Tableau 1.** Variation du rendement\* en fonction du temps

Temps (min)	Roumana		Djelfa		Medjedel	
	R% différentiel	R % cumulé	R% différentiel	R % cumulé	R% différentiel	R % cumulé
5	0,128	0,128	0,091	0,091	0,218	0,218
10	0,020	0,148	0,102	0,193	0,076	0,294
15	0,008	0,156	0,032	0,225	0,077	0,371
20	0,005	0,161	0,029	0,254	0,030	0,392
30	0,010	0,171	0,026	0,280	0,021	0,401
45	0,004	0,175	0,022	0,302	0,019	0,422
60	0,001	0,176	0,007	0,309	0,011	0,441
90	0,001	0,177	0,004	0,313	0,004	0,452
120	0,001	0,178	0,002	0,315	0,001	0,453
150	0,001	0,179	0,001	0,316	0,001	0,454
180	0,000	0,179	0,001	0,318	0,000	0,454
210	0,000	0,179	0,000	0,318	0,000	0,454
250	0,000	0,179	0,000	0,318	0,000	0,454

\*  $R\% = m_1/m_2 \times 100$  ;  $m_1$  : masse de l'essence extraite ;  $m_2$  : masse initiale du végétal sec



**Figure 1.** Variation du rendement d'huile essentielle au cours du temps

## I.2. Détermination des conditions d'extraction par micro-onde

Dans le but de déterminer les conditions optimales d'extraction des huiles essentielles, nous avons procédé à l'extraction des échantillons d'*A.herba-alba* d'un même lot par micro-ondes (EIIa et EIIc), en utilisant pour chacun des puissances de chauffe allant de 250W à 1000W.

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle pour chacune des puissances est obtenu pour une charge végétale de 100g (tableau 2). Les trois premières puissances imposent un temps d'extraction relativement long supérieur à 30min, ce qui peut engendrer la formation d'artéfacts et favoriser les réactions hydrolytiques.<sup>114, 115</sup>

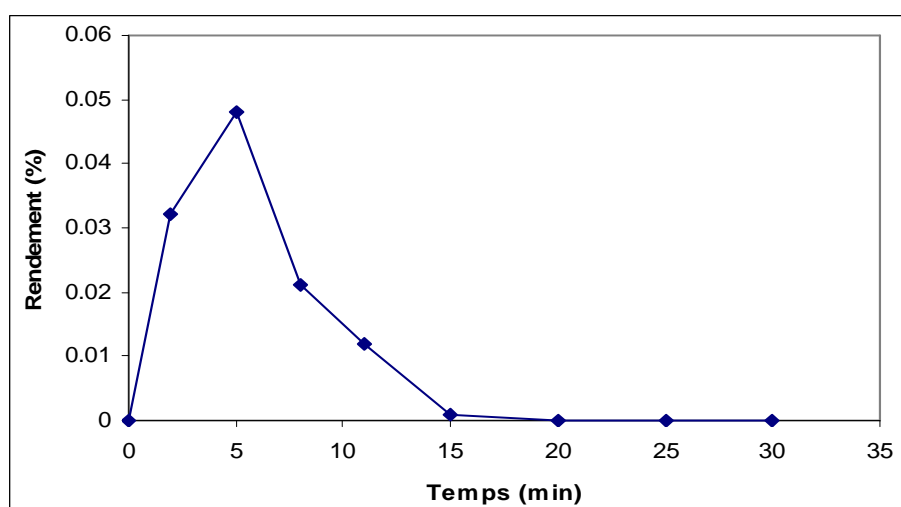
Pour une puissance de 1000W le temps d'extraction est plus faible avec un rendement plus important (0,48%), mais le processus d'extraction devient plus difficile à contrôler vu la forte énergie mise en œuvre (tableau 2).

La puissance fixée à 1000W, nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle des échantillons d'*A. herba-alba*, en utilisant des essais de durées de 2 à 30min, pour pouvoir déterminer le temps optimal d'extraction.

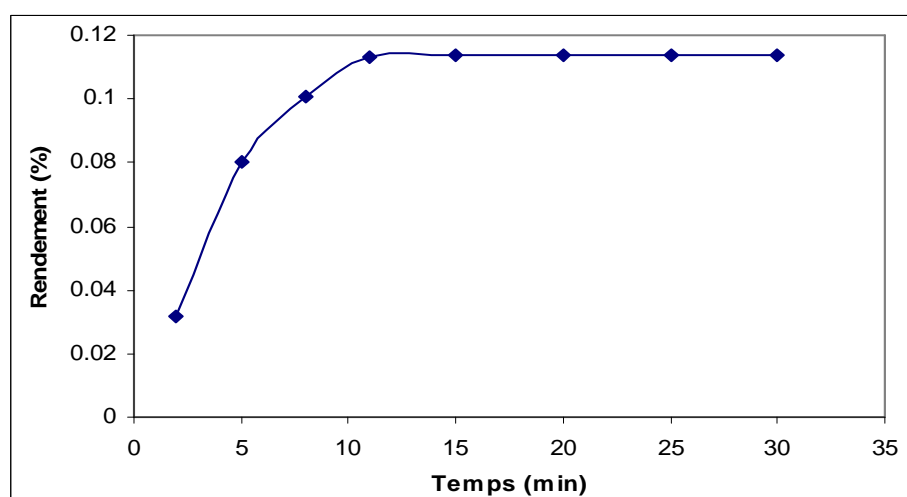
**Tableau.2** Variation du rendement d'extraction et la puissance de chauffe.

Puissance	250	450	600	850	1000
Rendement (%)	0,08	0,13	0,24	0,32	0,48

Les résultats montrent que le rendement en huile essentielle est maximal pour une durée d'extraction voisine de 15min, au-delà de cette durée, le rendement de l'huile essentielle devient négligeable (figure 2 et 3).



**Figure 2.** Variation du rendement différentiel en fonction du temps pour la micro-ondes



**Figure 3.** Variation du rendement cumulé en fonction du temps pour la micro-ondes

La variation du rendement au cours du temps (rendements différentiel) (figure 1 et 2) fourni des informations concernant non seulement la cinétique du processus, mais encore la composition de l'huile essentielle.

Un maximum situé au début indique la présence en grande proportion dans l'huile essentielle de produits légers tels que les hydrocarbures terpéniques hydrocarbonés et oxygénés tels que la thujone, le camphre et la chrysanthénone, alors qu'un maximum vers la fin suggère la présence des sesquiterpènes tels que la davanone. De plus, il permet de déterminer la fin du processus. Cette dernière coïncide avec le point (temps) pour lequel la courbe tend vers l'axe des abscisses.<sup>116, 117</sup>

### I.3. Détermination du rendement selon la période de récolte

Pour la variation du rendement de la station de Roumana en fonction de la période de la cueillette, (figure 4) le rendement est plus important pour le mois de Juin, pour les deux méthodes d'extractions. L'hydrodistillation semble être le meilleur procédé d'extraction sachant que, son rendement varie entre (0,13% et 0,34%), contre (0,08% et 0,15%) pour la micro onde (tableau 3).

**Tableau 3.** Rendements d'extraction d'*Artémisia herba alba*.

Stations	Roumana			
	Mars	Avril	Mai	Juin
HD	0,13	0,14	0,20	0,34
MO	0,08	0,10	0,15	0,15

HD: hydrodistillation; MD: Micro-ondes distillation

Le rendement d'huile essentielle extrait par micro-onde pour la période de Mai et de Juin est identique.

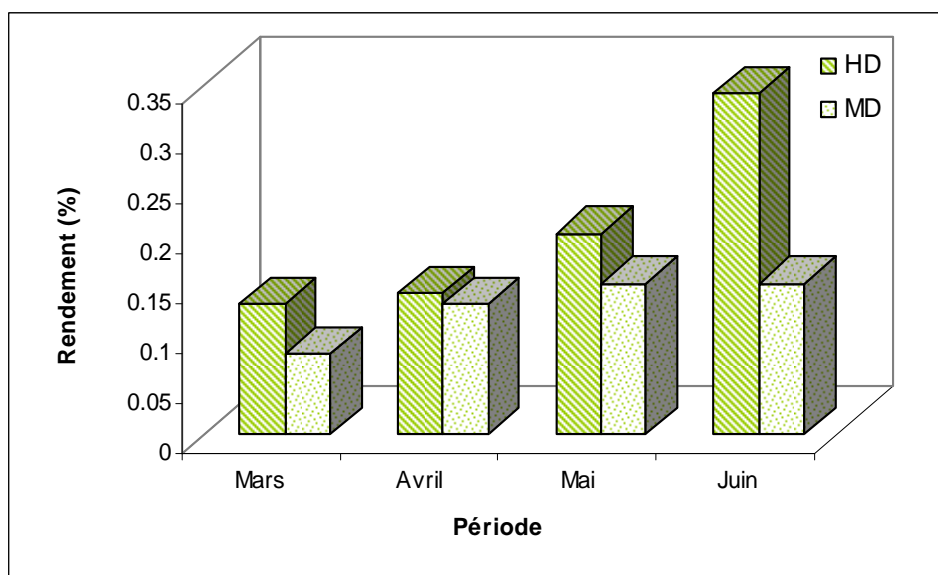


Figure 4. Variation du rendement en huile essentielle en fonction de la période de récolte.

#### I.4. Les rendements d'extractions

Rappelons que les rendements d'extractions des 23 échantillons étudiés sont calculés par rapport à la masse de la matière sèche. Ils sont rassemblés dans le tableau 4.

$$R\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

$m_1$  : masse de l'huile extraite  
 $m_2$  : masse initiale du végétal

Tableau 4. Rendements (%) des essences de *l'A. herba-alba* extraites au mois de Juin par HD et MD

Extraits	D	D'	LG	BA	BG	BB	DC	BO	R	M	G	MS
<b>HD</b>	1,00	0,42	0,62	0,50	0,50	0,46	0,31	0,60	0,34	0,62	0,62	0,34
<b>MD</b>	0,55	0,20	0,35	0,15	0,31	0,20	0,15	-	0,15	0,36	0,50	0,17

HD: hydrodistillation; MD: Micro-ondes distillation

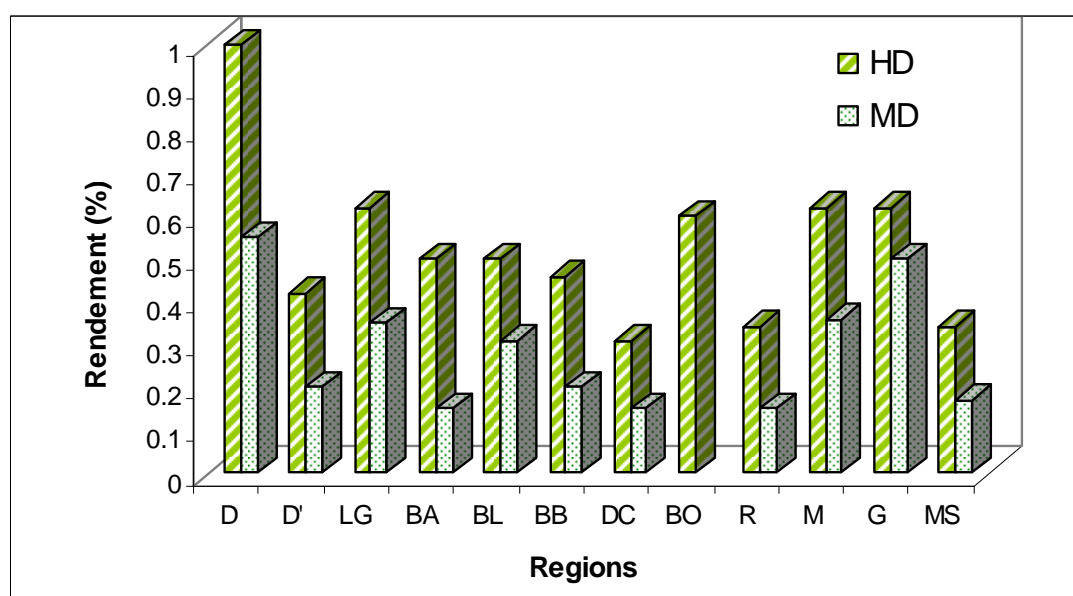
D: Djelfa; D': Djelfa; LG: Laghouat; BA: Batna; BG: Bordj Ghédir; BB: Bordj Bou Arreridj; DC: Draâ Ech Chih ;BO: Boussâada ; R: Roumana ; M: Medjebel ; G: Ghardaia et MS: M'sila

Au vu de ces résultats, il apparaît que les rendements des huiles essentielles obtenus par hydrodistillation sont compris dans l'intervalle [0.3-1.6%]<sup>118</sup> cités dans la bibliographie et avec ceux reportés par d'autres auteurs [0,15-1,93%] sur des espèces d'autres régions et d'autres pays (tableau 5)

Les essences obtenues par micro-ondes présentent des rendements beaucoup plus faibles comparés à ceux obtenus par hydrodistillation (Figure 5). Les rendements sont de [0,15-0,55%] pour la micro-onde contre [0,31-1,00%] pour l'hydrodistillation.

**Tableau 5.** Rendements rapportés dans la littérature et obtenus par hydrodistillation

Origines	Algérie					Egypte	Espagne			Jordanie	Tunis	Maroc
Références	[61]	[65]	[66]	[67]	[107]	[62]	[69]	[71]	[100]	[106]	[110]	[118]
Rendements (%)	0,3	0,29	0,64	0,29	1,02	1,6	0,15-0,3	0,23	0,41	1,3	0,68-1,93	0,3-1,6



**Figure 5.** Rendements (%) des huiles essentielles de l'*A. herba-alba* extraites par HD et MD

### I.5. Les indices physiques

Les indices physiques (densité  $d_{20}^{20}$ , indice de réfraction  $\eta_D^{20}$  et pouvoir rotatoire  $\alpha_D^{20}$ ) de nos huiles essentielles déterminés selon les normes AFNOR<sup>20</sup> sont rassemblés dans le tableau 6. Le pouvoir rotatoire a été calculé à 25°C.

**Tableau 6.** Indices physiques

Extraits	D	D'	LG	BA	BG	BB	DC	BO	R	M	G	MS
$\eta_D^{20}$	1,479	1,478	1,471	1,478	1,476	1,471	1,475	1,478	1,472	1,474	1,476	1,475
$\alpha_D^{20}$	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
$d_{20}^{20}$	0,921	0,922	0,933	0,923	0,922	0,942	0,918	0,919	0,918	0,921	0,949	0,920

Les indices physiques des huiles essentielles des plantes provenant des onze régions montrent des différences, notamment pour  $\alpha_D^{20}$ .

Leur densité varie entre 0,918 et 0,949. Ils sont compris dans la norme 0.900 à 1.000 (Afnor)<sup>19, 113</sup> ainsi que celle rapportée par la littérature (tableau 6). Les huiles essentielles sont donc de composition chimique complexe (mélange de carbures terpéniques, d'alcools, d'aldéhydes, de cétones et d'esters), leurs indices de réfraction sont relativement proches.

Nos valeurs d'indice de réfraction sont pratiquement identiques à celles trouvées pour les huiles essentielles d'*A.herba-alba* d'Algérie rapportées par la bibliographie ; elles sont comprises entre [1,4555-1,4788] (Afnor).<sup>19, 113</sup>

Le pouvoir rotatoire des 7 échantillons des 11 régions sont lévogyres et les 5 autres huiles essentielles sont dextrogyres.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux déterminés par la littérature lors de l'étude de quelques peuplements d'Armoise blanche d'Algérie, du Maroc, d'Espagne et d'Egypte (tableau 7), on remarque une similitude dans les valeurs trouvées pour le pouvoir rotatoire qui varie entre + 41 et - 9,5 pour l'huile essentielle du Maroc<sup>26</sup> contre + 41 à - 7,5 pour celle des hauts plateaux d'Algérie. Ces mêmes auteurs soulignent le peu de renseignements que l'on peut tirer de l'observation de ces indices.

En comparant nos résultats à ceux trouvés pour les huiles essentielles lors de l'étude de l'Armoise blanche d'Algérie. Les valeurs sont comprise entre [+2,6 et -15,3]<sup>61, 63, 64, 66</sup> et varient de [- 18 à - 41]<sup>119</sup> pour celles de l'ouest d'Algérie

**Tableau 7.** Indices physiques rapportés dans la littérature

Origines	Références	$\eta_D^{20}$	$\alpha_D^{20}$	$d_{20}^{20}$
Maroc	[26]	1,4562-1,4692	(-9,5) – (+41,0)	-
Algérie	[61]	1,47274	-15,30	0,9456
	[63]	-	+2,6	0,9432
	[64]	-	-13,24	0,9534
	[65]	1,4676	-12,2	0,9288
	[66]	1,4653	+3,88	0,9257
	[119]	1,4719-1,4796	(-18) – (-41)	-
Egypte	[62]	1,45611	-5,20	0,9192
Espagne	[69]	1,4720	+12	0,9460
Afnor	[113]	1,4555-1,4788	-	0,900-1,000

## **II. Partie expérimentale**

### **II.1. Matériel botanique (EIIa)**

Les parties aériennes de l'armoise blanche ont été récoltées en Juin de l'année 2005 et 2006 dans onze régions différentes du pays : Bordj Bou Arreridj, Bordj Ghardj, Draâ Chih, Batna, M'sila, Djelfa, Boussaâda, Roumana, Medjedel, Laghouat et Ghardaia.

L'authentification des échantillons d'*A. herba-alba* a été réalisée au Laboratoire de Biologie végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université Houari Boumediene.

### **II.2. Préparation des échantillons et extraction (EIIb)**

Dans le souci de respecter au mieux les recommandations des normes et des utilisateurs<sup>112, 113</sup> les 23 échantillons fraîchement cueillis sont préalablement séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière de 3 à 6 jours. Le temps de passage à l'extraction doit être le plus bref possible. Avant l'extraction, la matière végétale (tige+feuilles) est préalablement coupée en petit bâtonnets d'environ 1cm de long. La charge de chaque extraction est d'environ 100g. Les huiles essentielles sont alors extraites par hydrodistillation et par micro-onde.

A la fin de chaque extraction, l'échantillon d'huile essentielle obtenue par décantation, est récupéré, séché sur du sulfate de sodium anhydre, puis conservé à l'abri de la lumière et à basse température pour éviter toute dégradation.

### **II.3. Extraction par hydrodistillation (EIIc)**

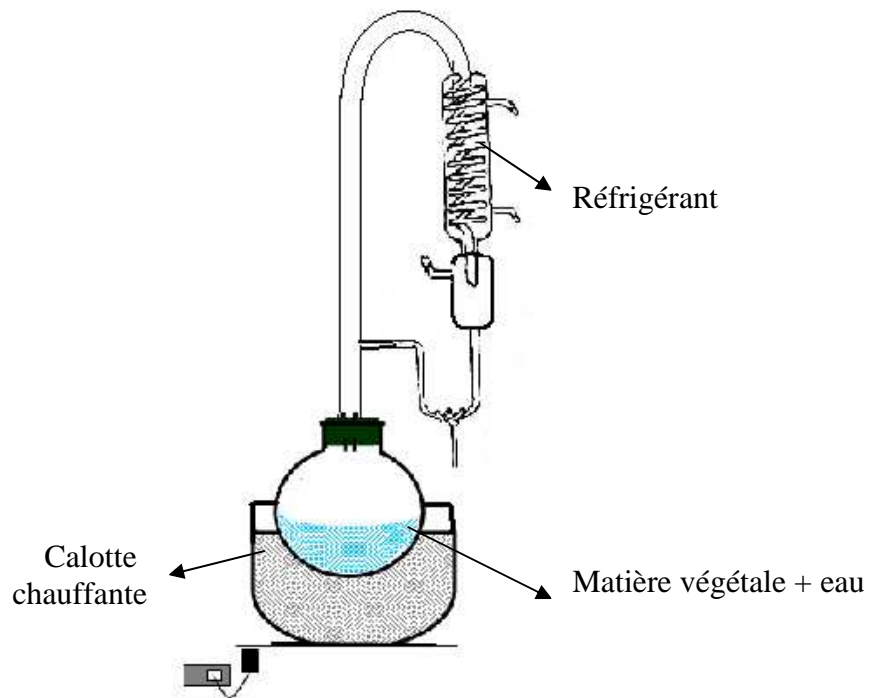
L'huile essentielle d'*A. herba-alba* est obtenue par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de Clevenger modifié<sup>120</sup> (figure 6). La durée de chaque extraction a été fixée à deux heures. Les essences obtenues sont fluides, de couleur jaune pâle et dégagent une forte odeur fraîche et agréable

### **II.4. Extraction par micro-ondes (EII d)**

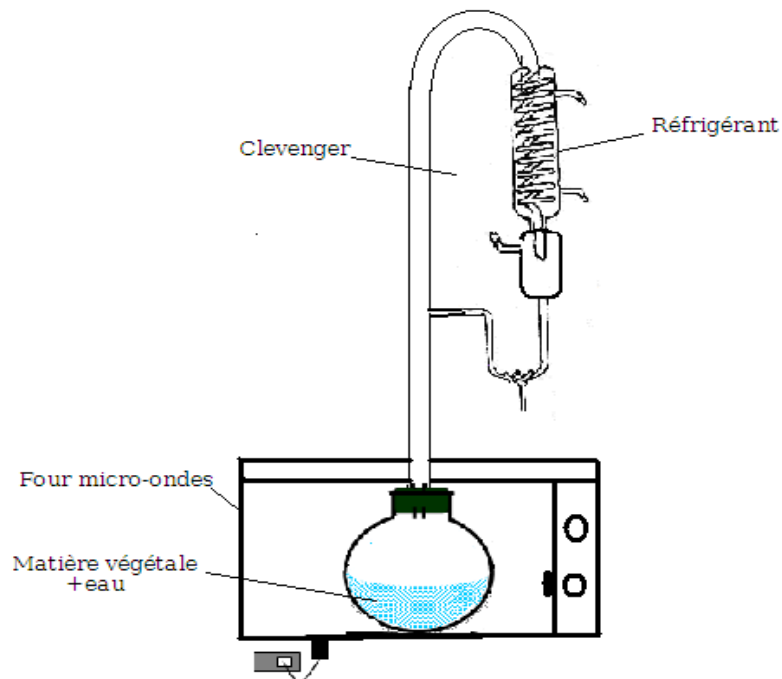
L'extraction par micro-ondes a été effectuée à pression atmosphérique par un dispositif reliant un four micro-ondes à un extracteur Clevenger identique à celui utilisé pour l'hydrodistillation (figure 7).

La matière végétale est humectée avec 30 à 50 mL d'eau distillée pour permettre le réchauffement interne au sein des particules,<sup>121</sup> la puissance utilisée étant de 1000W et la

durée d'extraction est fixée à 15min. Les huiles essentielles sont isolées par décantation et stockées à basse température.



**Figure 6 : Appareil de Clevenger modifié**



**Figure 7 : Appareil de micro-ondes**

### **III. Conclusion**

Dans ce chapitre, les indices physiques ont servi d'abord à caractériser nos essences ; par ailleurs, nous avons souligné l'importance de l'échantillonnage et du mode d'extraction sur la qualité des essences.

Le temps optimal de 2 heures d'hydrodistillation pourrait engendrer la production d'artéfacts dans les huiles essentielles contrairement aux 15 minutes exigées dans la MD. Cependant les rendements en HD sont supérieurs à ceux obtenus en MD dans notre cas.

La question qui se pose également est la suivante : quelle est la qualité de l'essence extraite par MD par rapport à celle obtenus par HD ? Nous essaierons de répondre à cette question dans le chapitre suivant.

*Chapitre* **III**

**Analyse des huiles essentielles**  
***d'Artemisia herba-alba***  
**par GC et GC/MS**

## **I. Introduction**

La connaissance de la composition chimique des constituants des huiles essentielles est un critère de qualité très recherché par les utilisateurs, dans les domaines aussi vastes que la chimiotaxonomie, l'entomologie, la parfumerie, les produits de cosmétiques etc. Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes avec des fonctions organiques diverses, pour cela la GC est l'une des techniques d'analyses les plus utilisées aussi bien au laboratoire que dans l'industrie pour l'analyse qualitative et quantitative.

La séparation est basée sur les différences du coefficient de partage des produits à séparer entre un gaz constituant la phase mobile et un liquide constituant la phase stationnaire, déposée sur un granulé poreux ou sur les parois de la colonne, qui est l'élément essentiel de tout système chromatographique. Le temps de rétention de chaque composé, dépend entre autres de la nature du constituant, de la nature de la phase stationnaire (composition et épaisseur du film), de la vitesse du gaz vecteur et de la température de la colonne.

Le développement des colonnes capillaires constitue un progrès réel et a ouvert de nouvelles perspectives à la chromatographie gazeuse. Grâce à ses progrès, cette technique est devenue une méthode d'analyse de haute résolution. Il est donc possible d'analyser chaque huile essentielle de façon très poussée et de distinguer entre des essences d'origines diverses.

L'indice de rétention contribue notablement à l'identification et joue un rôle déterminant dans les cas où les constituants présentent des spectres de masse pratiquement identiques. Il a été introduit par Kovats en 1958 dans des conditions isothermes, puis adapté par Van Den Dool et Kratz<sup>122,123</sup> pour la programmation de température ; il est basé sur le fait que la température de rétention et le temps de rétention varient linéairement avec le nombre de carbone dans une série homologue.

$$I_p(\%) = 100z + 100n \frac{t_r(x) - t_r(z)}{t_r(z+n) - t_r(z)}$$

$t_R(x)$  : Temps de rétention du soluté (x) étudié.

$t_R(z)$  : Temps de rétention de l'alcane à (z) atome de carbone qui précède (x).

$t_R(z+n)$ : Temps de rétention de l'alcane (z+n) atome de carbone qui suit (x).

n : différence du nombre d'atome de carbone entre les alcanes (n=1 généralement)

L'association de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse constitue une technique analytique de choix dans l'identification puisqu'elle permet l'étude structurale en se basant sur la nature et l'abondance relative des entités chargées correspondantes et donnée par la spectrométrie de masse.

Cette technique consiste à ioniser par bombardement électronique, les molécules éluées de la colonne capillaire du chromatographe en phase gazeuse dans l'enceinte sous vide du spectromètre de masse. Les identifications se font en général par comparaison des différents pics expérimentaux avec les spectres de masses de références.<sup>124-128</sup> L'outil informatique permet d'écourter le temps de traitement et d'utiliser des banques de spectres.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude qualitative et semi-quantitative par la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) sur des colonnes capillaires des constituants existants dans les huiles essentielles d'*A. herba alba* des différentes régions citées obtenus par hydrodistillation et par micro-ondes.

## **II. Résultats et discussion**

L'analyse qualitative et semi-quantitative des essences extraites par hydrodistillation et par micro-ondes (EIIc et EIId) a été effectuée par GC sur deux phases stationnaires de polarités différentes HP5MS (Polyméthyle siloxane, 30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m) et HPWAX. (Polyéthylène glycol, 60m x 0,32mm x 0,25 $\mu$ m) L'identification a été réalisée grâce au couplage GC/MS en impact électronique (IE), sur deux colonnes de polarités différentes par comparaison avec les spectres de masse déjà référencés<sup>125-128</sup> et à ceux de la banque de spectres (Nist et Wiley 07). L'injection des n-alcanes, sous les mêmes conditions opératoires nous a permis de calculer les indices de rétention de tous les pics (voir les détails dans la partie expérimentale de ce chapitre : EIIIa et EIIIb).

Les composés identifiés dans les 23 essences, leurs indices de rétention ainsi que leurs teneurs relatives sont reportés dans le tableau 8. Pour la détermination quantitative des constituants, nous avons admis que le détecteur à ionisation de flamme réagissait de manière identique à tous les composés et que leurs coefficients de réponse étaient tous égaux à l'unité. Des exemples de chromatogramme figures 8 et 9 sont représentés ci-dessous et les autres chromatogrammes sont illustrés en annexe 1.

Tableau 8. Composition chimique des huiles essentielles d'*A. herba-alba* obtenus par hydrodistillation

Composés	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	Djelfa				Laghouat		Batna		Bordj. Ghédir		BB. Arréridj		Draâ Ech Chih		Boussâada		Roumana		Medjedel		Ghardaia		M'sila	
			D1	D2	D'1	D'2	LG1	LG2	BA1	BA2	BG1	BG2	BB1	BB2	DC1	DC2	BO1	R1	R2	M1	M2	G1	G2	MS1	MS2	
santalina triène <sup>a,h,i</sup>	899	1028	tr	tr	0,5	0,4	tr	0,4	0,1	-	0,3	0,1	tr	tr	tr	tr	0,4	0,4	tr	0,9	0,8	0,1	0,1	tr	tr	
tetra hydrofuran (2,5-diéthényl -2-méthyl) <sup>a,d,g,i</sup>	908		0,3	0,1	0,2	0,1	0,5	0,7	0,1	0,1	0,5	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
tricyclène <sup>a,d,g,h,i</sup>	917	1007	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	tr	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	tr	
artémisia triène <sup>a,e</sup>	919		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1	-	-	
α-thujène <sup>a,d,e,g,h</sup>	920	1027	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	0,2	0,3	tr	0,1	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
α-pinène <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	927	1022	tr	tr	0,2	0,2	tr	0,1	0,8	0,5	0,2	0,1	1,2	0,5	0,3	0,2	1,1	0,8	0,2	0,5	0,5	0,2	0,1	0,3	0,1	
éthyl tiglate <sup>d</sup>	936	1224	tr	tr	tr	tr	-	tr	0,2	tr	0,1	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
camphène <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	941	1061	0,1	0,1	0,9	1,0	0,1	1,4	0,6	1,3	0,9	0,5	4,1	1,4	1,2	1,0	4,2	2,7	1,6	5,0	4,5	2,8	2,6	2,1	0,6	
thuja-2,4(10)-diène	948	1120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
verbénène <sup>h</sup>	949		-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	
isopropyl tiglate <sup>g</sup>			tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5,5-diméthyl-2(5H)-furanone <sup>d,i</sup>		1559	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,8	tr	tr	0,5	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sabinène <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	966	1116	tr	tr	0,1	tr	tr	0,1	0,2	0,3	tr	tr	0,6	0,2	0,8	0,6	0,7	2,2	0,6	0,4	0,4	0,3	0,2	0,7	0,2	
β-pinène <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	969	1100	tr	tr	0,2	0,3	tr	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,6	0,5	0,1	0,1	0,1	tr	
1-octène -3-ol <sup>g,h,i</sup>	971	1431	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	0,1	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	0,3	0,2	0,1	0,1
1,6-diméthylhepta-1,3,5 triène	974	1218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	
octane-3-one <sup>g,h</sup>	978	1241	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
myrcène <sup>a,b,d,g,h,i</sup>	982	1160	1,6	0,4	1,6	1,0	2,0	3,4	0,5	1,5	1,1	1,0	tr	tr	tr	-	tr	0,1	0,1	tr	tr	-	-	tr	tr	
1,3,5- triméthylbenzène <sup>a,h</sup>	986	1253	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
yomogi alcool <sup>a,b,e,f,g,i</sup>	988	1331	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,5	0,6	tr	-	-	0,1	0,1	4,1	2,5	0,1	tr	
α-phellondrène <sup>a,d,f,g,h,i</sup>	994	1163	tr	tr	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
o-isopropenyl toluène	1009	1261	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	-	-	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
α-terpinène <sup>a,c,d,f,g,h,i</sup>	1011	1179	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	0,2	0,1	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	
allyl tiglate	1012		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Propanoïque acid-2méthyl, 2 méthyl butyl ester	1013	1196	tr	tr	tr	tr	tr	-	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,2	0,1	0,1	tr	-	-	0,1	tr	
1,2,3-triméthyl benzène <sup>a,h</sup>	1015	1315	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	0,1	-	-	tr	tr	

Composés	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	Djelfa				Laghouat		Batna		Bordj. Ghdir		BB. Arréridj		Draa Chih		Boussâada		Roumana		Medjedel		Ghardaia		M'sila	
			D1	D2	D'1	D'2	LG1	LG2	BA1	BA2	BG1	BG2	BB1	BB2	DC1	DC2	BO1	R1	R2	M1	M2	G1	G2	MS1	MS2	
p-cymène <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1019	1256	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,3	0,4	0,3	0,7	0,5	0,7	0,5	1,8	1,5	0,9	0,2	0,3	0,1	0,1	1,0	0,9	0,3	0,2	
limonène <sup>d,e,h</sup>	1021	1196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	-	
β-phellondrène <sup>a,g,h</sup>	1023	1205	tr	tr	tr	tr	tr	Tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	0,2	0,2	0,1	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
1.8-cinéole <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1028	1204	0,3	0,9	4,8	5,1	0,2	1,5	1,1	2,5	7,2	5,3	4,9	2,9	1,4	1,2	8,5	6,5	6,4	13,4	12,4	5,2	8,5	3,3	2,6	
santalina alcool <sup>a,e,f,g,i</sup>	1036	-	tr	0,1	-	-	tr	0,1	tr	-	0,4	0,3	tr	tr	-	-	0,1	tr	tr	0,1	0,1	4,3	3,0	tr	0,1	
B-isophorone <sup>a</sup>	1039	-	-	-	-	-	-	-	tr	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
β-ocimène <sup>d,f,h</sup>	1041	1214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	
lavender lactone <sup>g</sup>	1042	1124	tr	0,1	tr	0,1	tr	0,2	tr	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
cis-arbusculone <sup>a,d,i</sup>	1049	-	0,1	tr	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,4	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
bergamal	1051	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	
trans-décahydro naphtalène	1053	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	
γ-terpinène <sup>a,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1055	1238	0,1	0,1	0,3	0,3	tr	0,1	tr	tr	0,3	0,1	0,3	0,1	0,5	0,3	0,7	0,4	0,2	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	
artémisia kétone <sup>i</sup>	1059	-	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1	-	-	
lavender lactone iso	1062	1243	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
cis-sabinène hydrate <sup>e,i</sup>	1066	1469	tr	0,2	0,5	0,6	0,1	0,5	-	-	tr	-	tr	tr	-	-	tr	0,7	0,2	1,1	1,1	0,1	0,2	tr	tr	
trans-arbusculone <sup>a,d,i</sup>	1068	-	0,1	0,1	0,2	0,2	tr	tr	3,6	-	0,9	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
cis-butanoïque acid-3-hexenyl ester <sup>g</sup>	1070	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,2	0,1	-	0,2	0,2	-	-	0,1	-	-	-	
artémisia alcool <sup>a,e,f,g,i</sup>	1081	1481	tr	0,3	tr	0,2	tr	tr	-	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	tr	tr	tr	1,1	1,1	5,1	3,6	-	-	
terpinolène <sup>a,c,d,f,g,h,i</sup>	1087	1277	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	-	-	tr	tr	-	-	0,1	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	0,1	tr	0,7	0,8	
artémisia alcool iso	1089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,4	tr	tr	-	-	0,1	0,2	
trans-sabinène hydrate <sup>c</sup>	1095	1450	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	tr	tr	0,4	0,5	tr	-	-	-	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	
linalool <sup>a,d,e,g</sup>	1099	1469	1,6	0,1	0,2	tr	1,1	1,1	tr	tr	0,5	0,4	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	tr	-	-	
filifolone <sup>a,h</sup>	1103	1423	tr	tr	tr	tr	-	tr	1,0	1,1	tr	Tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
α-thujone <sup>a,b,e,f,g,h,i</sup>	1105	1409	0,9	0,5	0,8	0,5	-	-	0,1	tr	0,7	0,4	15,9	8,6	35,1	31,2	12,0	27,1	23,7	1,0	1,0	12,5	17,7	26,8	17,3	
β-thujone <sup>a,b,e,f,g,h,i</sup>	1116	1422	0,2	tr	0,2	tr	-	-	0,4	0,8	0,6	0,2	5,1	3,6	9,7	8,3	9,2	9,7	8,2	2,1	1,9	5,5	9,9	3,9	3,1	
isophorone <sup>a</sup>	1120	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	0,3	0,1	-	-	-	tr	tr	0,3	0,3	0,1	-	

Composés	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	Djelfa				Laghouat		Batna		Bordj. Ghdír		BB. Arréridj		Draa Chih		Boussâada		Roumana		Medjedel		Ghardaia		M'sila	
			D1	D2	D'1	D'2	LG1	LG2	BA1	BA2	BG1	BG2	BB1	BB2	DC1	DC2	BO1	R1	R2	M1	M2	G1	G2	MS1	MS2	
cis-p-menth-2-en-1ol <sup>d,g,i</sup>	1124		0,1	tr	0,2	tr	0,1	0,2	-	-	0,3	0,2	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-
cis-pinène hydrate <sup>b,g</sup>	1125		tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-
chrysanthénone <sup>a,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1127	1505	0,1	5,8	0,2	3,4	0,2	0,2	13,1	32,3	tr	tr	29,6	43,8	25,4	31,6	5,5	23,3	20,0	3,2	3,3	tr	tr	20,5	34,3	
terpinène 1-ol	1132	1564	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-			tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
trans-pinocarvéol <sup>a,b,d,e,f,g,h,i</sup>	1134	1622	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0,6			-	-	tr	tr	0,1	-	-	tr
trans-p-menth-2-en-1ol <sup>d</sup>	1142		tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	0,1	tr	tr	0,1	-	-			tr	tr	tr	-	0,1	0,1	tr	tr
trans-pinène hydrate <sup>b</sup>	1143		tr	-	0,1	tr	tr	-	-	-	0,1	tr	tr	tr	-	-			tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr
camphre <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1148	1514	1,2	0,9	1,1	0,9	1,5	1,7	2,8	6,8	0,5	0,3	18,6	16,0	4,7	4,5	28,0	14,5	14,3	49,3	48,1	14,9	19,6	14,1	22,2	
trans-verbénol	1149	1648	tr	-	-	-	tr	tr	0,2	tr	tr	tr	-	tr	0,1	0,1	0,2	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	0,1	tr	
ipsidienol <sup>g</sup>	1150		tr	-	-	tr	0,1	-	tr	-	0,1	tr	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	
isothujanol <sup>b,h</sup>	1155		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	
isobornéol <sup>f,g</sup>	1159	1651	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	
sabina kétone <sup>g,i</sup>	1160		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,1	
trans-pinocamphone <sup>g</sup>	1164		-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	0,1	0,1			-	-	-	-	-	-	0,2	tr
cis-chrysatéol <sup>a,d,e,f,h</sup>	1166		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-			tr	tr	-	-	-	-	tr	-
pinocarvone <sup>a,e,g,h,i</sup>	1167	1570	tr	0,1	-	tr	0,1	0,1	0,2	1,8	0,1	0,2	2,4	2,7	1,0	0,9	1,8	2,3	2,1	5,6	5,5	0,9	0,7	1,4	1,3	
bornéol <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1169	1675	0,1	0,5	1,4	1,6	0,1	0,3	0,3	-	0,2	0,2	1,9	1,8	0,6	0,6	4,7	2,5	1,1	7,3	7,1	7,3	4,7	0,9	1,3	
δ-terpinéol	1168	1630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2			tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr
lavandulol <sup>d,f,g,i</sup>	1170		0,1	0,5	3,5	3,8	0,2	0,3	-	2,3	1,2	0,9	-	-	-	-			-	-	-	-	-	-	-	
thujanol <sup>a,b,h</sup>	1170		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr
α-pellandrène-8ol <sup>g,i</sup>	1173		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	-	-			tr	-	-	tr	-	-	-	-
santalinyl acétate <sup>a,e</sup>	1176	-	tr	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr
cis-pinocamphone <sup>e,g</sup>	1178		tr	-	tr	-	-	-	tr	0,1	tr	Tr	0,1	0,1	0,1	-			tr	-	-	tr	-	-	tr	0,1
artemisyl acétate	1179		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			tr	-	tr	tr	tr	tr		
terpinèn 4-ol <sup>a,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1181	1589	tr	0,1	0,5	0,5	tr	0,1	0,2	0,2	0,9	0,7	0,7	0,5	0,9	0,7	1,7	0,6	0,1	0,9	0,8	0,8	0,6	0,3	0,4	
thuj-3-en-10-al <sup>i,g</sup>	1185	1566	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	

Composés	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	Djelfa				Laghouat		Batna		Bordj. Ghdir		BB. Arréridj		Draa Chih		Boussâada		Roumana		Medjedel		Ghardaia		M'sila	
			D1	D2	D'1	D'2	LG1	LG2	BA1	BA2	BG1	BG2	BB1	BB2	DC1	DC2	BO1	R1	R2	M1	M2	G1	G2	MS1	MS2	
p-cymen-8-ol <sup>a,c,d,e,g,i</sup>	1187	1830	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0,1	tr	tr	0,2	tr	-	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr		
α-terpinéol <sup>a,b,c,d,e,g,h,i</sup>	1192	1672	tr	-	tr	tr	tr	0,1	tr	-	0,1	tr	0,2	0,2	0,2	0,2	0,7	0,2	0,2	tr	tr	1,0	1,0	0,3	0,4	
myrténal <sup>a,c,e,f,g,h,i</sup>	1196	1616	tr	0,1	0,4	0,5	tr	0,1	0,2	tr	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	-	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	
cis-pipéritol <sup>a,b,c,d,e,g,h,i</sup>	1197	1723	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	Tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
myrténol <sup>a,c,e,f,g,h,i</sup>	1199	1774	0,1	0,3	0,3	0,6	0,1	0,3	tr	tr	0,4	0,3	tr	tr	tr	tr	0,5	0,8	0,8	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	
verbenone <sup>a,b,f,g,h,i</sup>	1205	1683	-	-	-	tr	tr	tr	0,2	0,1	-	-	tr	tr	-	-	0,3	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	tr	
trans-pipéritol <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>	1208	1740	0,2	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,2	0,8	0,1	0,1	0,5	0,4	0,6	0,6	0,7	0,8	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,7	1,6	
trans-Carvéol <sup>a,f,g,h</sup>	1221	1820	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	-	-	0,1	0,1	
cis-sabinènehydrateacétate <sup>g</sup>	1222		0,2	0,3	0,2	0,3	0,4	0,5	0,2	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	tr	-	0,1	tr	0,1	tr	-	-	
néral <sup>f</sup>	1226	1776	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	-	-	-	-	
cis-carvéol <sup>a,g,h</sup>	1232	1848	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	0,2	
nordavanone <sup>a,d,g,i</sup>	1233		0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	tr	-	0,5	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
isobornyl formate	1236		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	
cumin aldéhyde <sup>a,c,d,g,h,i</sup>	1243	1770	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	0,1	0,2	0,2	tr	tr	
trans-ociménone	1244	1813	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,1	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,1	-	-	0,2	0,2	
carvone <sup>a,f,g,h,i</sup>	1245	1721	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,3	0,2	0,3	0,2	tr	0,1	0,1	tr	tr	3,3	2,4	0,1	0,2	
carvotanacétone <sup>a,g</sup>	1249	1713	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	tr	tr	tr	-	0,2	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	
pipéritone <sup>a,b,c,f,g,h,i</sup>	1255	1710	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	-	0,1	0,1	0,3	0,4	0,9	0,8	0,1	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	tr	tr	
cis-chrysanthényl acétate <sup>a,d,e,g,h,i</sup>	1266	1605	0,9	0,1	0,3	0,1	0,3	0,5	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	3,1	0,3	0,2	1,1	8,2	4,8	1,0	0,9	tr	tr	0,3	0,2	
neothujyl acétate	1281		-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	tr	tr	-	-	-	tr	0,1	-	-	0,1	-	-	-	
cis-verbényl acétate <sup>h</sup>	1288		0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	-	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	-	
lyratyl acétate <sup>a,d</sup>	1290	1611	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	0,2	tr	tr	-	-	tr	tr	-	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	-	tr	
isobornyl acétate	1292	1572	tr	0,1	1,1	0,9	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	tr	
bornyl acétate <sup>a,b,c,d,e,g,h,i</sup>	1293	1573	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,5	0,1	0,9	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1	0,7	0,3	tr	tr	0,3	0,2	0,3	0,1	
cumin alcool <sup>a,d,g</sup>	1294	2086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
lavaondulyl acétate <sup>d,f,g</sup>	1295		tr	tr	0,1	tr	-	tr	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Composés	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	Djelfa				Laghouat		Batna		Bordj. Ghdir		BB. Arréridj		Draa Chih		Boussâada		Roumana		Medjedel		Ghardaia		M'sila	
			D1	D2	D'1	D'2	LG1	LG2	BA1	BA2	BG1	BG2	BB1	BB2	DC1	DC2	BO1	R1	R2	M1	M2	G1	G2	MS1	MS2	
sabinyl acétate <sup>a,i</sup>	1296	1617	tr	0,1	-	-	-	tr	-	-	tr	tr	tr	0,5	0,1	tr	tr	2,4	0,2	tr	tr	0,9	0,6	0,4	0,2	
thujyl acétate <sup>g</sup>	1297		0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,1	tr	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	0,1		
trans-verbényl acétate	1298		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	tr	tr	-	-	tr	tr		
trans-pinocarvyl acétate	1301		tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	-	-	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	0,1	
carvacrole <sup>d,f,i</sup>	1302	2150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	-	
hexyl tiglate <sup>g</sup>	1325	1702	tr	-	tr	tr	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
filifolide A <sup>a,h</sup>	1326		tr	tr	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,3	tr	tr	0,2	0,1	0,2	0,2	-	0,1	0,4	tr	tr	0,1	tr	-	-	
terpinène-4ol acétate <sup>a,i</sup>	1342		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	tr	0,1	-	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	
$\alpha$ -terpinyl acétate <sup>a,b,c,d,e,f</sup>	1343		tr	tr	tr	tr	0,2	0,1	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
$\alpha$ -cubébène <sup>a,e,f,g</sup>	1350		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	
eugéno <sup>d,g,h</sup>	1351	2155	tr	0,1	0,1	tr	-	tr	-	-	tr	tr	0,1	0,2	-	-	0,1	-	tr	tr	-	-	tr	tr		
lratyl propionate <sup>a</sup>	1352		tr	0,2	tr	0,1	-	tr	0,1	0,3	0,4	0,5	tr	tr	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	0,1	tr	
$\alpha$ -copaène <sup>a,d,e,f,g,h,i</sup>	1366	1476	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,5	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,6	0,5	0,3	0,1	tr	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	
bornyl propionate <sup>a,c</sup>	1371		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	0,1	-	-	-	-	-	-	-	
$\beta$ -bourbonène <sup>g</sup>	1383		tr	0,1	tr	0,1	tr	0,2	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
$\beta$ -elémène <sup>a,f</sup>	1387	1579	tr	-	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	
$\beta$ -cubébène <sup>c,e,f,g</sup>	1388	1534	tr	-	-	0,1	tr	0,1	-	-	tr	tr	tr	-	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	tr	
trans-jasmone <sup>g</sup>	1389		tr	1,2	tr	-	tr	tr	-	-	tr	-	tr	-	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	-	-	tr	tr	
cis-jasmone <sup>a,e,g,h,i</sup>	1393	1932	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	tr	tr	0,1	0,2	0,6	0,9	0,3	0,5	4,4	1,0	0,6	0,6	0,6	0,2	0,1	3,8	5,8	
méthyl eugenol <sup>a,g,h</sup>	1399	2000	tr	0,2	tr	0,1	0,1	0,2	-	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	0,2	-	-	tr	tr	-	-	-	-	
isocaryophyllene <sup>c,g</sup>	1416	1594	tr	-	-	-	tr	-	-	-	tr	tr	0,1	tr	0,1	0,1	0,5	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	
davana furane <sup>a,g,i</sup>	1419	1758	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,5	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
$\beta$ -cedrène <sup>g</sup>	1423		0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,2	tr	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
$\beta$ -gurjunene <sup>g</sup>	1433		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0,1	0,1	-	-	-	tr	tr	0,1	0,2	0,1	-	
aromadendrène <sup>g</sup>	1442	1615	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	tr	tr	tr	tr	-	-	tr	-	
$\alpha$ -guaïene <sup>a,c</sup>	1445	1618	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	tr	-	
$\alpha$ -humulène <sup>a,c,f,g,h,i</sup>	1460		tr	tr	tr	tr	0,1	0,2	tr	tr	0,2	0,2	0,1	tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	tr	

Composés	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	Djelfa				Laghouat		Batna		Bordj. Ghdir		BB. Arréridj		Draa Chih		Boussâada		Roumana		Medjedel		Ghardaia		M'sila	
			D1	D2	D'1	D'2	LG1	LG2	BA1	BA2	BG1	BG2	BB1	BB2	DC1	DC2	BO1	R1	R2	M1	M2	G1	G2	MS1	MS2	
alloaromadendrène <sup>a,f,g</sup>	1466	1628	tr	0,1	0,1	0,2	tr	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	tr
trans-éthyl cinnamate <sup>f,i</sup>	1471		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	0,1	tr	0,2	0,2	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	-	-
β-chamigrène	1477		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr		tr	tr	tr	0,1	0,1	0,1	tr	-	tr	0,1	tr	
davanone iso	1478		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
γ-murolène <sup>a,d,g,h</sup>	1480	1691	2,5	1,4	2,1	1,4	0,7	0,3	tr	tr	1,1	0,8	0,8	1,0	0,2	0,5	1,1	2,1	0,8	2,0	2,1	0,6	0,6	4,1	tr	
D germacrène <sup>f,h,i</sup>	1484		tr	tr	-	tr	tr	tr	tr	0,1	-	-	tr	tr	tr	tr		tr	tr	-	-	-	-		0,2	
β-selinène <sup>i</sup>	1488	1652	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	tr	-	-	tr	-	tr	tr	-	-	-	-	
bicyclogermacrène <sup>g,i</sup>	1500	1718	1,0	0,4	0,9	0,6	0,5	0,4	0,1	0,1	1,2	1,1	0,4	0,3	0,2	0,2	0,5	0,6	tr	0,1	0,1	0,3	0,3	0,4	0,1	
davana éther <sup>a,d,g,i</sup>	1501		14,3	0,4	3,6	0,5	2,5	0,5	0,1	0,1	5,1	4,3	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
α-murolène <sup>a,f,g,h</sup>	1503	1706	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,1	-	-	tr	0,1	
pentadecane <sup>h</sup>	1505																	tr	tr	-	-	-	-	tr	tr	
γ-cadinène <sup>a,f</sup>	1515	1925	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	tr	tr	tr	tr	-	-	
cubebol	1518	1926	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,1		-	0,1	tr	0,3	0,1	
artedouglacia oxyde C <sup>g</sup>	1522		0,9	0,8	tr	tr	-	-	0,3	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
davana éther iso <sup>a,g,i</sup>	1523		1,0	0,5	0,5	0,2	1,0	0,9	0,1	tr	1,5	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
davana éther iso <sup>a,g,i</sup>	1524		0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
davana éther iso <sup>a,d</sup>	1525		0,6	0,4	0,5	0,3	1,2	1,2	-	-	0,6	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
δ-Cadinène <sup>a,c,d,f,h</sup>	1527	1742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr
cadina-1,4-diène	1533	2056	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	tr	tr			tr	tr	
artedouglacia oxyde A <sup>g</sup>	1537		tr	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B-germacrène <sup>h</sup>	1555	2057	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,1	tr			-	-	
davanone iso <sup>g</sup>	1557		0,6	0,3	0,5	0,4	1,0	0,6	0,1	tr	0,5	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
artedouglacia oxyde D	1569		0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,5	0,2	0,5	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
davanone iso <sup>g</sup>	1560	2015	0,7	0,4	1,3	1,0	1,6	1,2	0,2	0,1	1,1	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ledol <sup>a</sup>	1563	2020	tr	0,1	-	-	tr	0,2	tr	tr	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	tr	tr	tr	0,2	tr	tr	tr	
trans-nerolidol <sup>d,f,i</sup>	1564	2032	0,2	0,1	0,1	0,1	0,5	0,3	tr	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	0,2	0,2	0,1	0,1	tr	0,2	tr	0,2	tr	
spathulénoï <sup>b,d,f,g,h,i</sup>	1569	2115	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,1	tr	0,1	tr	0,4	0,2	1,5	1,1	tr	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	tr	0,7	0,1	

Composés	RI <sup>1</sup>	RI <sup>2</sup>	Djelfa				Laghouat		Batna		Bordj. Ghdír		BB. Arréridj		Draa Chih		Boussâada		Roumana		Medjedel		Ghardaia		M'sila	
			D1	D2	D'1	D'2	LG1	LG2	BA1	BA2	BG1	BG2	BB1	BB2	DC1	DC2	BO1	R1	R2	M1	M2	G1	G2	MS1	MS2	
caryophyllène oxyde <sup>d,f,g,h,i</sup>	1583	1975	0,9	0,9	1,9	2,0	0,6	0,7	0,5	0,3	1,2	0,9	0,2	0,1	1,3	1,0	tr	0,3	0,2	tr	tr	tr	-	0,2	0,1	
globulol <sup>g</sup>	1585	2066	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0,1	0,1	0,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
β-copaèn 4-α ol <sup>g,i</sup>	1588	2140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,4	0,3	0,2	0,8	0,3	0,2	tr	tr	0,6	0,1	0,4	0,1	
davanone <sup>a,d,e,g,i</sup>	1590	2015	50,3	34,2	36,7	32,4	46,7	40,4	38,0	23,6	39,6	37,3	-	-	0,6	0,4	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
viridiflorol <sup>f</sup>	1594	2075	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	tr	0,4	0,1	0,6	0,2	
Temps d'isolement (min)			150	15	150	15	150	15	150	15	150	15	150	15	150	15	150	15	150	15	150	15	150	15	150	
% d'identification			83.9	61.4	72.2	66.2	65.2	69.7	68.3	82.5	79.5	70.1	95.8	94.0	97.8	95.0	94.4	98.3	94.7	97.3	93.2	73.7	75.8	87.1	95.6	
Monoterpène hydrocarboné			1.8	0.6	3.9	3.4	2.2	6.3	2.9	4.1	3.6	2.6	7.7	3.0	5.5	4.4	8.7	8.6	3.3	8.1	7.4	5.4	4.5	4.4	2.0	
Sesquiterpène hydrocarboné			3.7	2.2	3.3	2.7	1.4	2.1	0.4	0.5	3.6	3.0	2.2	1.5	2.1	2.2	3.0	3.0	1.0	0.9	0.6	1.0	0.7	1.3	0.5	
Cétones			55.0	44.5	41.9	39.8	52.2	45.8	56.5	67.0	44.4	40.8	73.0	76.3	78.8	79.0	61.5	70.0	69.4	61.8	60.6	37.8	50.9	71.1	84.5	
Alcools			2.6	3.2	7.7	8.5	3.8	5.1	0.9	4.1	5.7	4.6	5.5	4.9	6.4	5.6	11.1	7.1	4.2	11.3	10.7	21.5	9.7	4.7	4.8	
Ether oxydes			18.6	4.2	11.7	8.4	3.6	5.5	3.0	3.6	18.2	16.3	5.1	3.0	2.7	2.2	8.5	6.8	6.6	13.4	12.4	5.2	8.5	3.5	2.7	
Esters			1.5	1.5	2.3	2.2	1.4	2.4	0.7	2.2	1.7	1.3	1.1	4.6	1.5	1.0	1.5	12.1	6.2	1.4	1.1	2.2	1.1	1.5	0.7	
Divers			0.7	0.7	1.4	1.2	1.1	2.5	4.4	1.0	2.3	1.5	1.2	0.7	1.0	0.8	0.1	0.7	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.4	0.6	0.4

tr : <0,05 ; 1 : hydrodistillation ; 2 : micro-onde.

RI<sup>1</sup> and RI<sup>2</sup>: indices de réfraction déterminé respectivement sur les colonnes capillaires HP5-MS and HP-Wax en programmation de température selon Van Den Dool et Kratz<sup>15</sup>; Références bibliographiques : a (11, 26); b (83); c (79); d (96, 100); e (75, 77); f (107), g (102); h (90, 91, 95); i (110).

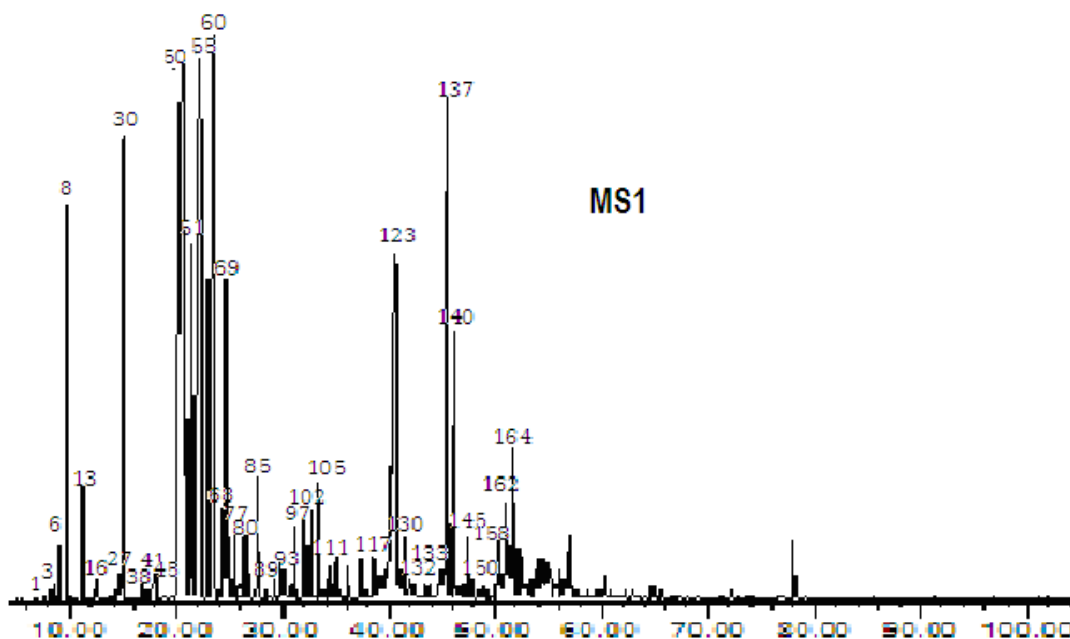


Figure 8. Chromatogramme de l'essence de M'sila obtenue par hydrodistillation

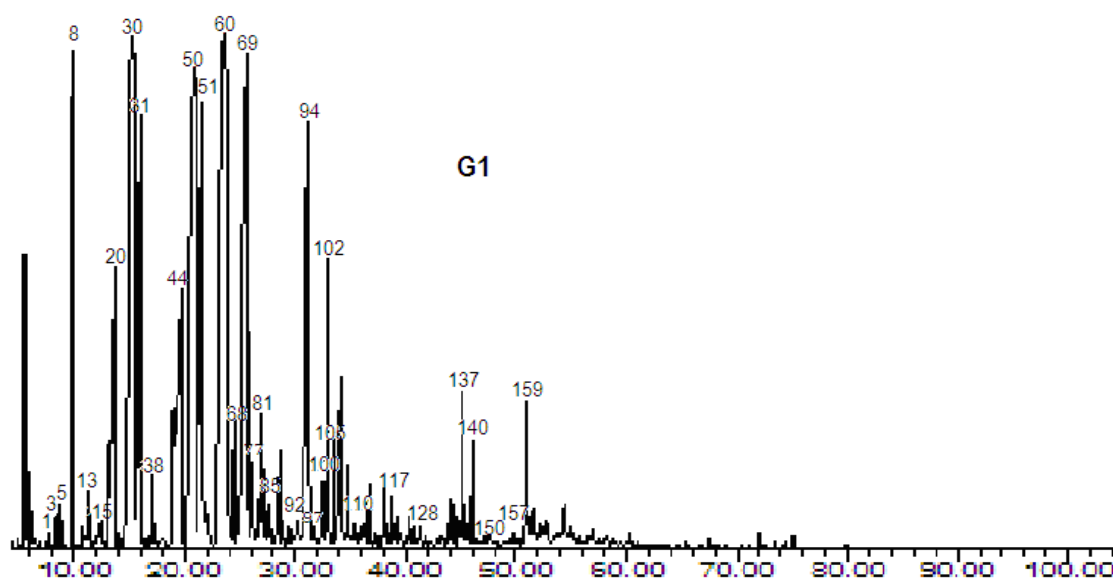


Figure 9. Chromatogramme de l'essence de Ghardaïa obtenue par hydrodistillation

Nous remarquons que les nombres de pics obtenus sur les chromatogrammes en courant ionique total des essences d'*A. herba-Alba* des différentes régions sont inférieurs aux nombres de spectres indexés car un pic peut représenter deux à trois constituants mal séparés (tableau 9). Le détecteur utilisé en GC/MS, de par sa grande sensibilité peut permettre une détection des constituants à l'état de traces. Pour certains nombres de spectres, nous n'avons pas pu déterminer avec précision le composé correspondant par manque de spectre de référence.<sup>125-129</sup>

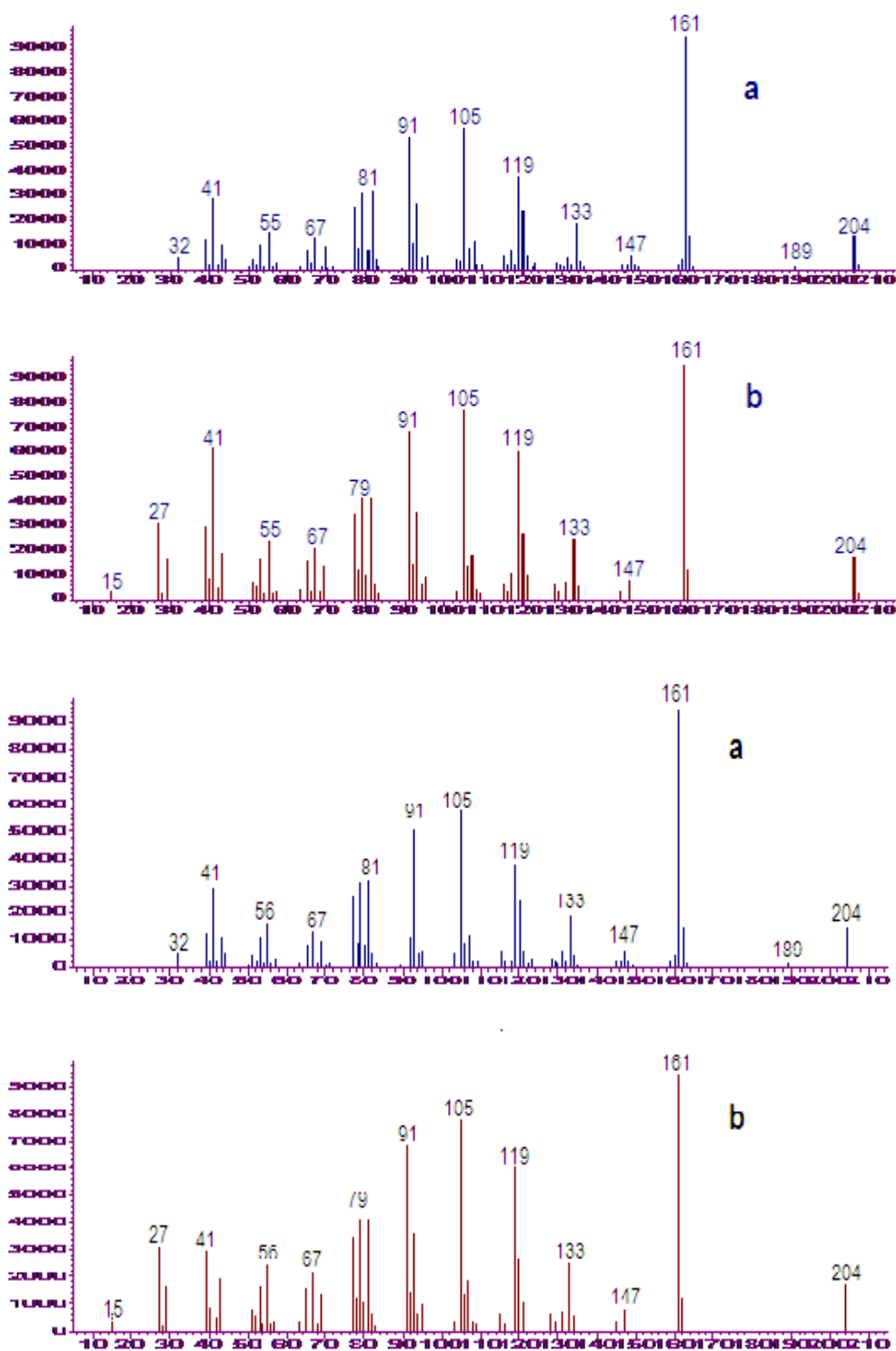
**Tableau 9.** Pics dénombrés

Localités	Echantillons	Nombres de pics	Nombres de Spectres indexés	Nombres de constituants identifiés
<b>Djelfa</b>	D1	184	210	102
	D2	179	206	92
	D'1	188	202	91
	D'2	190	208	92
<b>Laghouat</b>	LG1	188	221	90
	LG2	192	214	91
<b>Batna</b>	BA1	180	224	93
	BA2	174	217	86
<b>Bordj Ghédir</b>	BG1	189	219	96
	BG2	181	209	89
<b>Bordj Bou Arreridj</b>	BB1	191	209	98
	BB2	189	203	96
<b>Draa Ech Chih</b>	DC1	188	206	93
	DC2	183	209	91
<b>Boussaâda</b>	BO1	158	189	88
<b>Roumana</b>	R1	165	198	115
	R2	155	201	99
<b>Medjedel</b>	M1	170	205	113
	M2	173	209	116
<b>Ghardaia</b>	G1	181	211	88
	G2	184	207	88
<b>M'sila</b>	MS1	174	203	109
	MS2	171	203	106

1 : HD ; 2 : MD

Le couplage GC/MS sur une colonne capillaire de haute résolution nous a permis de disposer d'un grand nombre de spectres de masse. Cependant, nous avons été confrontés à de nombreux problèmes lors de leur exploitation vu la similitude des spectres de masse entre les composés, en particulier en ce qui concerne les mono et les sesquiterpènes.

Ceci est particulièrement le cas des monoterpènes ayant un pic de base 93, tel que le santalina triène, l' $\alpha$ -pinène, l' $\alpha$ -thujène, le tricyclènes...etc mais l'ambiguïté est levée grâce aux données de rétention. Pour les sesquiterpènes, le problème est plus délicat vu le nombre important de ces composés dont les indices de rétention ne sont pas différenciables<sup>129</sup> tels que l'aromadendrène et l'alloaromadendrène ; le  $\gamma$ -muurolène et le D germacrène (figure 10), ainsi que les esters.<sup>130</sup> Ces familles de composés peuvent présenter des spectres de masse très voisins.<sup>131, 132</sup>



**Figure 10.** Spectre de masse en IE de  $\gamma$ -murolène et de D-germacrène respectivement

- a- Essences étudiée
- b- Bibliothèque de spectre de masse

Nous avons aussi constaté une interversion dans l'ordre d'élution de certains composés qui peut être due à deux causes principales.<sup>133</sup>

- La programmation de température au niveau de la colonne n'étant pas parfaitement linéaire d'une expérience à une autre<sup>134, 135</sup> il en sera de même pour l'élution des composés ayant des temps de rétention voisins, donc plus ou moins sensibles aux changements de température. D'autre part, la pression d'entrée du gaz vecteur étant maintenue constante, il s'ensuit que le débit du gaz vecteur diminue lorsque la température augmente.
- Le vide poussé au niveau du spectromètre de masse peut entraîner une variation non linéaire de la température de vaporisation de chaque soluté dans la colonne et influencer son élution.<sup>136</sup>

De ce fait, la proposition de chaque composé est basée à la fois sur la comparaison des spectres, l'ordre d'élution et les indices de rétention. Des exemples d'interversions de pics ont été rencontrés au cours de nos analyses, effectuées sous les mêmes conditions expérimentales; il s'agit du  $\beta$ -pinène et de l'octène-3ol, du trans-nerolidol et du ledol,

Par ailleurs, des interférences de spectres ont été également rencontrées dans certains cas de co-élution. Si l'utilisation de deux colonnes de polarités différentes peut résoudre le problème, il n'en demeure pas moins que de nouvelles co-élution de composés apparaissent.<sup>138</sup> Pour cela, les indices de rétention de Kovats en programmation de température, ainsi que l'ordre d'élution sur colonne capillaire apolaire ont joué le rôle de données filtre pour trancher dans les cas douteux. En général, l'ordre d'élution globalement observé par famille est le suivant : hydrocarbures monoterpéniques, alcools et aldéhydes, esters puis les hydrocarbures sesquiterpéniques et les sesquiterpènes oxygénés. Le temps de rétention d'un ester est le plus souvent plus élevé que celui de l'alcool correspondant (ex : bornéol et bornyl acétate,  $\alpha$  terpinène et terpinyl acétate, santalina alcool et santalinyll acétate, thujanol et thujyl acétate)

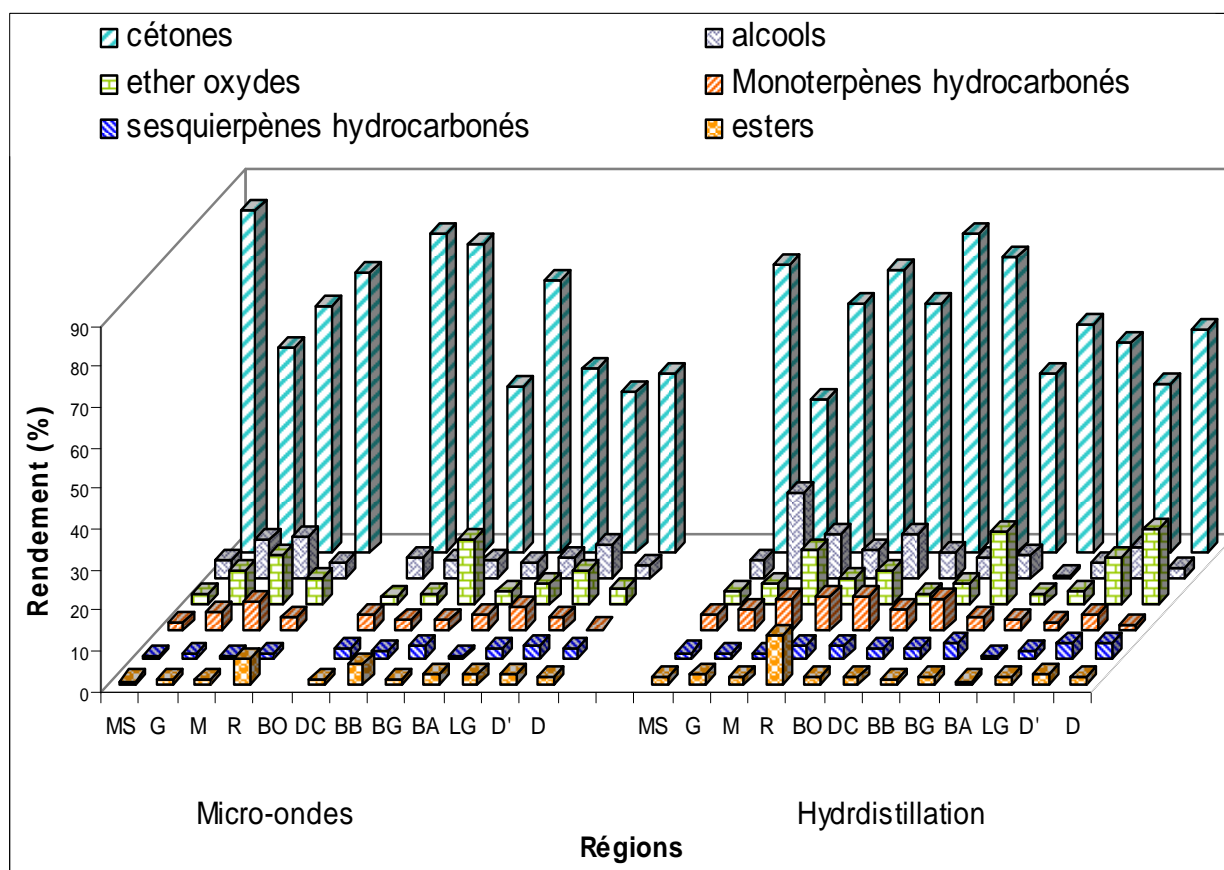
Il est à noter que les résultats donnés par la recherche informatisée n'ont été utilisés que pour les composés pour lesquels, nous n'avons pas trouvé de spectre de référence dans la littérature, comme c'est le cas du 1,6-diméthyl hept-1,3,5-triène, du o-isopropenyl toluène, du filifolone, du davana ether...

Au regard de nos résultats, nous constatons une influence très importante de la situation géographique de l'échantillon sur la composition chimique des huiles essentielle. La combinaison de la GC et de la GC/MS, nous a permis d'identifier au total 164 constituants, représentant entre 65,2 et 98,3% de la composition totale pour les essences extraites par hydrodisillation et entre 61,4 et 95,6% pour celles obtenues par micro-onde. La composition chimique des huiles essentielles est illustrée dans le tableau 7. L'analyse des échantillons de l'huile extraite de la plante provenant des onze régions d'Algérie a montré des différences importantes dans leur composition des points de vue quantitatif et qualitatif. Sur les 164 composés identifiés seulement 30 constituants sont communs à toutes les essences et 45 ont été mis en évidence pour la première fois dans les huiles essentielles examinées en Algérie dont 24 qui n'ont jamais été signalés dans les essences d'*A. herba-alba*.

Tous les échantillons d'huile essentielle sont qualitativement proches dans la mesure où ils sont tous caractérisés par les mêmes composés dominants. Ils sont tous riches en cétones leur proportion varie entre (37,8% et 71,1%) pour HD et (39,8% à 84,5%) pour MD suivi par les alcools (0,9% à 21,5%) pour HD et (3,2% à 10,7%) pour MD, puis par les éthers oxydes (2,7% à 18,6%) pour HD et (2,2% à 16,3%) pour MD et enfin par les monoterpènes (1,8% à 8,7%) pour HD et (0,6% à 7,4%) pour MD et les sesquiterpènes (0,4% à 3,7%) pour HD et (0,5% à 3,0%) pour MD alors que les esters n'excèdent pas les 4,6% à l'exception de l'huile de Roumana (R) qui atteint les 12,1%. Seules les cétones sont quantitativement plus importantes pour l'extraction par MD pour la totalité des essences, pour les autres familles la composition pour l'HD est plus importante (figure 11).

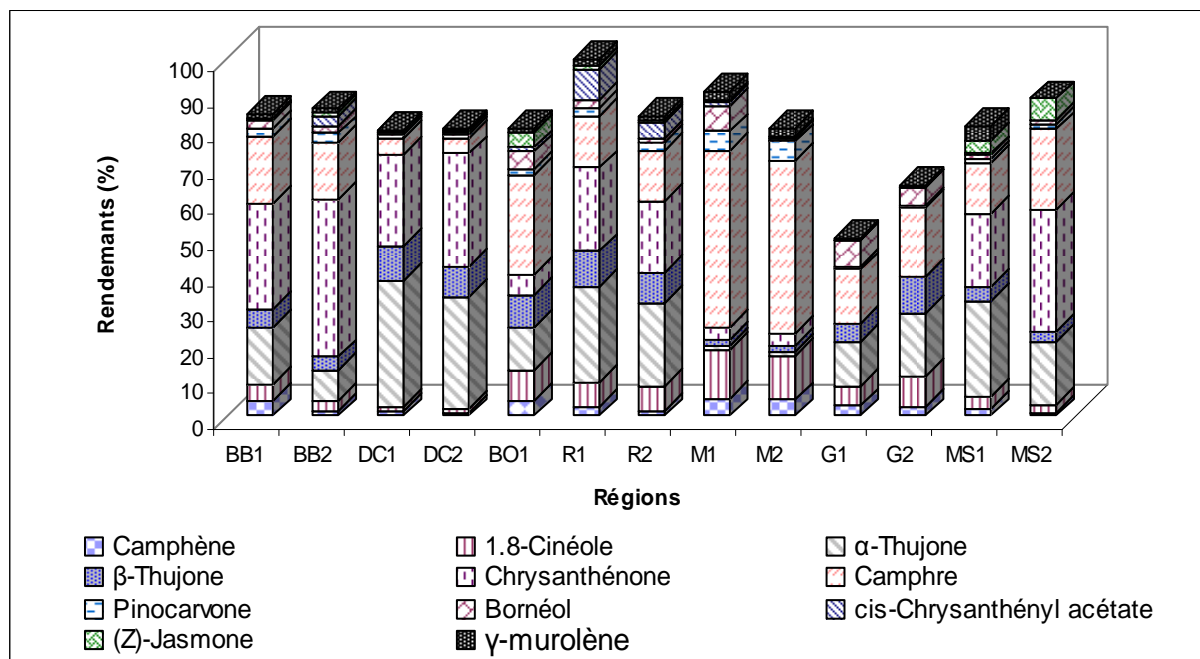
Parmi les centaines de composants identifiés, huit d'entre eux (cinéole, thujones, chrysanthène, camphre, bornéol, éther davanique et davanone) pourraient être considérés comme éléments majeurs, avec des concentrations supérieures à 10% de l'huile totale.

Il est à remarquer, d'après les chromatogrammes obtenus, que les constituants majoritaires dans 13 essences sont le 1,8-cinéol, les thujones, la chrysanthène et le camphre. Les 10 autres essences présentent des constituants majoritaires tels que l'éther davanique et la davanone à l'exception de l'huile essentielle de Batna dont la majeure partie est la davanone et le chrysanthène. Ainsi, nos essences peuvent être rassemblées en deux groupes.



**Figure 11.** Rendements relatifs des différentes familles chimiques des huiles essentielles d'*A.herba-alba*

**Le groupe A :** Il représente les 13 essences obtenues par HD (1) et MD (2) de Bordj Bou Arreridj (BB), Draa Chih (DC), Boussaâda (BO), Roumana (R), Medjedel (M), Ghardaïa (G) et M'sila (MS). Elles montrent (figure 12) une prédominance en camphre (4,7% pour DC1 à 49,3% pour M1) et (4,5% pour DC2 à 48,1% pour M2), l' $\alpha$ -thujone (1,0 % pour M1 à 35,1% pour DC1) et (1,0 % pour M2 à 31,2% pour DC2), la chrysanthène (3,2% pour M1 à 29,6 pour BB1) et (3,3% pour M2 à 43,8% pour BB2), la  $\beta$ -thujone (2,1% pour M1 à 9.7% pour DC1 et R1) et (1,9% pour M2 à 9,9% pour G2), le 1,8 cinéol (1,4% pour DC1 à 13,4% pour M1) et (1,2% pour DC2 à 12,4% pour M2), le pinocarvone (0,9% pour G1 à 5,6% pour M1) et (0,7% pour G2 à 5,5% pour M2), le bornéol (0,6% pour DC1 à 7,3% pour M1 et G1) et (0,6% pour DC2 à 7,1% pour M2), le camphène (1,2% pour DC1 à 5,0% pour M1) et (0,6% pour MS2 à 4,5% pour M2), le  $\gamma$ -muurolène (0,2% pour DC1 à 4,1% pour MS1) et (tr pour MS2 à 2,1% pour M2), et le cis-chrysanthényl acétate (tr pour G1 à 8,2% pour R1) et (tr pour G2 à 4,8% pour R1).



**Figure 12.** Variation de la teneur des composés prédominant dans le groupe A

Sur les 132 composés identifiés 45 sont communs aux 13 essences et 34 mis en évidence pour la première fois dans les huiles Algérienne dont 19 pour la première fois dans l'*A. herba-alba*. Les proportions de la plupart des constituants varient considérablement d'une région à une autre ou d'une méthode d'extraction à une autre pour une même région donnée. Quelques observation son à noter :

- ❖ L'échantillon de G (Ghardaia) est caractérisé par la forte présence des alcools tels que le yomogi alcool (4,1% pour HD et 2,5% pour MD), le santalina alcool (4,3% pour HD et 3,0% pour MD) et l'artemisia alcool (5,1% pour HD et 3,6% pour MD) qui eux ce trouve en quantité moindre ou en trace dans toute les autres essences, ainsi que le bornéol (7,3% pour HD et 4,7% pour MD). La présence relativement importante du carvone (3,3% pour HD et 2% pour MD) est aussi à signaler. Les composés prédominants sont l' $\alpha$ -thujone (12,5% pour HD et 17,7% pour MD) et le camphre (14,9% pour HD et 19,6% pour MD) qui sont plus importants pour l'huile extraite par MD.
- ❖ L'échantillon de Medjdel (M) est lui dominé par le 1,8-cinéol (13,4% pour HD et 12,4% pour MD), le camphre (49,3% pour HD et 48,1% pour MD), le bornéol (7,3%

pour HD et 7,1% pour MD) et le pinocarvone (5,6% pour HD et 5,5% pour MD) qui semble être le plus important comparés aux autres essences.

- ❖ L'huile de M'sila (MS) est constituée par les composés majoritaires comme l' $\alpha$ -thujone (26,8% pour HD et 17,3% pour MD), la chrysanthénone (20,5% pour HD et 34,3% pour MD) et le camphre (14,1% pour HD et 22,2% pour MD) et contient également la teneur la plus élevée en  $\gamma$ -muroène (4,1%).
- ❖ L'essence de Bordj Bou Arreridj (BB) est caractérisée par l' $\alpha$ -thujone (15,9% pour HD et 8,6% pour MD), la chrysanthénone (29,6% pour HD et 43,8% pour MD) et le camphre (18,6% pour HD et 16,0% pour MD). Nous remarquons une grande variation de la composition chimique en chrysanthénone avec un taux très important pour la MD.
- ❖ Draa Ech Chih (DC) se caractérise par l' $\alpha$ -thujone (35,1% pour HD et 31,2% pour MD), la chrysanthénone (25,4% pour HD et 31,6% pour MD) et la  $\beta$ -thujone (9,7% pour HD et 8,3% pour MD).
- ❖ L'échantillon de Roumana (R) est dominé par l' $\alpha$ -thujone (27,1% pour HD et 23,7% pour MD), la chrysanthénone (23,3% pour HD et 20,0% pour MD), le camphre (14,5% pour HD et 14,3% pour MD) et la  $\beta$ -thujone (9,7% pour HD et 8,2% pour MD).
- ❖ L'huile essentielle de Boussaâda (BO), quant à elle, ne concerne que l'HD car l'extraction par MD n'a pu donner d'essence. Les composés majoritaires sont l' $\alpha$ -thujone (12%) et le camphre (28,0%)

Des constituants ont été trouvés pour la première fois dans les huiles Algériennes du groupe A tels que l'artémisia triène, le thuja 2,4(10) diène, le 1,6-diméthyl hepta-1,3,5-triène, l'artémisia alcool iso, le terpinène 1-ol, le  $\delta$ -terpinéol, l'artemisyl acétate, l'iso bornyl formate, le trans-verbenyl acétate, le terpinène-4ol acétate, le bornyl propionate, le  $\alpha$ -guaïène, le  $\beta$ -chamigrène, le  $\beta$ -selinène, le cubebol et le  $\beta$ -copaène-4- $\alpha$ -ol.

Certains de ces constituants sont identifiés pour la première fois telque le thuja 2,4(10) diène, le 1,6-diméthyl hepta-1,3,5-triène, l'artémisia alcool iso, le terpinène 1-ol, le  $\delta$ -terpinéol, l'artemisyl acétate, l'iso bornyl formate, le trans-verbenyl acétate, le  $\beta$ -chamigrène, le cubebol et le  $\beta$ -copaène-4- $\alpha$ -ol (figure 13).

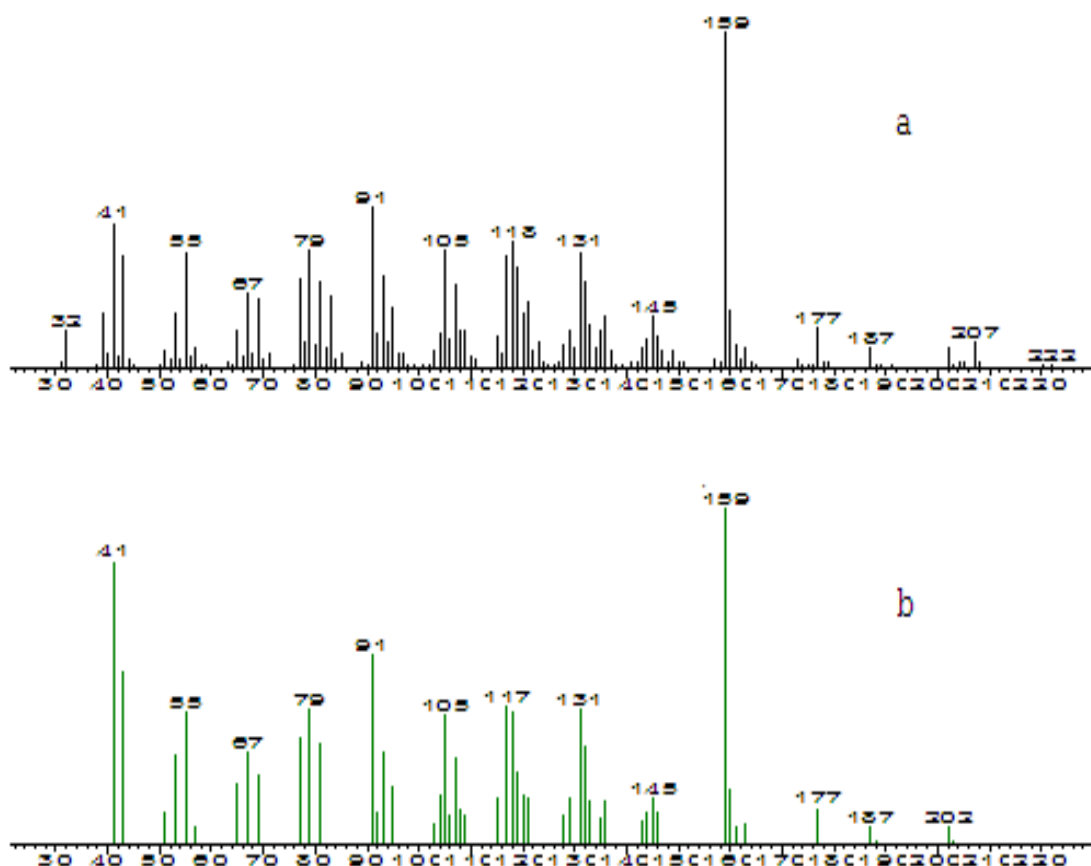
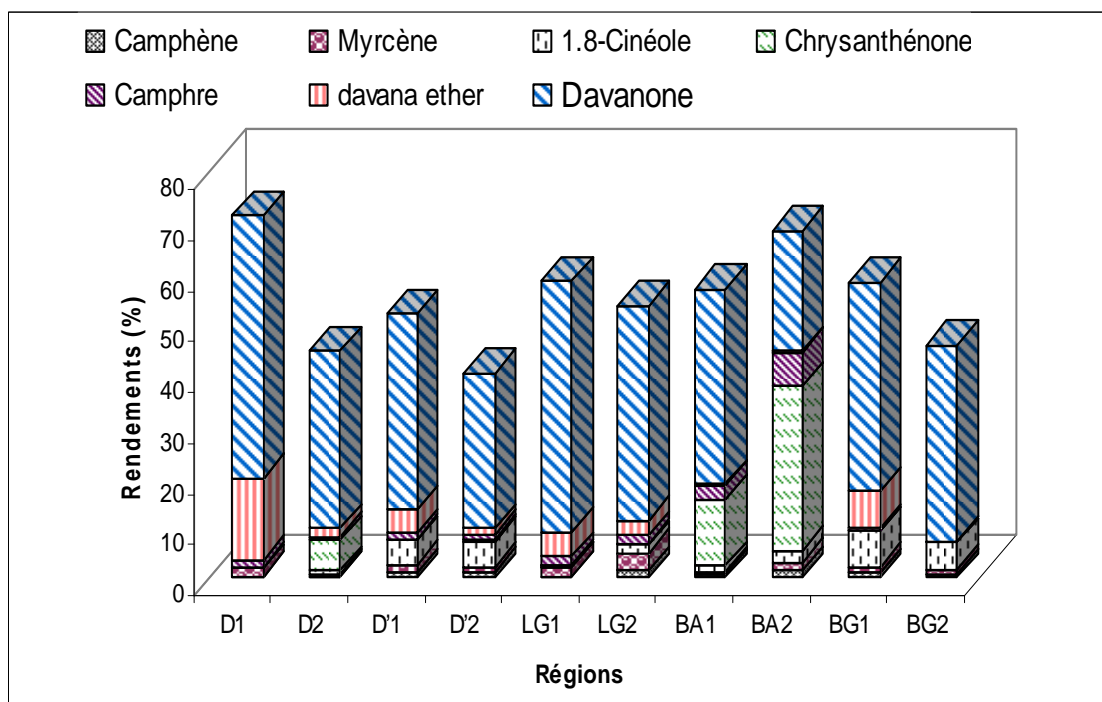


Figure 13. Spectre de masse en IE de  $\beta$ -copaèn-4- $\alpha$ -ol

- a- Essences étudiée
- b- Bibliothèque de spectre de masse

**Le groupe B :** Il représente les 10 huiles essentielles restantes de Djelfa (D et D'), Laghouat (LG), Batna (BA) et Bordj Ghédir (BG) obtenus par HD (1) et MD (2) qui sont dominés (figure 14) par la davanone (36,7% pour D'1 à 50,3% pour D1) et (23,6% pour BA2 à 40,4% pour LG2) avec ses trois isomères et le davana éther (0,1% pour BA1 à 14,3% pour D1) et (0,1% pour BA2 à 4,3% pour BG2) et trois isomères pour les essences de D1, D2, D'1, D'2, LG1, LG2 déjà signalés sur les huiles essentielles de la Tunisie<sup>111</sup> alors qu'en Espagne<sup>97, 101</sup> et en Algérie<sup>103</sup> seulement deux isomères ont été identifiés comme c'est le cas des huiles de BG1 et BG2 et seulement un isomère dans les échantillons de BA1 et BA2. Au Maroc quatre isomères de davana éther ont été décrits dans l'huile de *A. herba alba*.<sup>11, 26, 138, 139</sup>



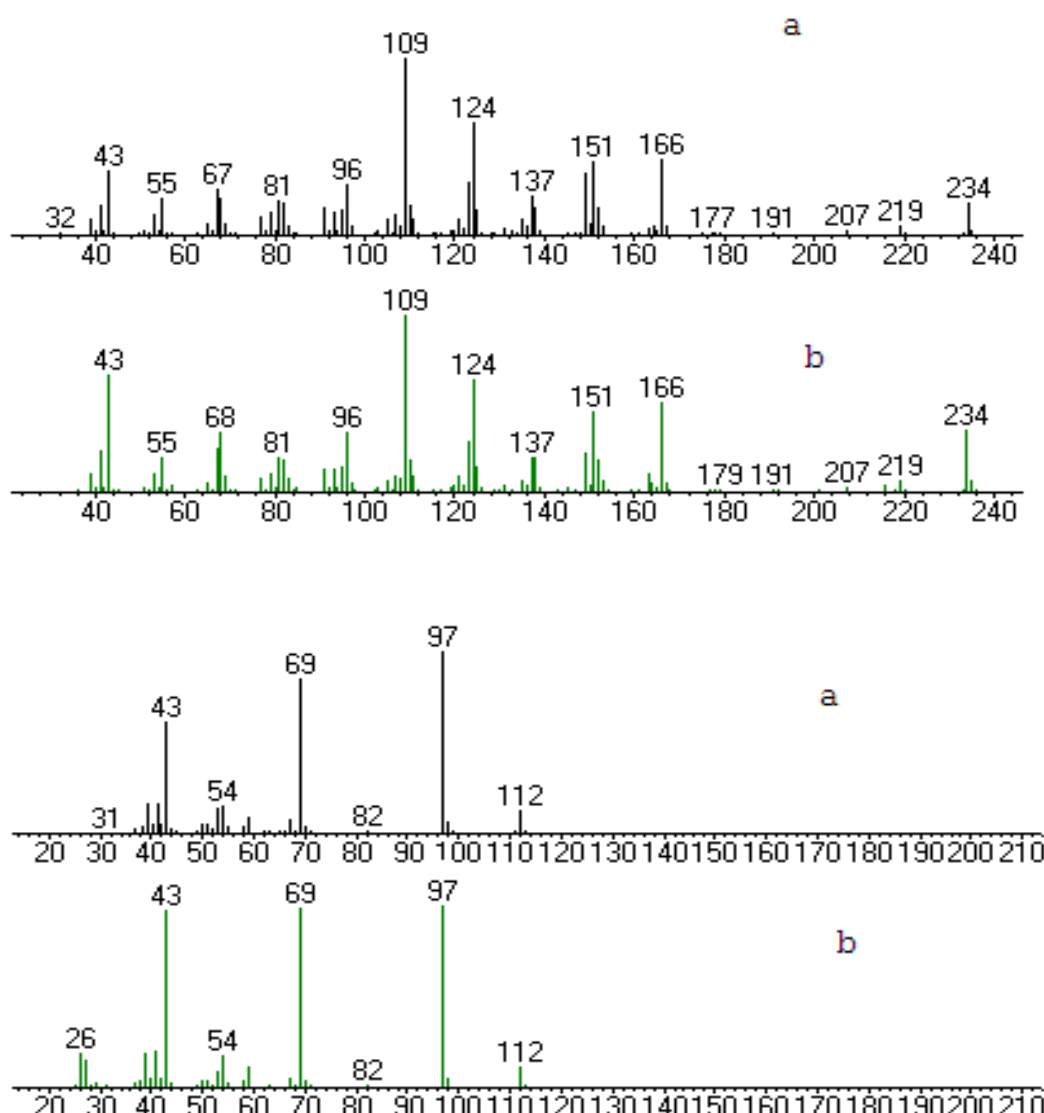
**Figure 14.** Rendement des composés prédominants dans le groupe B

119 constituants sont identifiés dont 50 communs aux 10 échantillons des huiles essentielles et 30 mis en évidence pour la première fois dans les huiles Algériennes dont 15 pour la première fois dans l'*A. herba-alba*. Les teneurs varient également considérablement pour la plupart des régions et pour les méthodes d'extractions pour une même région.

- ❖ l'échantillon de Batna (BA) est caractérisé par la davanone (38,0% pour HD et 23,6% pour MD) et le chrysanthénone (13,1% pour HD et 32,3% pour MD). Les teneurs des constituants sont inversées pour les deux méthodes d'extraction et la chrysanthénone est plus importante pour la MD.
- ❖ L'essence de D (Djelfa) est dominée par la forte présence de davanone (50,3% pour HD et 34,2% pour MD) et le davana éther (14,3% pour HD et 0,4% pour MD).
- ❖ Les autres échantillons sont tous caractérisés par la forte teneur en davanone.

Des constituants n'ont été trouvés que dans les essences du groupe B pour la première fois en Algérie tels que l'isomère du davana éther des trois identifiés (figure 16), l'ethyl tiglate, le 5,5-dimethyl-2(5H)-furanone (figure 15), l'allyl tiglate, le  $\beta$ -isophorone, le cis-arbusculone, le lavender lactone iso, le trans-arbusculone, les trois isomères de davanone des quatre mis en évidence sachant qu'un seul a été identifié jusqu'à présent<sup>26, 96, 100</sup>, l'artedouglacia oxyde D et le cadina-1,4-diène. Certains de ces composés ont été identifiés pour la première fois

l'isomère du davana éther, l'allyl tiglate, le lavender lactone iso, la davanone, l'artedouglacia oxyde D et le cadina-1,4-diène.

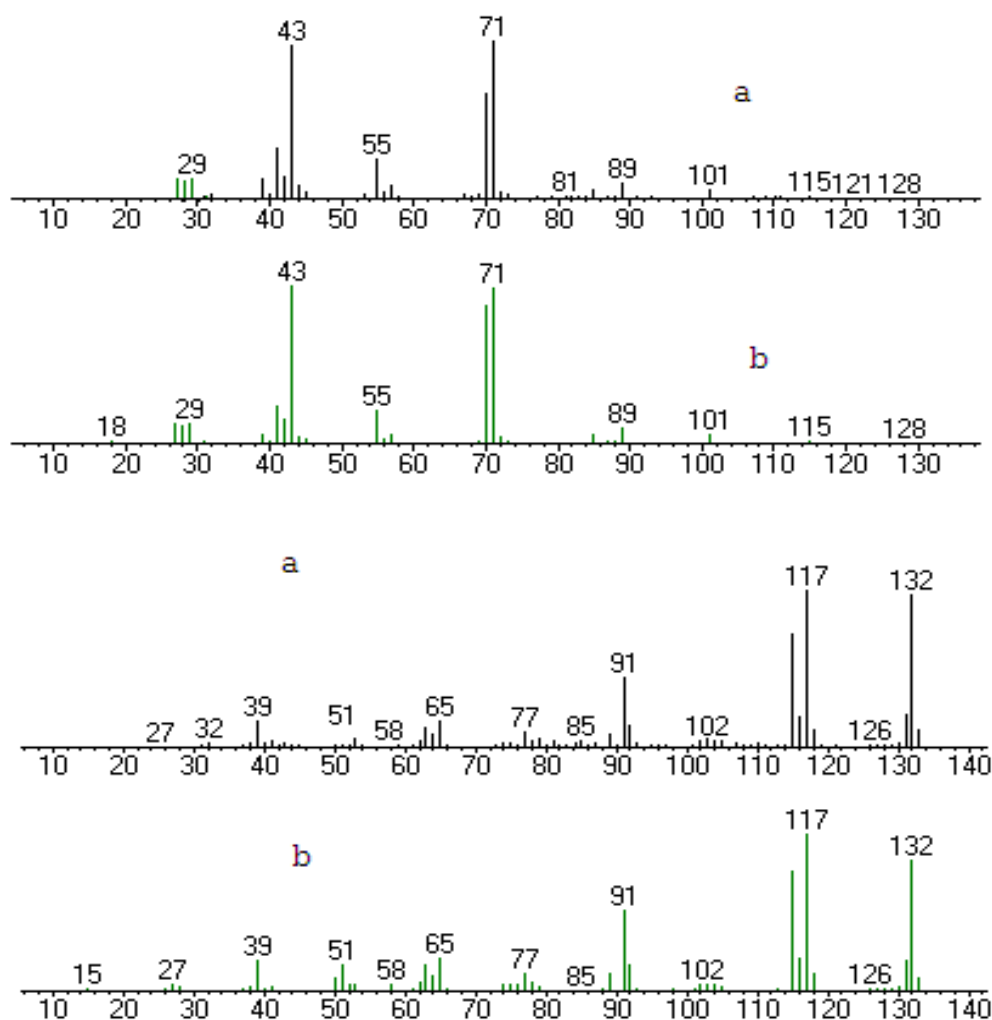


**Figure 15.** Spectre de masse en IE du davana éther et du 5,5-dimethyl-2(5H)-furanone

- a- Essences étudiée
- b- Bibliothèque de spectre de masse

Des constituants communs à toutes les essences sont signalés pour la premières fois dans l'Armoise Algérienne : ce sont l'o-isopropenyl toluene (figure 16), le propanoïque acid-2methyl,2methyl butyl ester (figure 16), le bergamal, le trans-decahydro naphthalène, l'artémisia kétone, le cis-sabinène hydrate, le trans-sabinène hydrate, l'isophorone, le trans-p-menth-2-en-1ol, le trans-verbénol, le santalinyl acétate, le trans-ocimenone, le néo-thujyl acétate, l'lyratyl acétate, l'isobornyl acétate, le sabinyl acétate, le trans-pinocarvyl acétate,

l'lyratyl propionate, le ledol, dont certains pour la première fois : l'o-isopropenyl toluène, le propanoïque acid-2methyl,2methyl butyl ester, le bergamal, le trans-décahydro naphthalène, le trans-verbénol, le trans-ocimènone, le néo-thujyl acétate, l'isobornyl acétate et le trans-pinocarvyl acétate



**Figure 16.** Spectre de masse en IE de l'o-isopropenyl toluène et du propanoïque acid-2 méthyle, 2 méthyle butyle ester

a- Essences étudiée  
b- Bibliothèque de spectre de masse

La MD ne favorise pas l'extraction d'éther et de cétone mono et sesquiterpénique ; par contre, elle favorise l'extraction du chrysanthénone par rapport à l'HD pour toutes les essences.

Pour le procédé d'extraction MD, certains travaux montrent que les composés oxygénés sont globalement mieux extraits par les micro-ondes,<sup>140</sup> alors que d'autres considèrent que se sont

principalement les composés cétoniques, les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques seulement qui sont favorisés par le procédé assisté par micro-ondes.<sup>122, 141</sup> Seulement dans nos essences la teneur des hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques sont pratiquement favorisés par l'extraction par HD ou identiques aux deux méthodes.

Alors, il est difficile de trancher sur ce problème et de comparer les résultats obtenus puisque les conditions de travail et la nature des plantes utilisées sont totalement différents d'un auteur à un autre. D'où il convient de mener des études basées sur des conditions opératoires identiques pour pouvoir comparer les résultats et se prononcer sur l'aspect quantitatif et qualitatif de l'extraction par micro-ondes.

- Ces compositions chimiques obtenues par HD notamment sont sensiblement similaires aux données de la littérature et la plupart de ces huiles essentielles peuvent être classées dans les chémotypes d'*A. herba-alba* illustrés dans le tableau 10.

**Tableau 10.** Chémotypes proposés

Extraits	Nombres de constituants identifiés	Chemotypes
D1	102	davanone-davana éther
D2	92	davanone
D'1	91	davanone
D'2	92	davanone
LG1	90	davanone
LG2	91	davanone
BA1	93	davanone-chrysanthénone
BA2	86	chrysanthénone-davanone
BG1	96	davanone
BG2	89	davanone
BB1	98	chrysanthénone-camphre- $\alpha$ -thujone
BB2	96	chrysanthénone-camphre
DC1	93	$\alpha$ -thujone- chrysanthénone
DC2	91	$\alpha$ -thujone- chrysanthénone
BO1	88	$\alpha$ -thujone-camphre
R1	115	$\alpha$ -thujone- chrysanthénone-camphre
R2	99	$\alpha$ -thujone- chrysanthénone-camphre
M1	113	1,8-cinéole-camphre
M2	116	1,8-cinéole-camphre
G1	88	camphre- $\alpha$ -thujone
G2	88	$\alpha$ -thujone-camphre
MS1	109	$\alpha$ -thujone- chrysanthénone-camphre
MS2	106	chrysanthénone-camphre- $\alpha$ -thujone

Sur les 23 échantillons étudiés 11 ont des compositions similaires aux huiles essentielles de l'*A. herba-alba* publiés (tableau 11). Sept échantillons à davanone trouvent leurs équivalences dans les huiles du Maroc<sup>26</sup> et d'Espagne.<sup>96, 100</sup> Le chemotype à  $\alpha$ -thujone-camphre des huiles essentielles de BO et G2 est signalé dans les échantillons du Maroc<sup>11</sup>, de Tunisie<sup>110</sup> et de l'Algérie;<sup>102</sup> le 1,8-cinéole-camphre est identifié dans les essences M1 et M2 et existe également dans celles d'Espagne<sup>79</sup>, Néguev et Sinai<sup>99</sup> et Tunisie.<sup>110</sup>

**Tableau 11.** Chémotypes proposés par la littérature

Réf	Pays	Chercheurs	Chemotypes
11	Maroc	Benjlali 1980	$\alpha$ -thujone-camphre; camphre; $\alpha$ -thujone; $\beta$ -thujone
73	Maroc	Hurabielle 1981-1982	1,8-cinéole- chrysanthénone-camphre; chrysanthénone
26	Maroc	Benjlali 1982	davanone ; chrysanthényl acéate
75	Néguev	Feuerstein 1986	1,8-cinéole ; cis-chrysanthényl acétate ; cis-chrysanthénol
77	Palestine	Segale 1987	1,8-cinéole- $\alpha$ -thujone-camphre ; dérivés du pinane
78	Palestine	Yaseph 1987	1,8-cinéole ; monoterpènes irréguliers ; bornane ; dérivés de pinènes ; $\alpha$ -thujone
79	Espagne	Feuerstein 1988	1,8-cinéole-camphre
81	Egypte	El Sayed 1990	artémisia kétone
82	Maroc	Ouyahia 1990	$\alpha$ -thujone- $\beta$ -thujone
91	Algérie	Vernin 1995	camphre- $\alpha$ -thujone- chrysanthénone ; camphre
8	Algérie	Benmansour 1999	camphre
99	Néguev et Sinai	Fleisher 2002	1,8-cinéole- $\alpha$ -thujone- $\beta$ -thujone; 1,8-cinéole-camphre; 1,8-cinéole- $\beta$ -thujone ; cis-chrysanthényl acétate-cis-chrysanthénol ; cis-chrysanthénol- cis-chrysanthényl acétate
96,100	Espagne	Salido 2001-2004	Chrysanthénone; davanone; 1,8-cinéole ; cis-chrysanthénol ; p-cymen ; cis-chrysanthényl acétate
102	Algérie	Dahmani 2004	1,8-cinéol- $\alpha$ -thujone camphre ; $\alpha$ -thujone-camphre ; $\alpha$ -thujone ; $\alpha$ -thujone-camphre-cis-jasmone
136	Algérie	Dahmani 2005	davanone
107	Algérie	Dob 2006	camphre-trans-pinocarvéol-chrysanthénol- $\beta$ -thujone
109	Algérie	Giordani 2008	camphre-safranal- $\alpha$ -thujone
110	Tunis	Haouari 2009	1,8-cinéole ; thujone-l'acétate de sabinyl ; $\alpha$ -thujone ; $\alpha$ -thujone-camphre ; 1,8-cinéole-camphre-bornéol ; 1,8-cinéole-camphre

Cependant, de nouveaux chémotypes sont à signaler : le davanone-davana éther dans l'huile de D1, le davanone-chrysanthénone pour les huiles BA1 et BA2 (Batna) alors qu'un autre type de chémotype à déjà été signalé dans cette région<sup>137</sup>, l' $\alpha$ -thujone-chrysanthénone-camphre des échantillons R1, R2 et MS1, le chrysanthénone-camphre- $\alpha$ -thujone pour MS2 et

BB1, l' $\alpha$ -thujone-chrysanthénone pour DC1 et DC2 et le chrysanthénone-camphre de l'huile essentielle de BB2 et enfin le camphre- $\alpha$ -thujone de G1.

Ainsi, en raison de la composition fluctuante des huiles essentielles de l'*A. herba alba*, une telle classification devrait se faire, à notre avis, avec beaucoup de réserve et ne peut concerner qu'une période bien précise du cycle végétal.

Cette étude nous a permis ainsi de confirmer les hypothèses avancées.<sup>11, 90, 91</sup>

- L'*Artemisia herba-alba* posséderait une extraordinaire diversité de chémotypes dont l'existence serait étroitement liée à des variations du patrimoine génétique.
- L'*Artemisia herba-alba* aurait plusieurs comportements dictés par le milieu écologique, l'altitude, la pluviosité, la nature du sol, le climat. Ces facteurs influenceraient ainsi la biosynthèse des constituants volatils.

### **III. Partie expérimentale**

#### **III.1. Chromatographie en phase gazeuse (EIIIa)**

L'analyse qualitative et semi-quantitative des essences par chromatographie en phase gazeuse a été menée sur deux colonnes capillaires de polarités différentes : la HP5 MS apolaire (Hewlett Packard, 30m x 0,32mm x 0,25 $\mu$ m, diméthylpolysiloxane) et la HPWAX polaire (Hewlett Packard, 60m x 0,32mm x 0,15 $\mu$ m, Polyéthylène glycol) en utilisant un chromatographe (Hewlett- Packard 6890) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'azote qui est le gaz vecteur, a respectivement un débit de 0,4 ml/min et 0,9 ml/min dans ces colonnes.

La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur est de 320°C. La température des colonnes est fixée à 60°C durant 8min jusqu'à 250°C durant 15min avec une vitesse de programmation de 2°C par min. Le volume injecté est de 0,2 $\mu$ l en split 1/100. Le pourcentage de chaque constituant dans l'essence est calculé par intégration des aires du chromatogramme. Une série d'alcane linéaires (C<sub>5</sub>-C<sub>30</sub>) est injecté dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétention selon Van Den Dool des constituants des huiles essentielles.

#### **III.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (EIIIb)**

Le chromatographe (Hewlett-Packard 6890) équipé d'une colonne HP5 MS en silice fondue (30m x 0,32mm x 0,25 $\mu$ m) est couplé à un spectromètre de masse Agilent MSD

5973 à impact électronique (IE). La température et la pression de la source ont été fixées à 280°C et  $2.10^{-6}$  Torr. La tension d'ionisation est de 70 eV. Les températures de l'injecteur et du détecteur ainsi que la programmation de la température de la colonne sont identiques à celles utilisées en CPG seule. Le débit du gaz vecteur (hélium) est de 0,5mL/min.

Afin de calculer les indices de rétention des différents constituants, un mélange d'alcane a été injecté sous les mêmes conditions.

### **III.3. Identification des composés**

L'identification des composés séparés sur la colonne apolaire ont été déterminés par comparaison des spectres de chaque constituant à ceux donnés par les bibliothèques Wiley 7N, NIST 02 et NIST 99<sup>124</sup>. Les résultats ont également été confirmés par la comparaison de leurs indices de rétention, par rapport à C<sub>7</sub>-C<sub>28</sub> n-alcane<sup>123</sup> injectés en GC sur les deux colonnes capillaires et en GC/MS dans les mêmes conditions que les huiles. Certains constituants ont été confirmés par l'analyse des étalons dans les mêmes conditions décrites ci-dessus<sup>125-128</sup>. Le pourcentage de la composition de chaque constituant dans les huiles a été estimé par la méthode de normalisation des aires des pics par GC.

## **IV. Conclusion**

L'analyse des échantillons de l'huile extraite de la plante provenant de onze régions d'Algérie a montré des différences importantes dans leur composition du point de vue quantitatif et qualitatif. La composition des différentes huiles essentielles diffère notamment par la teneur des six constituants importants : l' $\alpha$ -thujone, le camphre, la chrysanthénone, le 1,8-cinéole, la davanone et le davana éther.

Seulement onze de ces échantillons peuvent être classés dans les chémotypes d'*A-herba alba* décrits jusqu'à présent, qui sont à davanone,  $\alpha$ -thujone-camphre, et 1,8-cinéole-camphre. Les autres sont de nouveaux chémotypes, davanone-davana éther, davanone-chrysanthénone,  $\alpha$ -thujone-chrysanthénone-camphre, chrysanthénone-camphre- $\alpha$ -thujone,  $\alpha$ -thujone-chrysanthénone, chrysanthénone-camphre et camphre- $\alpha$ -thujone. Néanmoins une telle classification devrait se faire à notre avis, avec beaucoup de réserve et ne peut concerner qu'une période bien précise du cycle végétal.

La diversité des chémotypes serait étroitement liée à des variations du patrimoine génétique, le milieu écologique, l'altitude, la pluviosité, la nature du sol et le climat.

# *Chapitre IV*

**Etude des activités antibactériennes  
et antifongiques des huiles essentielles  
d'*Artemisia herba-alba***

## I. Introduction

La plupart des plantes doivent leur action thérapeutique à un ou plusieurs principes actifs que l'on peut isoler et analyser chimiquement.

Une espèce végétale peut synthétiser plusieurs milliers de constituants chimiques différents :

- Des substances indispensables à la vie de la plante comme les protéines, les lipides, les glucides.
- Les huiles essentielles qui caractérisent le profil de chaque espèce, construisant ainsi une biodiversité moléculaire, qui est à la base entre autres de l'action thérapeutique des plantes.<sup>142</sup>

## II. Résultats et Discussion

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence la variabilité des HE et de leurs constituants chimiques dans les différents échantillons de l'armoise blanche provenant de différents sites bioclimatiques aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif.

Ces résultats nous conduisent à penser que l'activité antimicrobienne de ces HE serait également variable tant sur le plan du spectre d'activité que de l'intensité de l'action. Les composés majoritaires identifiés dans les échantillons soumis à l'analyse sont reportés dans le tableau 12 ci dessous.

**Tableau 12.** Composition chimique des huiles essentielles d'*A.herba alba* obtenus par HD

Composés	Composés majoritaires											
	D	D'	LG	BA	BG	BB	DC	BO	R	M	G	MS
camphène	0,1	0,9	0,1	0,6	0,9	4,1	1,2	4,2	2,7	5,0	2,8	2,1
yomogi alcool	-	-	-	-	-	0,2	0,5	tr	-	0,1	4,1	0,1
1.8-cinéole	0,3	4,8	0,2	1,1	7,2	4,9	1,4	8,5	6,5	13,4	5,2	3,3
santalina alcool	tr	-	tr	tr	0,4	tr	-	0,1	tr	0,1	4,3	tr
artémisia alcool	tr	tr	tr	-	0,2	0,2	0,2	tr	tr	1,1	5,1	-
$\alpha$ -thujone	0,9	0,8	-	0,1	0,7	15,9	35,1	12,0	27,1	1,0	12,5	26,8
$\beta$ -thujone	0,2	0,2	-	0,4	0,6	5,1	9,7	9,2	9,7	2,1	5,5	3,9
chrysanthénone	0,1	0,2	0,2	13,1	tr	29,6	25,4	5,5	23,3	3,2	tr	20,5
camphre	1,2	1,1	1,5	2,8	0,5	18,6	4,7	28,0	14,5	49,3	14,9	14,1
pinocarvone	tr	-	0,1	0,2	0,1	2,4	1,0	1,8	2,3	5,6	0,9	1,4
bornéol	0,1	1,4	0,1	0,3	0,2	1,9	0,6	4,7	2,5	7,3	7,3	0,9
cis-jasmone	0,3	0,3	0,4	tr	0,1	0,6	0,3	4,4	1,0	0,6	0,2	3,8
$\gamma$ -muroène	2,5	2,1	0,7	tr	1,1	0,8	0,2	1,1	2,1	2,0	0,6	4,1
davana ether	16,3	4,7	4,9	0,2	7,2	-	-	-	-	-	-	-
davanone	51,8	38,7	49,5	38,4	41,4	-	0,6	tr	-	tr	tr	tr

D: Djelfa; D': Djelfa; LG: Laghouat; BA: Batna; BG: Bordj Ghdir; BB: Bordj Bou Arreridj; DC: Draa Chih; BO: Boussâada ; R: Roumana; M: Medjebel; G: Ghardaia et MS: M'sila

Lors de cette étude, les huiles essentielles ont été testées sur des souches bactériennes qui aujourd'hui sont impliquées dans diverses infections et dont certaines ont acquis une résistance face aux antibiotiques (EIVa et EIVb).

Quatorze souches ont donc été utilisées quatre bactéries à Gram positif, trois à Gram négatif, cinq champignons et deux levures. Leurs pouvoirs pathogènes sont illustrés dans le tableau 13.

**Tableau 13.** Pouvoirs pathogènes des microorganismes testés dans ce travail

<b>Genre et espèce du microorganisme</b>	<b>Pouvoir pathogène</b>
<b>Bacillus subtilis ATCC6663</b>	Non pathogène mais provoque des infections oculaires
<b>Bacillus coagulans CIP6625</b>	infections oculaires
<b>Micrococcus luteus ATCC9314</b>	Infections de la sphère O.R.L
<b>Staphylococcus aureus CIP7625</b>	Infections de la peau, intoxication alimentaire
<b>Agrobacterium tumefaciens N°2410</b>	Phytopathogène : responsable de tumeurs chez de nombreuses plantes cultivées
<b>Escherichia coli CIP54.8</b>	Septicémie, infections (urinaires, génitales, hépatobiliaires ou digestives), méningites, appendicites entérites, crampes abdominales, diarrhées, vomissements.
<b>Mucor ramannianus NRRL1829</b>	Phytopathogène
<b>Pergillus ochroceus</b>	Toxine pour l'homme
<b>Fusarium oxysporum albedinis CURZA</b>	Phytopathogène : fusariose du palmier dattier
<b>Pinicillium expansum 8932</b>	Non pathogène mais provoque la pourriture des fruits, la contamination des jus et compotes, la patuline.
<b>Fusarium oxysporum lini CINRA</b>	Phytopathogène : fusariose du lin
<b>Candida albicans CLM</b>	Mycoses de la peau
<b>Saccharomyces cerevisiae ATCC4226</b>	Fermentation des matières végétales ou animales

AT.C.C : American Type Culture Collection ; C.U.R.Z.A : Collection de l'Unité de Recherche sur les Zones Arides (Alger) ; C.I.P : Collection de l'Institut Pasteur de France ; C.I.N.R.R : Collection de l'Institut National de Recherche Agronomique Dijon, France ; N.R.Rl : Northern Regional Center(U.S.A) ; C.L.M: Collection du Laboratoire de Microbiologie de l'ENS de Kouba.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différentes huiles essentielles sont reportés dans le tableau 14 et montrent un très bon pouvoir inhibiteur contre toutes les souches bactériennes (CMI ne dépassant pas 10µg/mL).

L'essence de Medjedel (M) inhibe mieux toutes les bactéries à Gram négatif, le *Bacillus coagulans* et le *Staphylococcus aureus* pour les Gram positif, le *Fusarium*

*oxysporum albedinis* et le *Pinicillium expansum* pour les champignons (CMI<0,5µg/mL) sans toutefois que les autres ne dépassent 5µg/mL pour le *Pergillus ochroceus*.

La concentration inhibitrice la plus élevée ; 10µg/mL, est observée sur toutes les bactéries à Gram négatif, le *Bacillus subtilis*, le *Microccus luteus*, le *Pergillus ochroceus* et le *Candida albicans* pour l'essence de Boussaâda (BO), sur toutes les bactéries à Gram positif, le *Pergillus ochroceus* et le *Candida albicans* pour l'huile de M'sila (MS) et le *Candida albicans* pour l'essence de Bordj Ghdir (BG) alors qu'elle inhibe le *Pseudomonas aeruginosa* à une CMI<0,5µg/mL et le *Pinicillium expansum* à 0,5µg/mL.

Par contre l'huile de Ghardaïa (G) révèle un bon pouvoir inhibiteur (CMI<0,5µg/mL) pour les champignons et le *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tableau 14.** Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles d'*A. herba-alba*

Microorganisme	Concentration (µg/mL)									
	BO	MS	G	BG	LG	BB	M	D	D'	BA
<b>Bactérie à gram positif</b>										
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC6663)	10	5	5	5	5	5	1	5	5	5
<i>Bacillus coagulans</i> (CIP6625)	5	5	5	5	5	5	<0,5	5	5	5
<i>Microccus luteus</i> (ATCC9314)	10	5	5	5	5	5	2	5	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> (CIP7625)	2	2	0,5	5	5	1	<0,5	5	5	5
<b>Bactérie à gram négatif</b>										
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (N°2410)	10	10	10	5	10	5-10	<0,5	5	5	5
<i>Escherichia coli</i> (CIP54.8)	10	10	2	5	5	5	0,5	5	5	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CIPA22)	10	10	5	<0,5	5	2	<0,5	5	<0,5	5
<b>Champignons</b>										
<i>Mucor ramannianus</i> (NRRL1829)	2	5	5	2	5	2	2-5	5	2	2
<i>Pergillus ochroceus</i>	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Fusarium oxysporum albedinis</i> (CURZA)	2	5	<0,5	5	2	1	<0,5	2	5	2
<i>Pinicillium expansum</i> (8932)	5	1	<0,5	0,5	0,5	<0,5	<0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Fusarium oxysporum lini</i> (CINRA)	2	5	<0,5	5	5	1	1	5	5	5
<b>Levures</b>										
<i>Candida albicans</i> (CLM)	10	10	5	10	5	5	2-5	5	5	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC4226)	2	2	<0,5	2	1	1	0,5	1	2	1

Les Huiles de Djelfa (D et D') inhibent pratiquement de la même manière toutes les souches bactériennes à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* bactérie à Gram négatif qui a une CMI < 0,5 µg/mL pour Djelfa (D') contre une CMI de 5 µg/mL pour Djelfa (D) et le champignon *Mucor ramannianus* dont la CMI est de 2 µg/mL pour Djelfa (D') et 5 mg/mL pour Djelfa (D).

Les essences de Laghouat (LG) et de Batna (BA) révèlent des CMI similaires pour toutes les bactéries pathogènes et non pathogènes sauf pour la bactérie à Gram positif, le *Agrobacterium tumefaciens* de l'huile de Laghouat (LG) dont la CMI est deux fois celle de Batna (BA) et le *Mucor ramannianus* dont la CMI de Batna (BA) est 2,5 fois moins que celle de Laghouat (LG).

De manière générale, les activités antimicrobiennes et antifongiques de toutes les huiles essentielles sont efficaces contre les bactéries sauf pour l'huile de Boussaâda (BO) et M'sila (MS) où elles montrent une résistance relative aux bactéries à Gram négatif. Cette résistance peut être attribuée au fait que la bactérie est enveloppée dans un antigène imperméable aux composés lipophiles dont certains constituent les huiles essentielles.<sup>143, 144</sup> Parmi tous les échantillons testés, l'huile essentielle de Medjedel (M) est la plus active sur toutes les bactéries et les levures comparées aux autres essences excepté le *Fusarium oxysporum lini* qui lui est mieux inhibé par l'essence de Ghardaïa (G) (CMI < 0,5 µg/mL) contre 1 µg/mL pour Medjedel (M).

Plusieurs auteurs ont attribué les effets antimicrobiens des huiles essentielles à leurs composés majoritaires en synergie avec les composés minoritaires.<sup>144, 145</sup>

L'*A. herba-alba* présente une grande diversité dans la composition chimique ainsi que dans les chémotypes. L'artémisia alcool et le santalina alcool s'avèrent actifs sur les microorganismes.<sup>146, 147</sup> Les alcools monoterpéniques comme l' $\alpha$ -terpinéol, le linalool, l'artémisia alcool et le santalina alcool, le bornéol et le thujanol sont la cause du pouvoir inhibiteur contre plusieurs microorganismes et présentent une activité antimicrobienne<sup>146, 148</sup> alors que la carvone et la piperitone présentent une activité antifongique.<sup>105</sup> Les constituants cétoniques tels que l' $\alpha$ -thujone, le  $\beta$ -thujone et le camphre sont des constituants bioactifs des huiles essentielles et présentent une activité antibactérienne.<sup>149-153</sup>

Dans ce travail, seulement deux huiles contiennent des alcools monoterpéniques à des concentrations considérables (artémisia alcool 5,1%, santalina alcool 4,3% et yomogi alcool

4.1%) pour Ghardaia et (artémisia alcool 1,1%,) pour Medjedel, alors qu'elles contiennent 7,3% de bornéol et 13,4% de 1,8-cinéol qui lui, est antimicrobien.<sup>151</sup> Néanmoins, la majeure partie de ces huiles sont des cétones constituées principalement de camphre, d' $\alpha$ -thujone, de  $\beta$ -thujone, de chrysanthénone et de davanone.

Comme reporté en littérature, le camphre et les thujones sont des constituants bioactifs des huiles essentielles.<sup>148-150</sup> Le tableau 15 ci-dessous illustre la bioactivité de quelques constituants importants.

**Tableau 15** Bioactivité de quelques constituants des huiles essentielles

Composés	Bioactivités
bornyl acétate	Antibactérien, antispasmodique, antiviral, expectorant, saveur, insectifuge, myorelaxant, pesticide et sédatif.
camphre	Allelopathique, analgésique, anesthésique, anti-acné, antidiarrhétique, antidysentérique, antioxydant, antiseptique, antispasmodique, stimulant-CNS, cancer-préventif, carminatif, produit de beauté, expectorant, fongicide, herbicide, insectifuge, nématicide, pesticide, stimule la respiration.
carvone	Antiacétylcholinestérase, antiseptique, stimulant-CNS, cancer-préventif, carminatif, saveur, insecticide, insectifuge, nématicide, parfumerie, pesticide, sédatif, trichomonocide, vermicide.
$\alpha$ -thujone	Antibactérienne, insectifuge, larvicide, pesticide, <u>abortifacient</u> , <u>emménagogue</u> , epileptogénique /convulsant
$\beta$ -thujone	antibactérienne, emménagogue, insectifuge, pesticide, epileptogénique/convulsant
1,8-cineole	Antimicrobien
linalool	Antimicrobien, hypnotique, hypothermique.
nerolidol	Antimalaria
$\beta$ -caryophyllène	Aldose-réductase-inhibiteur; anti-acné ; antiasthmatique; antibactérien; anticariogénique ; antifédatif; anti-inflammatoire; antispasmodique; antistaphylococcique; antistreptococcique; antitumeur; candidicide; flaveur; fongicide; insectifuge; irritant; parfumerie; pesticide; sédatif; termitifuge
$\alpha$ -Phellandrene	Hyperthermique; irritant; spasmogénique; tumeur-promoteur
Piperitone	Antiasthmatique; flaveur; herbicide; insectifuge; parfumerie ; pesticide
Sabinène	Parfumerie
$\beta$ -Sabinyl acetate	Epileptogénique/convulsant

En comparant l'effet des composés majoritaires d'*A.herba-alba* sur les microorganismes, (tableau 12), il apparaît que pour le *Staphylococcus aureus* et le *Fusarium oxysporum albedinis* les essences de Medjedel (M), Ghardaia (G), Bordj Bou Arreridj (BB) ont une meilleure activité pour des concentrations qui varient entre [ $<0,5-1\mu\text{g/mL}$ ]. Cette effet peut être attribué aux composés majoritaires communs qu'elles renferment tels que le camphre, le 1,8-cinéole et le bornéol.

L'huile de Medjedel (M) est très efficace contre le *Bacillus coagulans* (<0,5mg/mL) ; ceci qui pourrait être du au pourcentage élevé en 1,8-cinéole ou au pinocarvone 5,6% qui est le composé non commun aux autres essences contrairement au 1,8-cinéole.

Sur le *Pseudomonas aeruginosa* les essences de Medjedel (M), Djelfa (D'), Bordj Ghardir (BG) sont très efficaces (<0,5%). Le davanone, l'éther davanique et le 1,8-cinéole sont majoritaires de BG et D' alors que le haut pourcentage en commun avec M et le 1,8-cinéole.

Le *Fusarium oxysporum lini* quant à lui est très inhibé par l'huile de Ghardaïa (G) ; ceci serait dû à la présence du santalina alcool et de l'artémisia alcool pratiquement inexistant ou à l'état de trace dans les autres essences.

### **III. Partie expérimentale**

#### **III.1. Milieu de culture (EIVa)**

Agar Nutritive modifié : 10g : Glucose,5g : peptone ,1g :extrait de Malt, 2g : extrait de levure, 5g NaCl, 18g Agar, 100ml H<sub>2</sub>O , PH=7,2, nous avons ajouté du tween 80 à 1% afin de mieux disperser l'huile dans la gélose nutritive et obtenir un milieu homogène.

#### **III.2. Mode opératoire (EIVb)**

La CMI a été déterminée en utilisant la méthode des micros dilutions suivant la quantité d'huile essentielle disponible, les concentrations varient de 0,5 à 75 (µg/mL). Les concentrations des micro-organismes sont préalablement calibrées à 3 10<sup>6</sup> cellules/mL Nous avons utilisé des boîtes de pétri en verre de 6 cm de diamètre stérilisées. Le milieu de culture, les micropipettes, les microseringues et les tubes à essais destinés à contenir les suspensions microbiennes sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Le comptage des germes s'est effectué sur une cellule de malassez (Hematimètre de Malassez) et sous un microscope optique. Chaque boîte de pétri contient 3 ml de milieu gélosé et une concentration connue d'huile essentielle. 2µl de chaque microorganisme sont alors déposés en un point sur la gélose nutritive. Chaque expérience est répétée deux fois afin de confirmer l'effet inhibiteur.

L'incubation est ensuite effectuée à 30°C à l'intérieur d'une étuve. Les résultats sont lus 24 h après pour les bactéries et les levures et 48 h après pour les champignons.

Ces résultats consistent à noter s'il y a présence ou absence de croissance des microorganismes. La concentration la plus faible en huile essentielle qui inhibe totalement la croissance des germes est considérée comme étant la concentration minimale inhibitrice.

## **IV Conclusion**

Les différentes huiles essentielles étudiées dans ce chapitre montrent globalement dans ce cas une très bonne activité inhibitrice ; cependant, il est difficile de relier cette activité à un ou deux produits du fait de leur synergie. Il serait intéressant d'étudier cette activité inhibitrice par rapport à des constituants purs. Par ailleurs, la variabilité de la qualité des essences en fonction des différents facteurs (climat, nature du sol, période et méthode d'extraction, âge de la plante, région, etc...) ne peut qu'entraîner une variabilité dans l'activité inhibitrice également. Par conséquent, un travail important reste à faire pour cerner au mieux ces différentes activités biologiques.

# *Chapitre V*

**Etude structurale de composés  
antioxydants extraits de l'*Artémisia  
herba-alba***

## 1. Introduction

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Dans les systèmes vivants, les radicaux libres se forment constamment. Toutefois, lorsque la production dépasse la capacité antioxydante de l'organisme, ces espèces radicalaires telles que les radicaux hydroxyles, les anions superoxydes et les peroxydes d'hydrogènes attaquent les lipides, les protéines et l'ADN. Elles endommagent l'intégrité structurale et la fonction des membranes des cellules, les enzymes et le matériel génétique, et conduisent à certaines maladies comme les maladies coronariennes et le cancer.<sup>44</sup>

Un corpus croissant de preuves montre que diverses conditions pathologiques, y compris les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite, divers cancers et la maladie d'Alzheimer, sont associés, au moins en partie, avec les effets néfastes du non contrôle de la production de radicaux libres.<sup>45</sup>

Bien qu'il existe des composés antioxydants synthétiques, comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), qui sont couramment utilisés dans les aliments, il a été rapporté que ces composés ont des effets secondaires.<sup>154, 155</sup>

Les antioxydants naturels sont devenus une part importante dans l'alimentation humaine en vue de réduire le risque de maladies. Pour ces raisons, la recherche de nouvelles sources d'antioxydants naturels potentiellement sûres, efficaces et bon marché a suscité un intérêt considérable dans la communauté scientifique, à la fois industrielle et académique.<sup>156</sup>

Le nombre de rapports sur l'isolement et l'essai des antioxydants naturels, principalement d'origine végétale, a beaucoup augmenté au cours de la dernière décennie. Un grand nombre de différentes épices et herbes aromatiques ont été testés pour leur activité antioxydante.<sup>157, 158</sup> Toutefois, il existe encore de nombreuses plantes, peu étudiées où les connaissances sur leurs propriétés antioxydatives sont très rares, comme l'*A.herba-alba*.

Ce chapitre traite de la détermination de l'activité antioxydante des huiles essentielles, des extraits par solvants, de l'isolement et de l'identification des composants actifs présents dans l'*A.herba-alba* par la méthode "on-line" HPLC-DAD-DPPH de chaque constituant individuel.<sup>159-162</sup> Les composés purs sont par la suite quantifiés par dosage de l'inhibiteur vis-à-vis du radical DPPH.

## II. Résultats et discussion

### II.1. Etude de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles d'*A.herba-alba* :

L'activité antioxydante a été évaluée en ultra-violet par le test du piégeage du radical DPPH<sup>163</sup> stable par les huiles essentielles des échantillons de l'*A.herba-alba* extraits par hydrodistillation et par micro-onde ainsi que celle du BHT après quinze minutes de réaction à  $\lambda=515\text{nm}$  sur des solutions méthanoliques mères de 1mg/mL,

Ce test est largement utilisé par la communauté scientifique dans les cas d'étude comparatifs.

Les résultats qui représentent la moyenne sur trois essais sont regroupés dans le tableau 16.

Les pourcentages de capture du radical (%CR)<sup>164</sup> ont été calculés à partir de la relation ci-dessous:

$$\% \text{CR} = \left[ \frac{A_B - A_A}{A_B} \right] \times 100 \quad (1)$$

où:  $A_B$  est l'absorbance du blanc ( $t = 0\text{min}$ );  $A_A$  est l'absorbance de la solution de l'extrait testé ( $t = 15\text{min}$ ).

**Tableau 16.** Activité anti-oxydante (%) évaluée par le radical DPPH des huiles essentielles d'*A. herba-alba* extraites par HD et MD

Echantillon	Activité de piégeage du DPPH (%CR)	
	HD	MD
D	6.33	6.21
D'	6.85	6.36
LG	8.49	7.88
BA	6.35	6.03
BG	5.65	5.66
BB	13.23	13.06
DC	9.53	9.56
BO	8.32	-
R	9.62	9.33
M	10.29	9.98
G	0.18	0.20
MS	7.81	7.53
BHT	64,72	

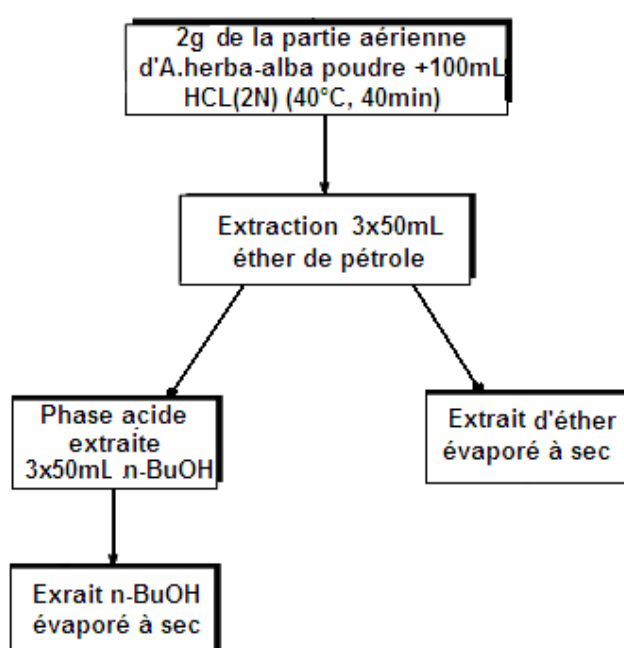
HD: hydrodistillation; MD: Micro-onde distillation ; % CR : pourcentage de capture du radical  
D: Djelfa; D': Djelfa; LG: Laghouat; BA: Batna; BL: Bordj ghdir; BG: Bordj Bou Arreridj; DC: Draa Chih;  
BO: Boussâada ; R: Roumana; M: Medjebel; G: Ghardaia et MS: M'sila

Au vu de ces résultats, les huiles essentielles d'*A.herba-alba* ont manifesté une très faible activité antioxydante pour une concentration de 1mg/mL. Généralement, le pouvoir

antioxydant est associé aux composés phénoliques, ce qui n'a pas été identifié dans nos essences.

## II.2. Etude préliminaire

Les extraits d'*A. herba-alba* (EVA, III.1.1, p 101) de quatre régions d'Algérie Bouira (BI), Djelfa (D), Laghouat (LG) et M'sila (MS) obtenus (EVb, III.1.1, p 101) par l'éther de pétrole et le butanol (figure 17) ont été évalués en UV pour leur activité antioxydante par le DPPH<sup>163</sup> à  $\lambda=515$  nm en mélangeant dans des cuves une solution méthanolique de DPPH avec les solutions méthanoliques des extraits.



**Figure 17.** Protocole d'extraction par hydrolyse

Les extraits sont préparés à différentes concentrations (25-1000 $\mu$ g/mL) dans du méthanol pour UV. La moyenne sur trois essais des pourcentages de capture du radical ont été calculés à partir de (1) pour la concentration moyenne de 150  $\mu$ g/mL (Tableau 17).

Les extraits d'éther et de butanol présentent un pouvoir antioxydant très important pour toutes les régions (81,84-94,04%) à l'exception de l'extrait de Bouira butanolique dont l'activité est plus faible (51,47%). L'extrait de butanol de Laghouat est moyennement actif (72,63%) par contre son extrait étheré est le plus actif avec 94,04%. L'extrait de Djelfa possède une activité légèrement plus importante pour l'échantillon butanolique.

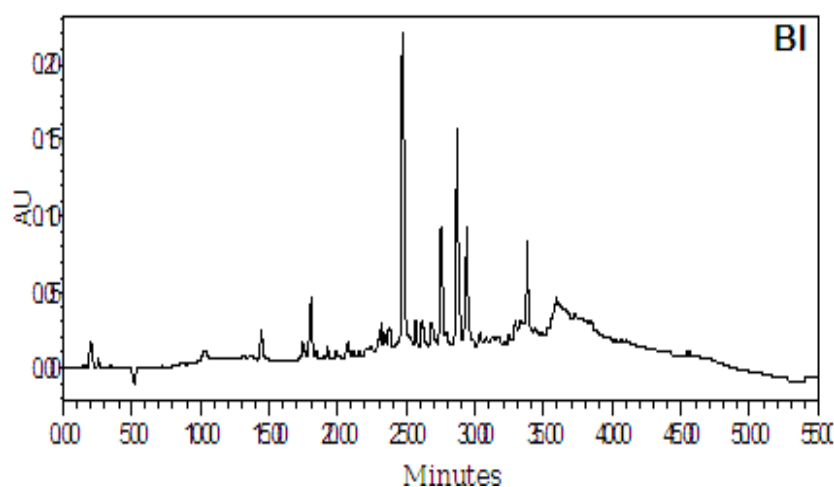
**Tableau 17.** Activité antioxydante (%) évaluée par le radical DPPH des extraits d'*A. herba-alba* des régions d'Algérie

Activité de capture du radical DPPH		
Solvant	Echantillon	%CR
Ether	BI	81,84
	D	83,24
	MS	88,95
	LG	94,04
Butanol	BI	51,47
	D	88,49
	MS	89,80
	LG	72,63

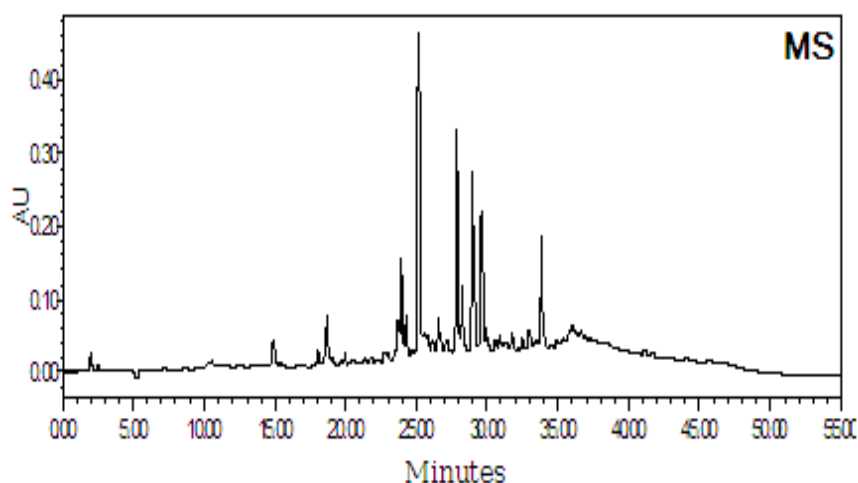
BI : Bouira ; D : Djelfa ; MS : M'sila ; LG : Laghouat ; % CR : pourcentage de capture du radical

Pour compléter et confirmer le choix de la région de la plante ainsi que du solvant d'extraction, nous avons analysé par HPLC-DAD à 254 nm (figure 18-21) et 330 nm en annexe 2 et HPLC-DAD-DPPH à 515nm les différents extraits à une concentration de 10mg/mL.

Les profils des chromatogrammes (figure 18 et 19) montrent que les extraits d'éther de M'sila et de Bouira présentent une grande similitude (pics à 18, 25, 27, 28, 29 et 34 min) et ils sont plus riche comparés à ceux de Djelfa (pics 25, 27 et 29 min) et Laghouat (pics 25 et 27 min) (annexe 2, figure a et b). Néanmoins les pics de M'sila ont une intensité double par rapport à ceux de Bouira.

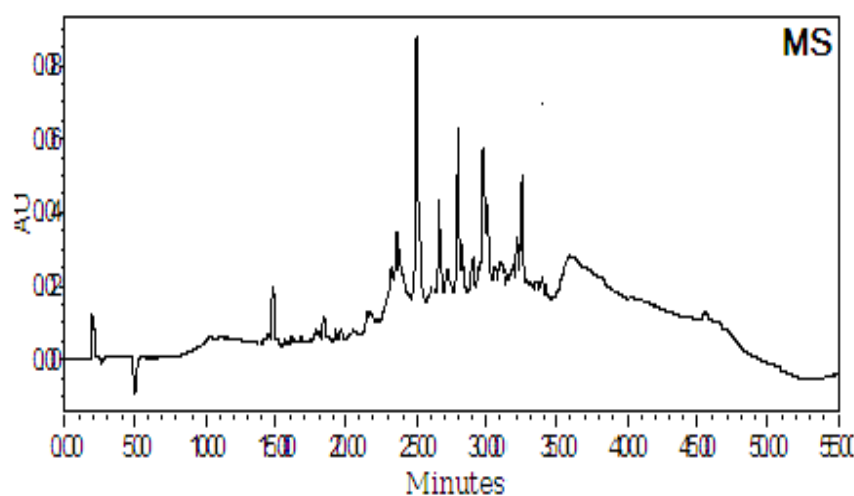


**Figure18.** Profil chromatographique de l'extrait d'éther d'*A. herba-alba* de BI à 254 nm



**Figure 19.** Profil chromatographique de l'extrait d'éther d'*A. herba-alba* de MS à 254 nm

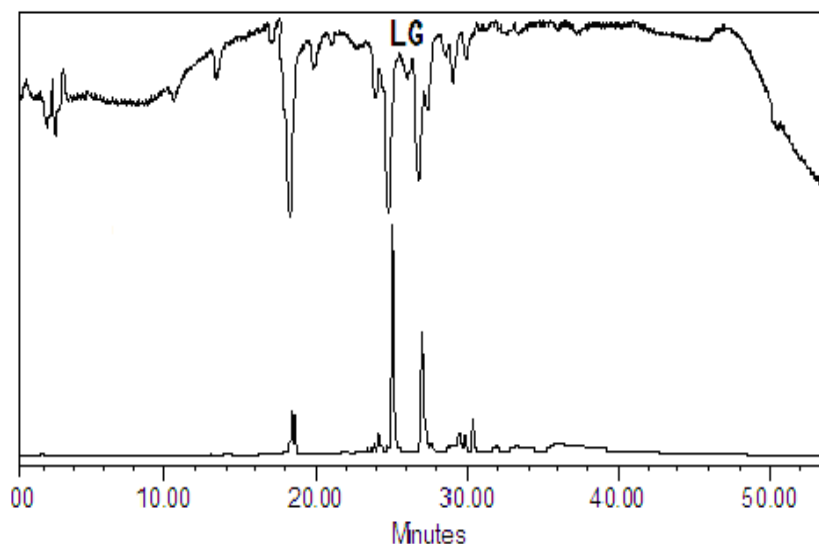
Les chromatogrammes (annexe 2, figure c, d et e) des extraits de butanol montrent une grande similitude néanmoins l'extrait de Laghouat (LG) présente des pics d'intense importante mais l'échantillon de M'sila (figure 20) est le plus riche en constituants comparé aux autres extraits.



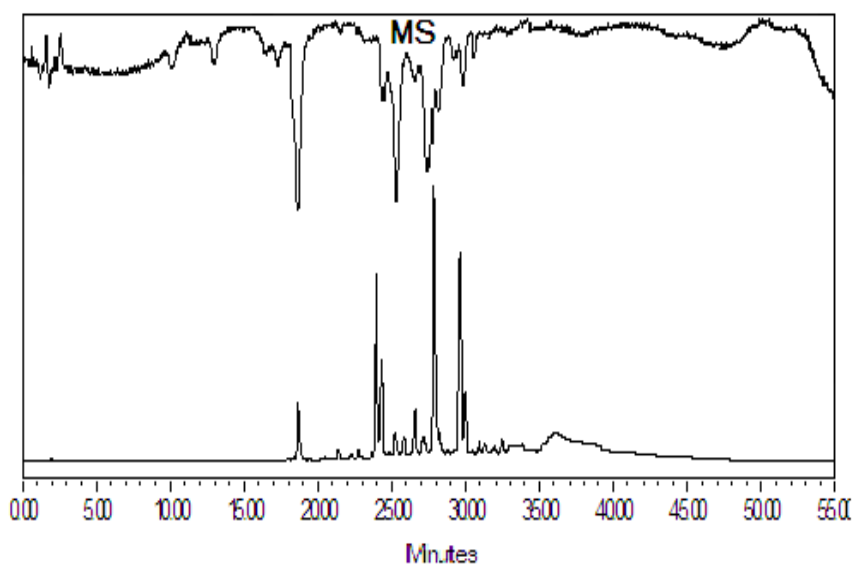
**Figure 20.** Profil chromatographique de l'extrait de butanol d'*A. herba-alba* de MS à 254 nm

Les extraits de M'sila (MS) et Laghouat (LG) ont été en outre évalués par HPLC-on line-DAD-DPPH.<sup>160-162</sup> Cette méthodologie permet le repérage rapide des antioxydants dans des mélanges complexes par un mélangeur post-colonne avec des solutions radicalaires. Le signal de réduction résultant est détecté comme un pic négatif par un détecteur d'absorbance (à 515 nm pour DPPH<sup>•</sup>). Après cela, il est facile de détecter les composants actifs présents dans chaque extrait (Figure 21 et 22).

Les chromatogrammes on-line de la capacité de capture du radical DPPH des extraits d'*A.herba-alba* (Supérieur à 515nm et inférieur à 330 nm) montrent une activité similaire pour les deux extraits de Laghouat (LG) et M'sila (MS), mais le chromatogramme est plus riche pour MS. Ainsi l'*A.herba-alba* de la région de M'sila fera l'objet de ce travail.



**Figure 21.** Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait LG de butanol d'*A.herba-alba* (Supérieur 515nm et inférieur 330 nm)



**Figure 22.** Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait MS de butanol d'*A.herba-alba* (Supérieur 515nm et inférieur 330 nm)

L'armoise blanche MS étudiée (EVA, III.1.1, p 101) dans cette partie provient du même lot et d'une même période de culture que celle étudiée précédemment. La matière

végétale est extraite par (le chloroforme, le méthanol, le diéthyl éther et l'éthanol) en utilisant le soxhlet (Evc, III.1.1, p 102) qui lui, permet le traitement des solides de toutes tailles et présente l'avantage de ne pas nécessiter beaucoup de solvant.<sup>165</sup>

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus a été déterminée par le test DPPH.<sup>162</sup> à 515nm de la même manière que précédemment avec les solutions méthanoliques de l'extrait à différentes concentration (25-200µg/mL) (annexe 3). Les pourcentages de capture du radical<sup>163</sup> ont été calculés à partir de (1)

La moyenne des rendements d'extraction et des %CR pour une concentration de 150 µg/mL sur trois essais sont illustré dans le tableau 18.

Il apparait que les rendements et la capacité à capturer le radical DPPH est mieux observé pour les extraits polaires en particulier l'éthanol à 86,60%.

**Tableau 18.** Influence de la nature du solvant sur le rendement en extrait et sur la capture du radical DPPH

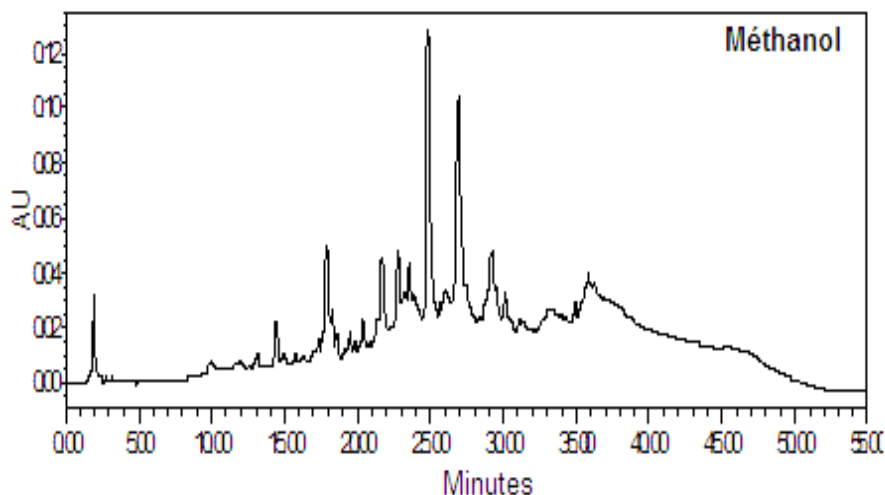
Solvants	Masse (g)	R (%)	%CR
Chloroforme	8,44	21,10	6,77
Méthanol	12,18	30,45	81,90
Diéthyl éther	2,19	5,48	3,62
Ethanol	12,20	30,51	86,60

% CR : pourcentage de capture du radical ; R% : rendement d'extraction

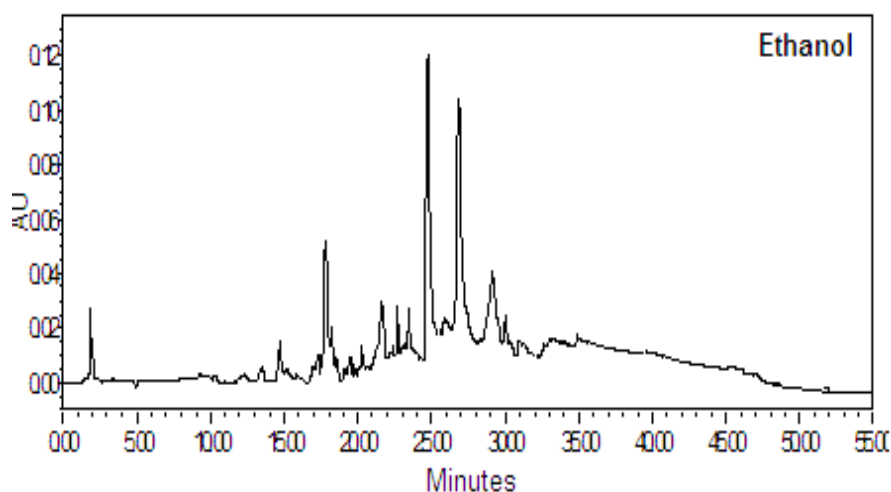
A priori, nous pouvons dire que le meilleur solvant pourrait être celui qui donne le plus grand rendement, or suivant la nature de celui-ci, nous n'obtenons pas le même type d'extrait. Certains solvants extraient de la matière végétale à la fois le principe odorant, les pigments (colorants) et les matières cireuses. C'est le cas du chloroforme, de l'éthanol et du méthanol qui, en plus de l'huile essentielle extraient des pigments et des cires. Nous remarquons toutefois que le diéthyl éther donne un extrait d'aspect pâteux de couleur claire et contenant des matières cireuses en faible quantité dont l'odeur fraîche et agréable caractérise la plante *d'A.herba-alba*. Ceci est du au facteur de polarité, en effet, les composants d'une essence sont mieux extraits par des solvants de même polarité. Nous ne pouvons donc pas nous baser sur le rendement global en extrait pour pouvoir affirmer que tel ou tel solvant est meilleur pour l'extraction.

L'analyse par HPLC à haute résolution des différents extraits permet de faire une meilleure comparaison afin de mieux choisir le solvant adéquat.

Les profils chromatographiques des extraits à l'éthanol et au méthanol (figure 23 et 24) sont similaires et présentent des pics au même temps de rétention que les extraits précédents (18, 25, 27 et 30 min). Pour les extraits à l'éther et au chloroforme (annexe 4), le pic à 25min est pratiquement le seul obtenu.



**Figure 23.** Chromatogramme de l'extrait de méthanol d'*A.herba-alba* de MS à 254 nm



**Figure 24.** Chromatogramme de l'extrait de l'éthanol d'*A.herba-alba* de MS à 254 nm

En effet, les deux solvants employés mènent vers les mêmes conclusions et pratiquement vers le même rendement. Par conséquent c'est l'éthanol qui est recommandé en utilisant la macération avec une matière végétale broyée, puisque le soxhlet présente l'inconvénient d'exposer continuellement la concrète à une chaleur intense, favorisant ainsi sa dégradation. De plus, le même rendement peut être obtenu au moyen d'une macération avec une température ambiante contre une température d'ébullition de solvant par le soxhlet.

### II.3. Activité guidée par chromatographie et isolement des antioxydants

#### II.3.1. Extraction et activité antioxydante de constituants d'*A. herba-alba*

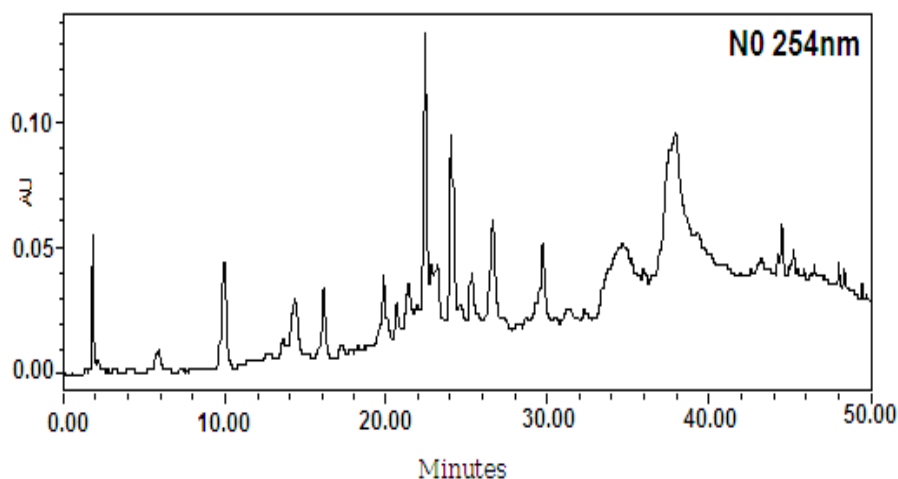
La partie aérienne broyée de l'*A. herba-alba* de M'sila (EVd, III.1.1, p 102) a été extraite par macération avec de l'éthanol absolu à la température ambiante (EVe, III.1.1, p 102), la solution méthanolique évaporée à sec et à une température inférieure à 40°C donne l'extrait éthanolique N0 (59,93g).

##### a. Activité de capture du radical DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique a été déterminée pour l'activité de capture du radical DPPH à 515 nm pour une concentration de 100 µg/mL. Le pourcentage de capture du radical de l'extrait total N0 a été calculé à partir de (1) et présente une activité moyenne de 52,21% (annexe 6).

##### b. Analyse par chromatographie liquide HPLC-DAD

Les chromatogrammes de N0 (extrait total) présentant le profil total (figure 25 et annexe 5) sont complexes. Les chromatogrammes à 254 (figure 25) et 280 nm sont très similaires. Le chromatogramme à 330 nm présente un profil plus clair, néanmoins il nous ne renseigne pas sur les composés actifs, pour cela nous avons procédé à l'analyse guidée "on-line" HPLC-DAD-DPPH<sup>160-163</sup> afin de repérer les composés actifs.



**Figure 25.** Chromatogramme HPLC de l'extrait éthanol (N0) d'*A. herba-alba* à 254 nm

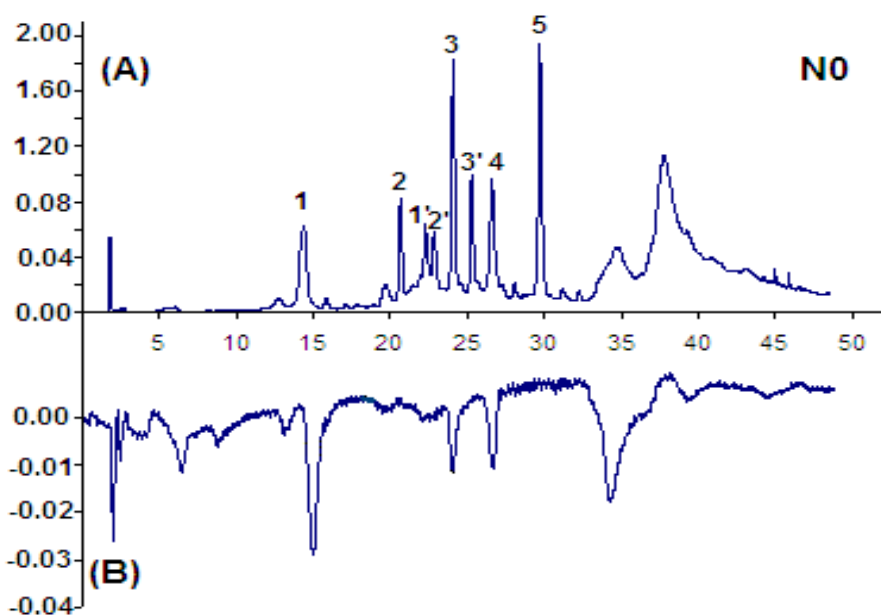
##### c. Technique combinée HPLC-DAD-DPPH

Cette technique de détection dans des mélanges complexes consiste en la caractérisation "on-line" de composés actifs par un système de réaction en post-colonne en

utilisant la chromatographie liquide à haute résolution (HPLC), les éluants sont d'abord détectés par un détecteur de diodes (DAD), puis ils sont mélangés à la sortie de la colonne avec une solution radicalaire de DPPH. Le signal de réduction ou de non absorption résultant est détecté comme un pic négatif par un détecteur d'absorbance UV (à 515 nm pour DPPH<sup>•</sup>).

Un système légèrement différent a été installé au laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Jaën, sur lequel a été réalisée la partie expérimentale. Ce nouveau système consiste à utiliser uniquement un seul détecteur (DAD). Dans ce système nous avons placé une valve de commutation qui permet de diriger les éluants vers le détecteur DAD, dans une première injection de l'échantillon ou vers un tube de réaction dans une seconde injection de l'échantillon dans lequel les éluants se mélangent avec une solution du radical DPPH. La figure 44 dans le paragraphe (III.2.2.e) schématise l'équipement HPLC-DAD-DPPH pour la détection de composés avec une activité antioxydante. Le signal de réduction ou de non absorption résultant est détecté comme un pic négatif par le même DAD. En conséquence, la superposition du chromatogramme de HPLC « inversé » avec le chromatogramme HPLC de l'échantillon permet de détecter les pics qui possèdent une activité antioxydante.

Cette méthode a été appliquée à l'extrait total N0 d'*A.herba-alba* afin de nous renseigner sur l'activité de ses composés majoritaires pour pouvoir procéder à leur extraction, leur isolement et leur identification (figure 26).



**Figure 26.** Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait éthanol (N0) d'*A.herba-alba* (supérieur 515 nm, inférieur 330 nm)

Cette étude montre la présence de 4 pics actifs qui peuvent être isolés par fractionnement sur gel de silice en utilisant des colonnes chromatographiques et par chromatographie préparative après extraction de l'extrait N0 par solvants.

### II.3.2. Extraction et activité anti oxydante de l'extrait éthanolique

#### a. Rendement et activité anti oxydante

La poudre obtenue de N0 est extraite par différents solvants (dichlorométhane, acétate d'éthyle, *n*-butanol). L'organigramme de la figure 27 présente la démarche suivie pour l'extraction des différentes phases (EVe, III.1.1, p 102).

Les rendements d'extractions d'*A.herba-alba* avec chacun des solvants et leur capacité à capturer le radical DPPH pour une concentration de 100µg/mL sont représentés dans le tableau 19

**Tableau 19.** Rendement d'extraction et activité antioxydante des extraits exprimé en % de capture du radical DPPH (%CR).

Extraits	R(%)	%CR
N1	59,60	-
N2	4,74	93,25
N3	2,35	82,87
N4	8,29	48,54

N0 : extrait EtOH ; N1 : extrait DCM ; N2 : extrait AcOEt ; N3 : AcOEt PH3 ; N4 : BuOH  
% CR : pourcentage de capture du radical ; R% : rendement d'extraction

L'extrait N4 (BuOH) présente une activité de 48,54% comparable à celle de l'extrait N0 (EtOH) 52,21%. Les extraits de l'acétate d'éthyle N2 (4,74%) et de l'acétate d'éthyle après acidification de la phase aqueuse N3 (2,35%) ont respectivement une activité antioxydante très importante de 93,25% et 82,87%.

#### b. Evaluation de l'activité antioxydante de capture du radical DPPH :

Les cinq principales fractions obtenues (N0, N2, N3 et N4) de l'extrait éthanolique d'*A. herba-alba* ont été évaluées pour leur capacité de piéger le radical libre DPPH. Parmi ces cinq fractions, en termes de pourcentages de capture du radical DPPH, les fractions les plus actives sont N2, N3, N4 et N0, avec 102,60%, 47,84%, 33,75% et 28,67%, respectivement (Tableau 20).

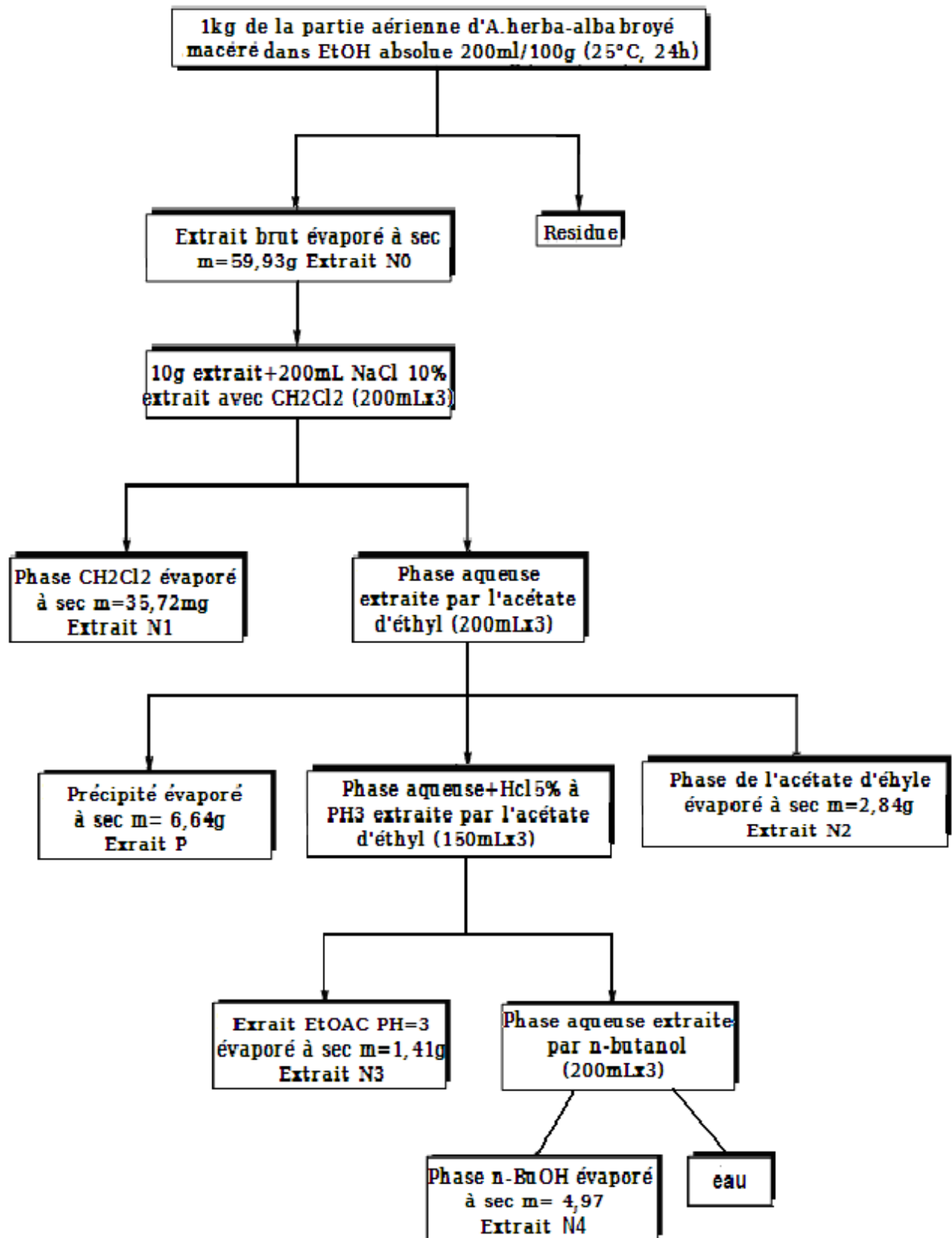


Figure 27. Protocole d'extraction et d'isolement d'*A.herba-alba* de M'sila

Comme figurant sur le tableau ci-dessus, l'extrait N2 possède une capacité de neutralisation du radical libre DPPH puissante, puisque il agit à une faible dose. Ces EC<sub>50</sub> sont déterminés graphiquement des trois tests séparés dont l'abscisse la concentration de l'extrait et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage (%CR).

**Tableau 20.** Activité antioxydante (méthode DPPH) des extraits exprimés en pourcentage de capture du radical (%CR)

Extrait	Equation	R <sup>2</sup>	CE <sub>50</sub> ± DS (µg/mL)		%CR <sub>50</sub> ± DS (%)	
N0	Y= 0,4175x + 7,1434	0,9938	102,65		28,02	
	Y= 0,4081x + 8,2974	0,9912	102,19	101,51 ± 1,37	28,70	28,67±0,64
	Y= 0,4164x + 8,4843	0,9924	99,70		29,30	
N2	Y= 1,9306x + 5,8930	0,9920	22,85		102,42	
	Y= 1,9400x + 6,1841	0,9910	22,58	22,76 ± 0,16	103,18	102,60±0,51
	Y= 1,9232x + 6,0513	0,9923	22,85		102,21	
N3	Y= 0,9101x + 2,5559	0,9910	52,13		48,06	
	Y= 0,9089x + 0,5869	0,9967	54,36	52,37 ± 1,87	46,03	47,84±2,41
	Y= 0,9074x + 4,0553	0,9956	50,63		49,43	
N4	Y= 0,3446x +15,1370	0,9929	101,17		32,37	
	Y= 0,3345x +18,0120	0,9945	95,63	98,37± 2,77	34,74	33,75±1,23
	Y= 0,3281x +17,7460	0,9960	98,30		34,15	

N0 : extrait EtOH ; N2 : extrait AcOEt ; N3 : AcOEt PH3 ; N4 : BuOH

% CR<sub>50</sub> : pourcentage de capture du radical du radical DPPH à une concentration de 50 µg/mL

CE<sub>50</sub>: Concentration Efficace de l'extrait pour réduire le DPPH de 50% ; Y : %CR ; x : Concentration de l'extrait

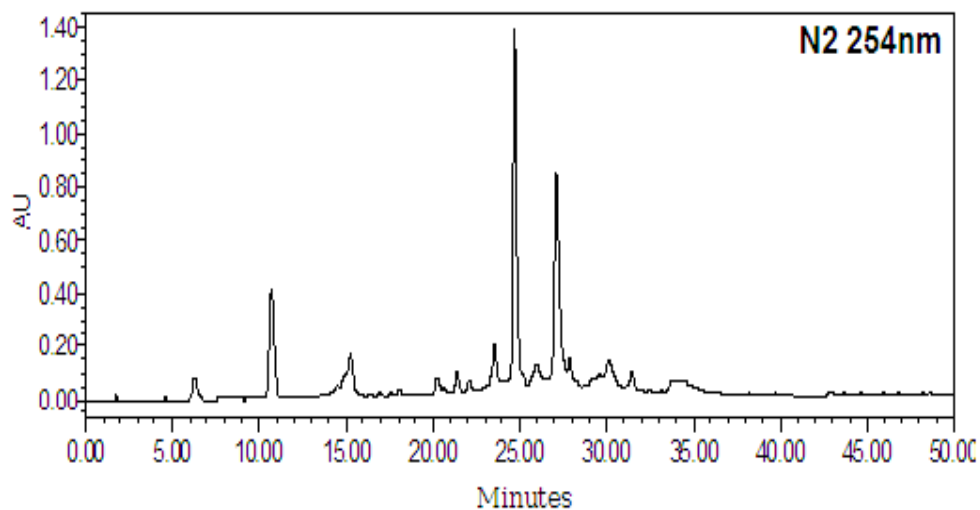
### c. Analyse par chromatographie liquide

Les extraits sont analysés par chromatographie liquide à haute résolution sous différentes longueurs d'onde (254, 280 et 330 nm), avec l'objectif de connaître les profils chromatographiques et de pouvoir choisir les extraits à soumettre au fractionnement et à l'isolement des composés actifs.

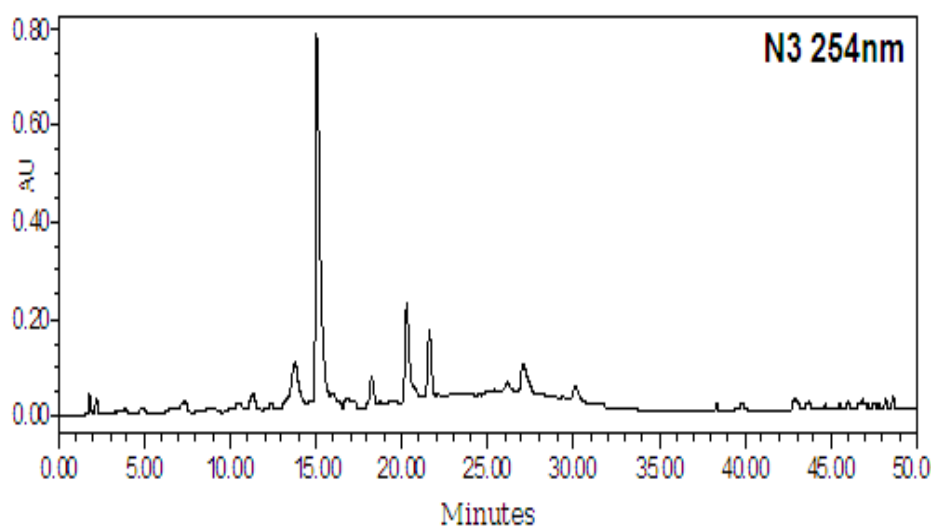
L'extrait N1 du DCM concerne les constituants non polaires de faible activité antioxydante.<sup>166, 167</sup> Les deux profils à 254 et 280 nm sont complètement différents (annexe 7).

Les extraits N2 et N3 les plus actifs par rapport à leur activité de capture du radical DPPH présentent des profils chromatographiques clairs et similaires pour les trois longueurs d'ondes

(figure 28, 29 et annexe 8, 9). N2 présente deux pics majoritaires à 24,40 et 26,96 min (figure 28) et N3 deux autres pics majoritaires à 14,43 et 21,96 min (figure 29).

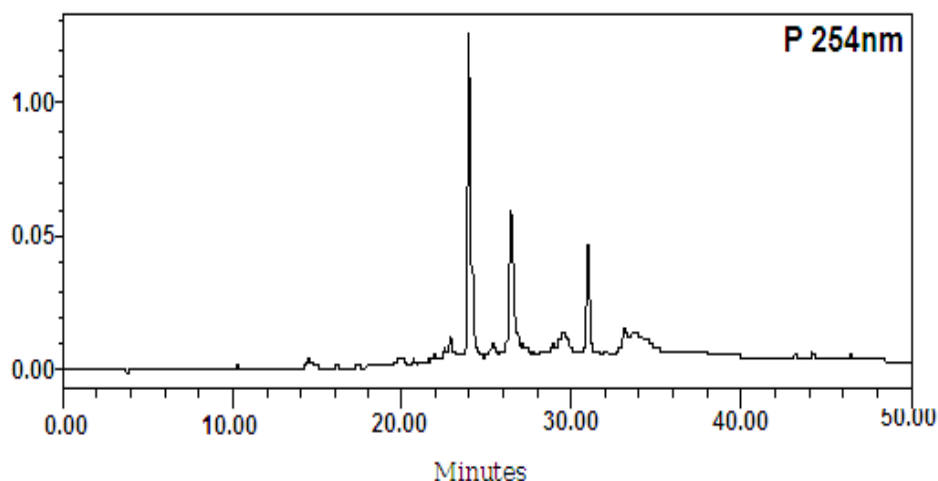


**Figure 28.** Chromatogramme HPLC de l'extrait d'AcOEt (N2) d'*A.herba-alba* à 254 nm



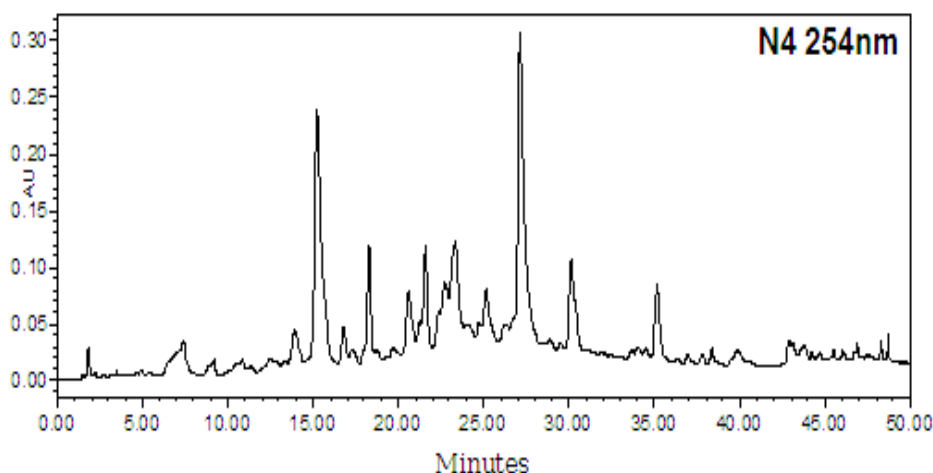
**Figure 29.** Chromatogramme HPLC de l'extrait d'AcOEt (N3) d'*A.herba-alba* à 254 nm

Les chromatogrammes du précipité P (figure 30 et annexe 10) résultant de l'extraction par l'AcOEt montrent trois pics majoritaires à 24,40 ; 27 et 31min. les profils pour les trois longueurs d'ondes sont d'une grande similitude.



**Figure 30.** Chromatogramme HPLC du précipité d'AcOEt (P) d'*A.herba-alba* à 254 nm

Les chromatogrammes de l'extrait de butanol (figure 31 et annexe 11) sont complexes et présentent presque les mêmes pics cités dans les autres extraits.



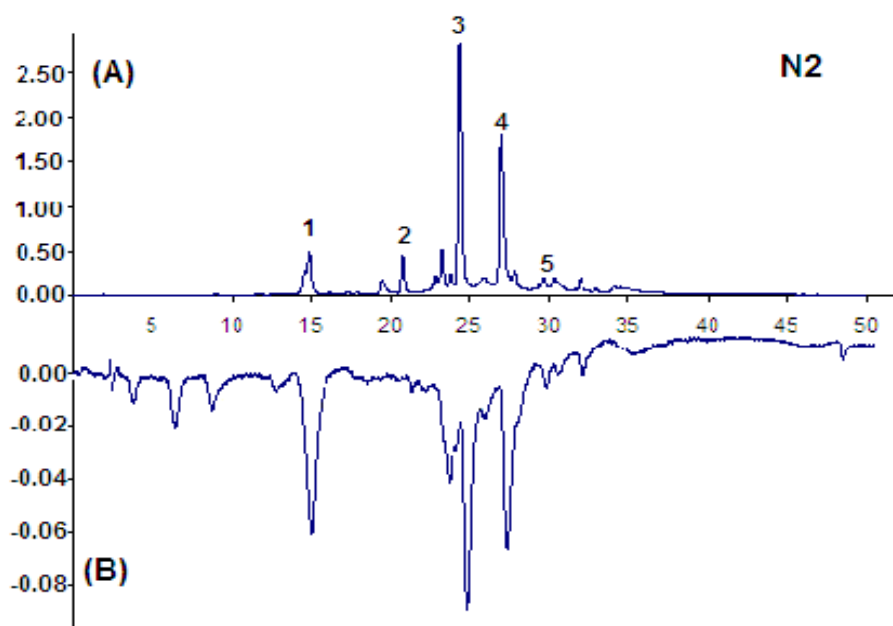
**Figure 31.** Chromatogramme HPLC de l'extrait BuOH(N4) d'*A.herba-alba* à 254 nm

Ainsi les fractions de l'acétate d'éthyle et de l'acétate d'éthyle après acidification de la phase aqueuse ainsi que le précipité ont été sélectionnées pour mener à bien cette étude, pour cela nous avons été amenés à identifier et détecter plusieurs composés actifs de l'*A.herba-alba*,

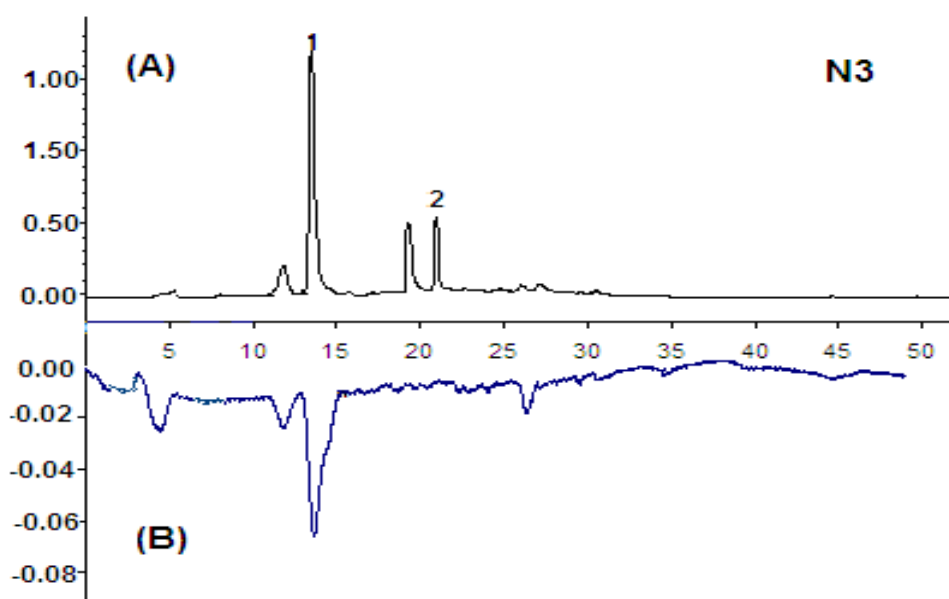
La détection des composés antioxydants a été le premier critère pour la recherche de molécules actives dans la plante, un test par la technique "on-line" HPLC-DAD-DPPH<sup>161-163</sup> et la détermination du pouvoir inhibiteur des extraits a été un critère de choix (Tableau 20). Cependant nous verrons qu'un composé ne détruisant pas le DDPH a été isolé afin de compléter la connaissance de la plante étudiée

#### d. Technique combinée HPLC-DAD-DPPH

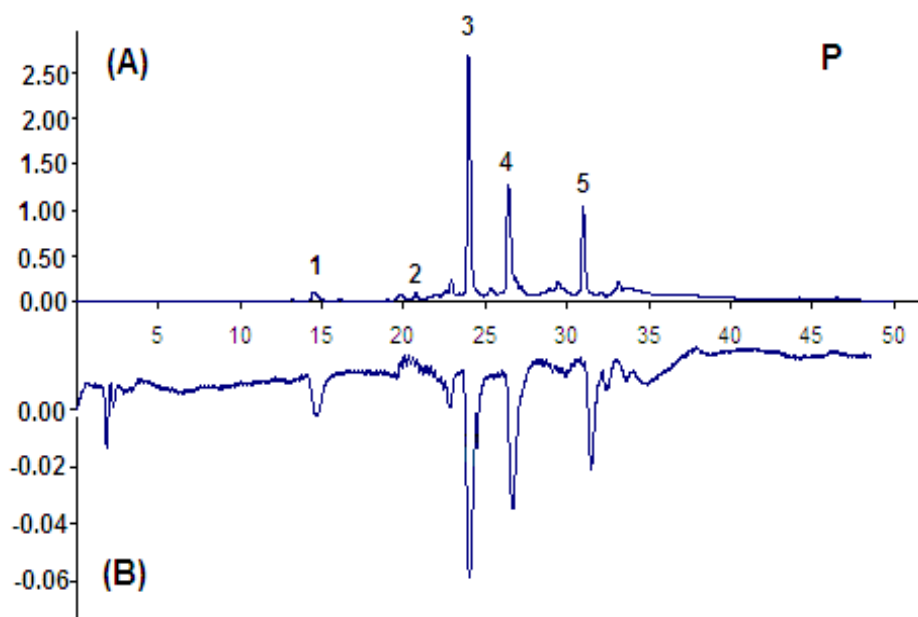
Les extraits actifs obtenus à partir de l'extrait éthanolique N0 d'*A.herba-alba* ont été en outre, évalués par HPLC-on line-DAD-DPPH.<sup>160-162</sup> Ceci nous a permis de repérer rapidement les antioxydants présent dans chaque fraction grâce à un mélangeur post-colonne avec la solution radicalaire du DPPH (figure 32-35). Le signal de réduction résultant est détecté comme un pic négatif par un détecteur d'absorbance (à 515 nm pour le radical DPPH).



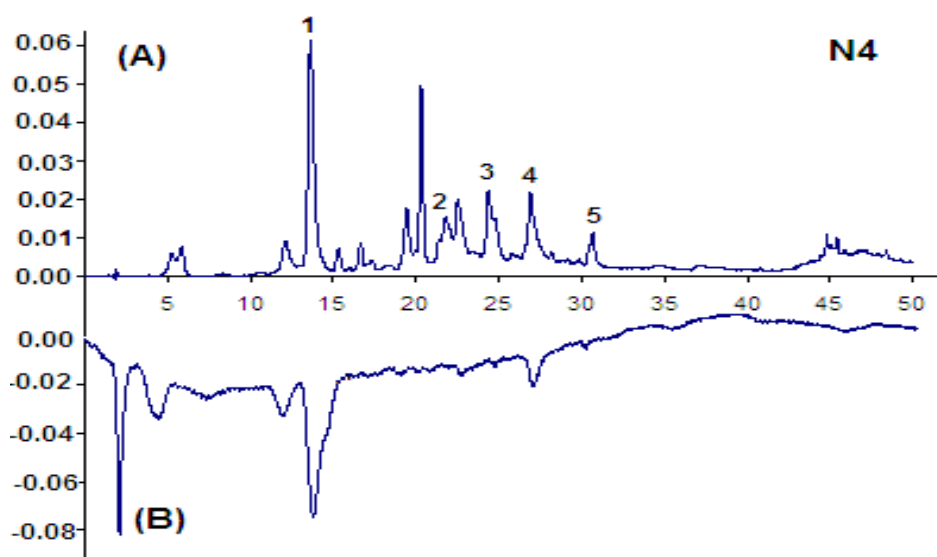
**Figure 32.** Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait d'AcOEt (N2) d'*A.herba-alba* (supérieur 515nm, inférieur 330nm)



**Figure 33.** Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait d'AcOEt PH3 (N3) d'*A.herba-alba* (supérieur 515nm, inférieur 330nm)



**Figure 34.** Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de précipité (P) d'*A.herba-alba* (supérieur 515nm, inférieur 330nm)

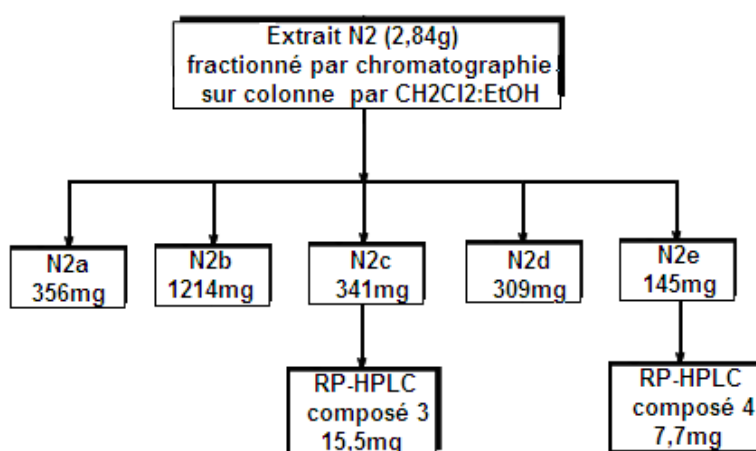


**Figure 35.** Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait BuOH (N4) d'*A.herba-alba* (supérieur 515nm, inférieur 330nm)

Le chromatogramme on-line de l'extrait N2 montre que les composés 1, 3 et 4 possèdent une activité antioxydante, mais les composés 3 et 4 seulement sont en quantité majoritaire. L'extrait N3 quand à lui présente deux pics 1 et 2 mais seul le composé 1 possède une activité antioxydante. Le précipité P contient quatre composés actifs 1, 3, 4 et 5 dont trois d'entre eux sont en quantité appréciable.

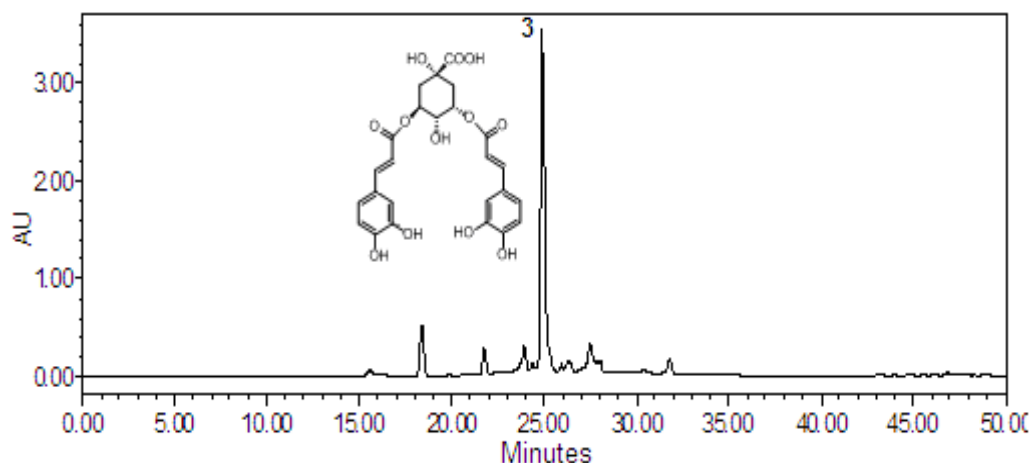
Le chromatogramme on-line de l'extrait N4 montre un composé actif déjà signalé dans les autres extraits et deux autres qui ne montrent aucune activité antioxydante.

Pour cela, dans un premier lieu, l'extrait N2 a été fractionné par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice, en utilisant le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH de polarité croissante. Le fractionnement de l'extrait N2 est détaillé sur la figure 36. Les fractions obtenues sont regroupées en cinq fractions (N2a-N2e) suite à l'analyse par CCM et HPLC. Pour connaître la fraction contenant les composés actifs à isoler, nous avons procédé à l'analyse par HPLC et HPLC on-line des regroupements obtenus.

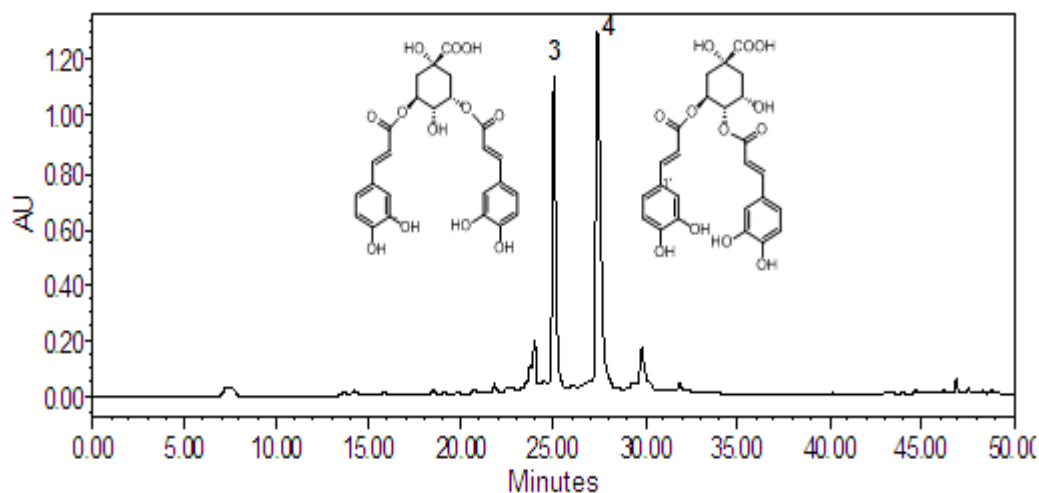


**Figure 36.** Fractionnement de l'extrait N2

Les fractions N2c et N2e ont par chromatographie préparative RP-HPLC conduit respectivement au composé **3** pur (15.5mg) et au composé **4** pur (7,7 mg). Les chromatogrammes des figures 37 et 38 ont servi à l'isolement des composés purs.

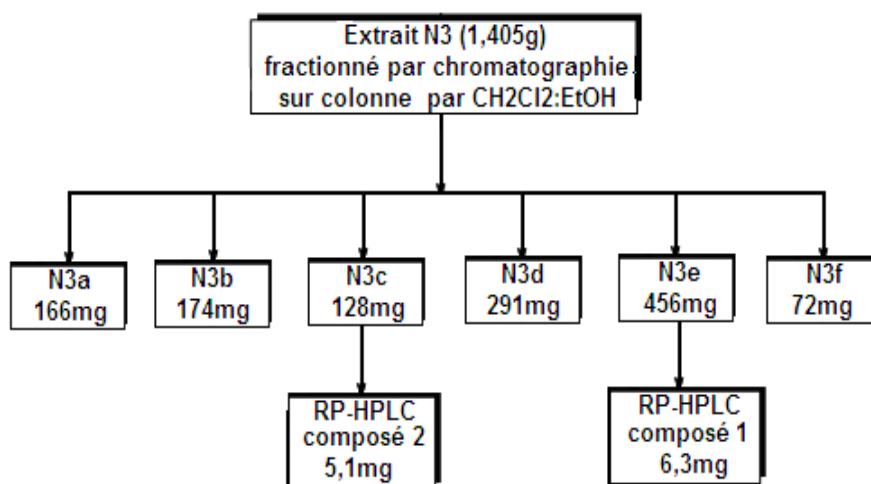


**Figure 37.** Chromatogramme de la fraction N2c de l'isolement du composé **3**



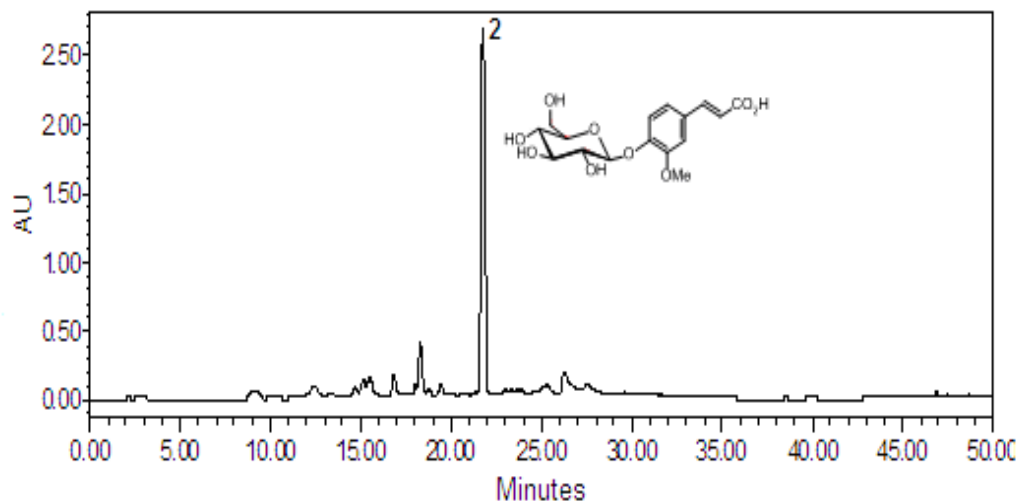
**Figure 38.** Chromatogramme de la fraction N2e de l'isolement du composé 4

L'extrait N3 après acidification à PH3 a été introduit dans une colonne ouverte de gel de silice et élué en utilisant des mélanges CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH de polarité croissante. Le fractionnement de l'extrait N3 est détaillé sur la figure 39. Les fractions collectées, suivie par CCM et par HPLC sont regroupées en six fractions (N3a-N3f). Pour connaître la fraction contenant les composés actifs à isoler nous avons procédé à l'analyse par HPLC et HPLC on-line des regroupements obtenus.

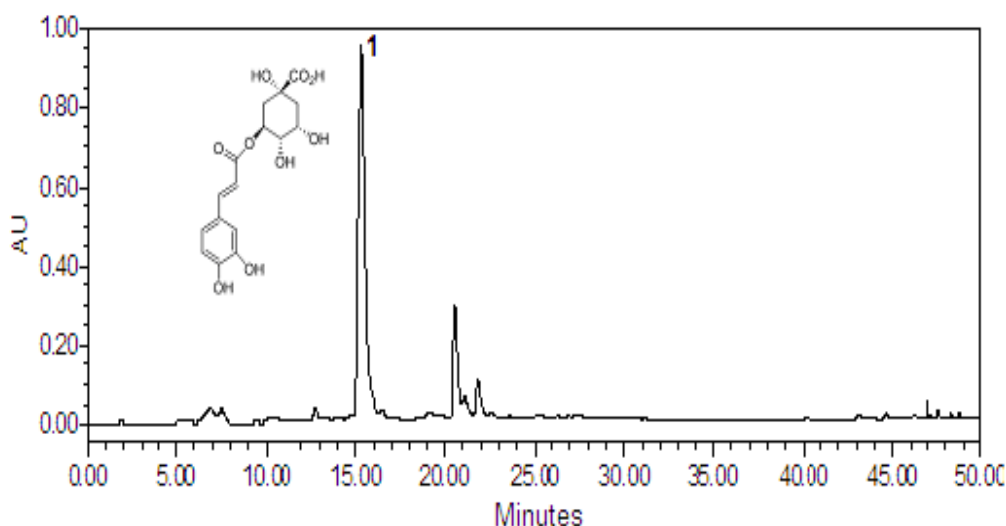


**Figure 39.** Fractionnement de l'extrait N3

Les fractions N3c et N3e ont par chromatographie préparative RP-HPLC conduit respectivement au composé 2 pur (5.1mg) et au composé 1 pur (6,3 mg). Les chromatogrammes des figures 40 et 41 ont servis à l'isolement des composés purs.



**Figure 40.** Chromatogramme de la fraction N3c de l'isolement du composé **2**



**Figure 41.** Chromatogramme de la fraction N3e de l'isolement du composé **1**

Précipité extrait P a été fractionné sur gel de silice avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : EtOH: acide formique de polarité croissante. Après analyse par CCM et CLHP, les fractions sont regroupées en cinq fractions majeures (P1-P5). La fraction P4 a été chromatographiée sur gel de silice avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : EtOH: acide formique de polarité croissante. Le fractionnement de l'extrait N3 est détaillé sur la figure 42

Les fractions collectées suivies par CCM et HPLC ont donné cinq fractions majeures (P4a-P4e). La fraction P4b a par chromatographie préparative RP-HPLC conduit aux composés purs **3** (70 mg) et **5** (34 mg). Le chromatogramme de la figure 43 a servi à l'isolement des composés purs.

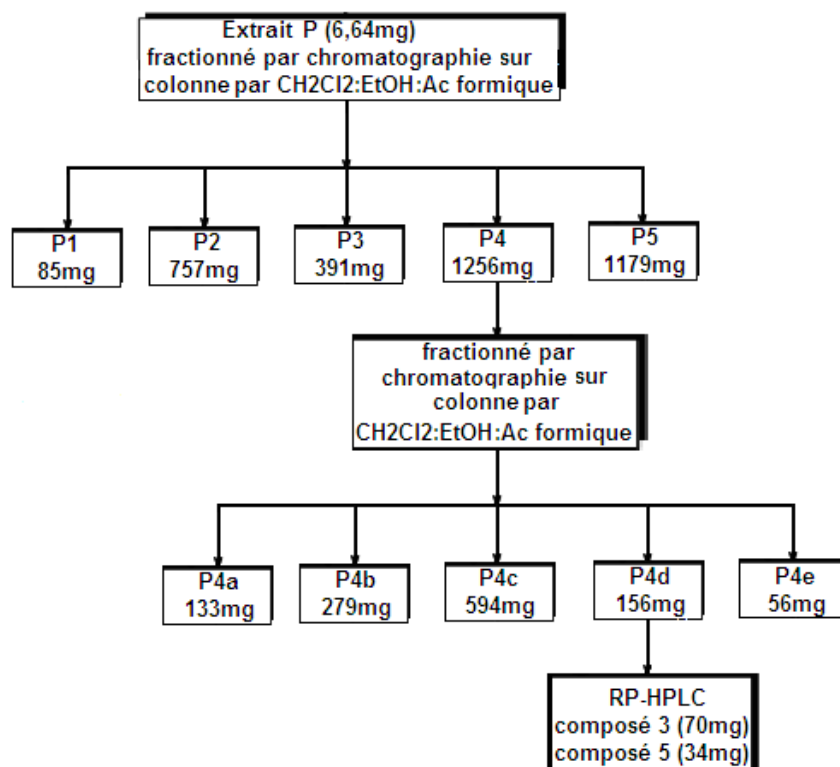


Figure 42. Fractionnement de l'extrait P

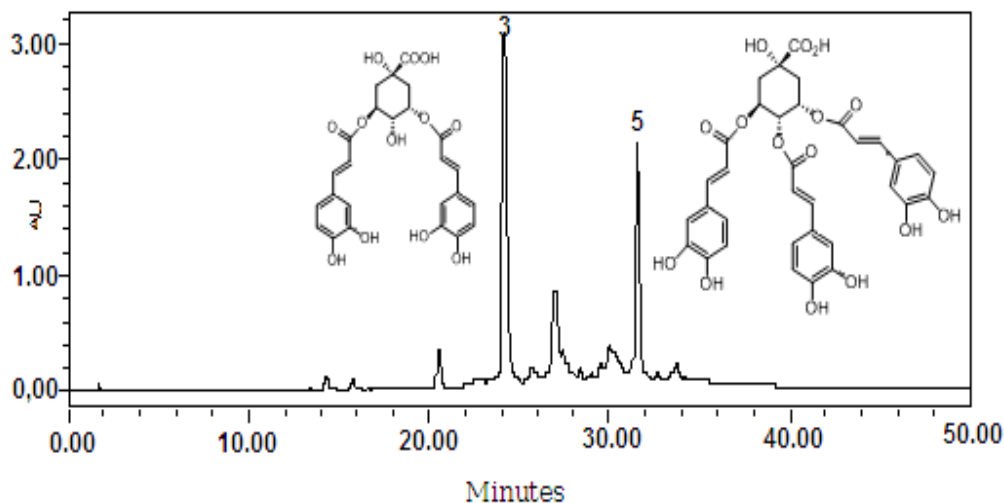


Figure 43. Chromatogramme de la fraction P4b de l'isolement des composés 3 et 5

Les cinq antioxydants présents dans les acides chlorogéniques d'*A. herba-alba* ont été isolés à l'état pur : 5-*O*-caféylquinique (1), 3,5-di-*O*-caféylquinique (3), 3,4-di-*O*-caféylquinique (4), 3, 4, 5-tri-*O*-caffeolquinic (5) et (*E*)-2-β-Glucopyranosyloxy-4-méthoxy- acide cinnamique (2).

### II.3.3. Elucidation structurale des composés isolés

Les cinq composés ont été caractérisés et identifiés par l'UV, IR, HRMS, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN 2D et par la mesure du pouvoir rotatoire  $\alpha_D$ . Les données spectrales des composés purs 1, 3, 4 et 5 sont en accord avec les données publiées précédemment.

Les spectres UV obtenus montrent deux bandes d'absorption avec un épaulement sur la bande I. Ces spectres sont caractéristiques des acides phénoliques (annexe 12).

Il apparaît que tous les composés possèdent deux bandes, la première à 203 nm pour les composés 1-4 à l'exception du composé 5 qui présente une bande à 216 nm. La deuxième bande est à 327-329 nm pour les composés 1,3-5 et le 2 présente une bande à 279 nm.

L'expérience de corrélation scalaire COSY permet de déterminer les positions exactes des signaux appartenant aux deux éléments de la molécule. Les attributions des signaux en RMN  $^{13}\text{C}$  sont réalisées grâce à un HSQC. Les enchaînements et les positions relatives des différents éléments sont confirmées par corrélation à longue distance HMBC.

Les déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , la nature du signal, les constantes de couplages, les attributions des signaux observés et les corrélations COSY et HMBC en RMN 2D sont représentés dans les tableaux 20 à 24, annexe 13 à 17.

Le composé **1** présente dans son spectre de masse ESI-MS (mode-négatif) l'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  353 correspondant à  $[\text{M-H}]^-$ , dans ESI-MS/MS (mode-négatif) l'ion fils à  $m/z$  191 qui correspond à l'acide quinique et dans HRESIFT-MS (mode-négatif) l'ion moléculaire  $m/z$  353.0882  $[\text{M-H}]^-$  (calculé pour  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9$ , 353.0873) ce qui concorde avec une formule moléculaire  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ , 354g/mole. Son spectre IR présente des bandes d'absorptions d'un hydroxyl ( $3342\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH acide carboxylique ( $2957$ ;  $2926\text{ cm}^{-1}$ ), un C=O ester ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ), un ester  $\alpha,\beta$ -insaturé ( $1601\text{ cm}^{-1}$ ), C-C Ar ( $1457\text{ cm}^{-1}$ ), un hydroxyl Ar ( $1377\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH Ar ( $1271\text{ cm}^{-1}$ ), un C-O ester ( $1182\text{ cm}^{-1}$ ) et un C-OH ( $1124\text{ cm}^{-1}$ ).

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 1 révèlent la présence d'un groupe cafféoyl confirmé par des signaux correspondants et par le couplage observé en HMBC entre le proton H-3 et le carbone C-9', Le caractère très déblindé du proton H-3 montre qu'il s'agit du site d'acylation par l'acide caféique.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  se caractérise par deux protons méthyléniques, un entre 2,15-2,13 ppm (2H, H-2, m) un autre à 2,06 ppm (H-6ax, d) et entre 2,28-2,25 ppm (H-6eq, m) et un proton déblindé à 5,35 ppm (H-3, m).

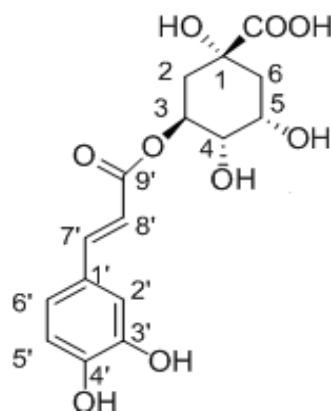
La présence d'un groupement cafféoyl est confirmé par les déplacements chimiques des protons aromatiques à 7,03 ppm (H-2', d), 6,76 ppm (H-5', d) et 6,92 ppm (H-6', dd) ainsi que les deux protons trans oléfiniques à 6,26 ppm (H-8', d, 15,9Hz) et 7,55 ppm (H-7', d, 15,9Hz).

Dans le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ , le groupement cafféoyl présente quatre carbones quaternaires dont deux hydroxylés avec des déplacements de 146,79 ppm (C-3') et 149,55 ppm (C-4') et un carbone ester avec un déplacement de 168,95 ppm (C-9').

Le spectre HMBC montre une tâche de corrélation entre H-3 et C-9' qui positionne l'acide caféique en C-3.

Ces données spectroscopiques, ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D^{25} -7.6^\circ$ , ont suggéré pour le composé 1, la structure identifiée comme Acide 3-O-(4,5-dihydroxycinnamoyl)-L-quinique ou 3-O-caféylquinique acide, ce qui est confirmé par la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles décrites dans la littérature<sup>168-173</sup>.

Les déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et Les corrélations COSY et HMBC en RMN 2D sont regroupés dans le tableau 21



**Acide 3-O-caféylquinique**

**Tableau 21.** Données de RMN  $^1\text{H}$ , de RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN 2D dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

<b>Acide 3-O-caféylquinique (1), <math>\delta</math> (ppm)</b>				
<b>C n</b>	<b><math>^1\text{H}</math>-</b>	<b>COSY (H)</b>	<b><math>^{13}\text{C}</math>-, HSQC</b>	<b>HMBC (C)</b>
1	-	-	74,16	-
2	2,15-2,13(2H; m)	H-3	38,22	C-7, C-1, C-4, C-3
3	5,35 (1H; m)	H-4	72,08	C-9', C-1, C-5

4	3,73 (1H; d; 7,0Hz)	H-3, H-5	74,16	C-3
5	4,21 (1H; m)	H-4	72,48	C-1, C-4, C-3
6eq	2,28-2,25 (1H; m)	H-6ax, H-5	39,78	C-7, C-4, C-5
6ax	2,06 (1H; d; 15,1Hz)	H-6eq, H-5		
7	-	-	175,33	-
1'	-	-	127,80	-
2'	7,03 (1H; d; 1,4Hz)	H-6'	115,19	C-3', C-4', C-7', C-6'
3'	-	-	146,79	-
4'	-	-	149,55	-
5'	6,76 (1H; d; 8,3Hz)	H-6'	116,50	C-3', C-1'
6'	6,92 (1H; dd; 1,4; 8,3Hz)	H-2', H-5'	122,96	C-2'
7'	7,55 (1H; d; 15,9Hz)	H-8'	147,03	C-9', C-6', C-2'
8'	6,26 (1H; d; 15,9Hz)	H-7'	115,37	C-1'
9'	-		168,95	-

Le composé **2** présente dans son spectre de masse ESI-MS (mode-négatif) l'ion quasi moléculaire à  $m/z$  355 correspondant à  $[M-H]^-$ , dans ESI-MS/MS (mode-négatif) les ion fils à  $m/z$  193, 149 et dans HRESIFT-MS l'ion moléculaire à  $m/z$  355.1020  $[M-H]^-$  (calculé pour  $C_{16}H_{19}O_9$ , 355.1029), ce qui concorde avec une formule moléculaire  $C_{16}H_{20}O_9$ , 356g/mole. Son spectre IR présente des bandes d'absorptions d'un hydroxyl ( $3327\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH acide carboxylique ( $2957; 2926\text{ cm}^{-1}$ ), un C=O acide carboxylique ( $1632\text{ cm}^{-1}$ ), un acide  $\alpha,\beta$ -insaturé ( $1632\text{ cm}^{-1}$ ), un éther ( $1160\text{ cm}^{-1}$ ), un éther pyranique ( $1006\text{ cm}^{-1}$ ) et un  $CH_2-OH$  ( $1074\text{ cm}^{-1}$ ).

Les spectres RMN  $^1H$  et RMN  $^{13}C$  du composé **2** révèlent la présence d'un glucoside confirmé par le couplage observé en HMBC entre le proton du glucose H-1' et le carbone aromatique C-2. Le caractère très déblindé du proton H-1' suggère la présence d'une liaison glycosidique.

Dans le spectre RMN  $^{13}C$ , nous observons seize signaux de carbones, dont quatre carbones quaternaires C-1, C-3, C-4 et C-9, un méthyl  $OCH_3$  montré par le DEPT 135 avec un déplacement de 62,60 ppm (C-6'). Six signaux sont attribués à des carbones glucosidiques (C-1'-C-6').

Dans le spectre RMN  $^1H$  cinq signaux attribués au proton glucoside ont été observés. La valeur de la constante de couplage ( $J = 7,8\text{ Hz}$ ) entre le proton anomérique de 4,95 ppm (H-1', d) et 3,56 ppm (H-2', dd) montre une position 1', 2'-protons diaxiale qui suggère une  $\beta$ -configuration pour le centre anomérique C-1'.

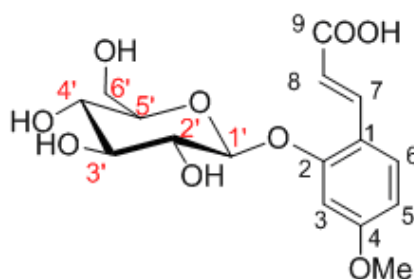
Les trois protons aromatiques 6,64 ppm (H-6, dd, 2,5 et 8,7 Hz), 6.84 ppm (H-3, d, 2,5Hz) et 7.55 ppm (H-5, d, 8,7Hz) ainsi que les deux protons du système oléfinique (double liaison éthyléniques) à 6,40 ppm (H-8, d) et 8.02 ppm (H-7, d) en position trans ( $J_{7,8} = 16.2$  Hz) suggèrent une fraction d'acide cinnamique.

Sur le spectre HMBC du composé 2 apparait une tâche de corrélation entre le signal du proton du glucose à (H-1') et le carbone aromatique (C-2) qui montre une liaison glycosidique sur le groupe 2-hydroxy de l'acide cinnamique.

En outre l'interaction entre le signal du proton méthoxyl à 3,82 ppm (OCH<sub>3</sub>) du carbone et le carbone C-4 à 164,36 ppm suggère le positionnement du groupe méthoxy en C-4 du cycle aromatique.

Ces données spectroscopiques, ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D^{25} -70.6^\circ$ , ont suggéré pour le composé 2, la structure identifiée comme le (*E*)-2- $\beta$ -Glucopyranosyloxy-4-méthoxy- acide cinnamique <sup>174</sup>.

Les déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C et Les corrélations COSY et HMBC en RMN 2D sont regroupés dans le tableau 22



**(*E*)-2 - $\beta$ -Glucopyranosyloxy-4-méthoxy- acide cinnamique**

**Tableau 22.** Donnés de RMN <sup>1</sup>H, de RMN <sup>13</sup>C et RMN 2D dans CD<sub>3</sub>OD

<b>(<i>E</i>)-2 -<math>\beta</math>-Glucopyranosyloxy-4-méthoxy- acide cinnamique (2), <math>\delta</math> (ppm)</b>				
<b>C n</b>	<b><sup>1</sup>H-</b>	<b>COSY (H)</b>	<b><sup>13</sup>C-, HSQC</b>	<b>HMBC (C)</b>
1	-	-	118,08	-
2	-	-	159,00	-
3	6,84 (1H; d; 2,5Hz)	H-6	102,60	C-4, C-3, C-1, C-6
4	-	-	164,36	-
5	7,55 (1H; d; 8,7Hz)	H-6	129,98	C-4, C-3, C-7
6	6,64 (1H; dd; 2,5; 8,7Hz)	H-2, H-5	109,91	C-1
7	8,02 (1H; d; 16,2Hz)	H-8	141,25	C-9, C-3, C-5, C-8
8	6,40 (1H; d; 16,2Hz)	H-7	116,83	C-9, C-1
9	-	-	171,80	-
1'	4,95 (1H; d; 7,8Hz)	H-2'	102,55	C-3
2'	3,56 (2H; dd; 7,8; 9,1Hz)	H-1', H-3', H-4', H-5'	74,86	C-1', C-3'

3'	3,48 (H; t; 9,1Hz)	H-2', H-4', H-5'	78,14	C-2', C-4'
4'	3,38 (H; t; 9,1Hz)	H-2', H-3', H-5'	71,44	C-3'
5'	3,48 (H; ddd; 2,2; 6,0; 9,1Hz)	H-6', H-2', H-3', H-4'	78,44	C-4'
6'	3,90 (1H; dd; 12,2; 2,2Hz) 3,68 (1H; dd; 12,2; 6,0Hz)	H-6', H-5'	62,60	C-5'
MeO	3,82 (3H; s)	-	56,04	C-4

Le composé **3** présente dans son spectre de masse ESI-MS (mode-négatif) l'ion quasi moléculaire à  $m/z$  515 correspondant à  $[M-H]^-$ , dans ESI-MS/MS (mode-négatif) les ion fils  $m/z$  355, 191, 173 et dans HRESIFT-MS  $m/z$  515.1169  $[M-H]^-$  (calculé pour  $C_{25}H_{23}O_{12}$ , 515.1190), ce qui concorde avec une formule moléculaire  $C_{25}H_{24}O_{12}$ , 516g/mole. Son spectre IR présente des bandes d'absorptions d'un hydroxyl ( $3373\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH acide carboxylique ( $2916; 2849\text{ cm}^{-1}$ ), un C=O ester ( $1733\text{ cm}^{-1}$ ), un ester  $\alpha,\beta$ -insaturé ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ), C-C Ar ( $1469\text{ cm}^{-1}$ ), un hydroxyl Ar ( $1375\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH Ar ( $1271\text{ cm}^{-1}$ ), un C-O ester ( $1181\text{ cm}^{-1}$ ) et un C-OH ( $1121\text{ cm}^{-1}$ ).

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **3** révèlent la présence d'un deuxième groupe cafféoyl par rapport au composé **1** confirmé par le dédoublement des signaux correspondants et par le couplage observé en HMBC entre le proton H-5 et le carbone C-9'' et le caractère très déblindé du proton H-5 montre qu'il s'agit du site d'acylation par l'acide caféique.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  se caractérise par deux protons méthyléniques, un entre 2,22-2,17 ppm (2H, H-2, m) l'autre entre 2,17-2,13 ppm (H-6ax, m) et 2,31 ppm (H-6eq, d) ainsi que deux protons déblindés à 5,39 ppm (H-3, m) et à 5,42 ppm (H-5, m).

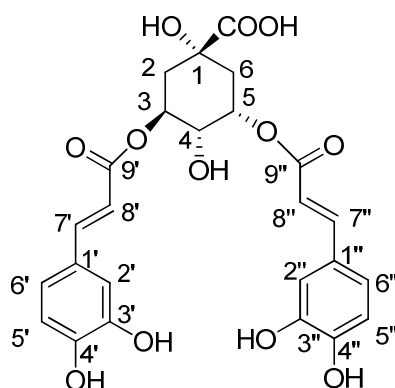
La présence de deux groupements cafféoyl est confirmée par les déplacements des protons aromatiques à 7,06 ppm (H-2' et H-2'', s), 6,77 ppm (H-5' et H-5'', d) et 6,95 ppm (H-6' et H-6'', d) également les protons trans oléfiniques à 6,25; 7,57 ppm (H-8'et H-7', d, 15,9Hz) et 6,35; 7,61 ppm (H-8''et H-7'', d, 15,9Hz).

Dans le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$ , les groupements cafféoyl présentent chacun quatres carbone quaternaire dont deux hydroxylé avec des déplacements de 146,76 ppm (C-3'et C-3'') et 149,47; 149,56 ppm (C-4' et C-4'') et deux carbones ester avec un déplacement de 168,45; 168,90 ppm (C-9'et C-9'').

Le spectre HMBC montre une tache de corrélation entre H-3 et C-9' qui positionne l'acide caféique en C-3. De plus la grande similitude sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  des signaux de H-3 et H-5 suggère que le second cafféoyl est en position C-5.

Ces données spectroscopiques, ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D^{25} -123,2^\circ$ , ont suggéré pour le composé 3, la structure identifiée comme Acide 3, 5-di-O-(4,-hydroxycinnamoyl)-L-quinique ou 3, 5-di-O-caféylquinique acide, ce qui est confirmé par la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celle décrite dans la littérature.<sup>169-173,</sup>  
175

Les déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et Les corrélations COSY et HMBC en RMN 2D sont regroupés dans le tableau 23



Acide 3, 5-di-O-caféoylquinique

Tableau 23. donnés de RMN  $^1\text{H}$ , de RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN 2D dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

Acide 3, 5-di-O-caféoylquinique (3), $\delta$ (ppm)				
C n	$^1\text{H}$ -	COSY (H)	$^{13}\text{C}$ -, HSQC	HMBC (C)
1	-	-	75,01	-
2	2,22-2,17 (2H; m)	H-3	37,95	C-1, C-3, C-4, C-7
3	5,39 (1H; m)	H-4	72,09	C-4, C-5, C-1, C-9'
4	3,96 (1H; dd; 2,9 et 7,6 Hz)	H-3, H-5	70,94	C-3, C-5
5	5,42 (1H; m)	H-4	72,75	C-1
6eq	2,31 (1H; d; 12Hz)	H-6ax, H-5	36,17	C-1, C-5, C-4, C-7
6ax	2,17-2,13 (1H; m)	H-6eq, H-5		
7	-	-	177,76	-
1'	-	-	127,81	-
2'	7,06 (1H; s)	H-6'	115,16	C-6', C-7', C-4'
3'	-	-	146,76	-
4'	-	-	149,47	-
5'	6,77 (1H; d; 8,1Hz)	H-6'	116,48	C-6', C-1', C-3', C-4'
6'	6,95 (1H; d; 8,1Hz)	H-5', H-2'	123,05	C-7', C-4'
7'	7,57 (1H; d; 15,9Hz)	H-8'	147,24	C-2'; C-8', C-6', C-9'
8'	6,25 (1H; d; 15,9Hz)	H-7'	115,26	C-1', C-9'
9'	-	-	168,45	-
1''	-	-	127,94	-
2''	7,06 (1H; s)	H-6''	115,16	C-6'', C-7'', C-4''

3''	-	-	146,76	-
4''	-	-	149,56	-
5''	6,77 (1H; d; 8,1Hz)	H-6''	116,48	C-6'', C-1'', C-3'', C-4''
6''	6,95 (1H; d; 8,1Hz)	H-5'', H-2''	122,99	C-7'', C-4''
7''	7,61 (1H; d; 15,9Hz)	H-8''	147,04	C-2'', C-8'', C-6'', C-9''
8''	6,35 (1H; d; 15,9Hz)	H-7''	115,62	C-1'', C-9''
9''	-	-	168,90	-

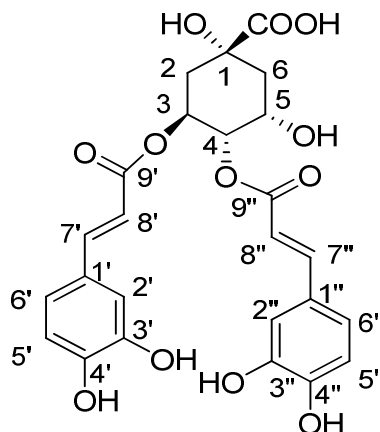
Le composé **4** présente dans son spectre de masse ESI-MS (mode-négatif) l'ion quasi moléculaire à  $m/z$  515 correspondant à  $[M-H]^-$ , dans ESI-MS/MS les ions moléculaires à  $m/z$  513, 353 et 173 et dans HRESIFT-MS  $m/z$  515.1207  $[M-H]^-$  (calculé pour  $C_{25}H_{23}O_{12}$ , 515.1190), ce qui concorde avec une formule moléculaire  $C_{25}H_{24}O_{12}$ , 516g/mole. Son spectre IR présente des bandes d'absorptions d'un hydroxyl ( $3373\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH acide carboxylique ( $2916; 2849\text{ cm}^{-1}$ ), un C=O ester ( $1697\text{ cm}^{-1}$ ), un ester  $\alpha,\beta$ -insaturé ( $1597\text{ cm}^{-1}$ ), C-C Ar ( $1466\text{ cm}^{-1}$ ), un hydroxyl Ar ( $1375\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH Ar ( $1268\text{ cm}^{-1}$ ) et un C-O ester ( $1162\text{ cm}^{-1}$ ).

Le composé **4** est un isomère du composé **3** sachant que le second cafféoyl se présente en position 4 au lieu de 5. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  le confirment par le dédoublement des signaux correspondant et par le couplage observé en HMBC entre le proton H-4 et le carbone C-9'' et le caractère très déblindé du proton H-4 montre qu'il s'agit du site d'acylation par l'acide caféique.

Le spectre HMBC le confirme par la tâche H-4 et C- 9'' qui positionne le second cafféoyl en C-4. De plus la grande similitude sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  des signaux de H-3 et H-4 suggère que le second cafféoyl est en position C-4.

Ces données spectroscopiques, ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D^{25} -199,6^\circ$ , ont suggéré pour le composé **4**, la structure identifiée comme Acide 3, 4-di-O-(5,-hydroxycinnamoyl)-L-quinique ou 3, 4-di-O-caféylquinique acide, ce qui est confirmé par la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celle décrite dans la littérature.<sup>169, 170, 173, 175, 176</sup>

Les déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et Les corrélations COSY et HMBC en RMN 2D sont regroupés dans le tableau 24.



Acide 3, 4-di-*O*-cafféoylquinique

Tableau 24. Données de RMN  $^1\text{H}$ , de RMN  $^{13}\text{C}$  et RMN 2D dans  $\text{CD}_3\text{OD}$

Acide 3, 4-di- <i>O</i> -cafféoylquinique (4), $\delta$ (ppm)				
C n	$^1\text{H}$ -	COSY (H)	$^{13}\text{C}$ -, HSQC	HMBC (C)
1	-	-	75,87	-
2	2,19-2,31 (2H; m)	H-3	39,48	C-1, C-3, C-4, C-7
3	5,62 (1H; ddd; 5,0; 9,3 et 13,8Hz)	H-4	69,02	C-1, C-4, C-9'
4	5,11 (1H; dd; 2,9 et 9,1Hz)	H-5, H-3	75,87	C-3, C-5, C-9''
5	4,37 (1H; m)	H-4	69,49	C-3, C-4, C-9''
6eq	2,28 (1H; d, 13,8Hz)	H-6ax, H-5	38,41	C-5, C-4
6ax	2,10(1H; dd; 3,5 et 14,0Hz)	H-5, H-6eq		
7	-	-	175,25	-
1'	-	-	127,66	-
2'	6,99 (1H; d; 1,9Hz)	H-6'	115,17	C-6', C-3', C-7', C-4'
3'	-	-	146,74	-
4'	-	-	149,66	-
5'	6,73 (1H; d; 8,0Hz)	H-6'	116,47	C-6', C-1', C-3', C-4'
6'	6,89 (1H; dd; 1,9 et 8,0Hz)	H-2', H-5'	123,12	C-2', C-7', C-4'
7'	7,50 (1H; d; 15,8Hz)	H-8'	147,57	C-8', C-6', C-9'
8'	6,18 (1H; d; 15,8Hz)	H-7'	114,71	C-1', C-9'
9'	-	-	168,27	-
1''	-	-	127,72	-
2''	7,01 (1H; d; 1,9Hz)	H-6''	115,19	C-6'', C-3'', C-7'', C-4''
3''	-	-	146,76	-
4''	-	-	149,66	-
5''	6,74 (1H; d; 8,0Hz)	H-6''	116,47	C-6'', C-1'', C-3'', C-4''
6''	6,91 (1H; dd; 1,9 et 8,0Hz)	H-2'', H-5''	123,12	C-2''; C-7'', C-4''
7''	7,59 (1H; d; 15,8Hz)	H-8''	147,70	C-8'', C-6'', C-9''
8''	6,26 (1H; d; 15,8Hz)	H-7''	114,75	C-1'', C-9''
9''	-	-	168,57	-

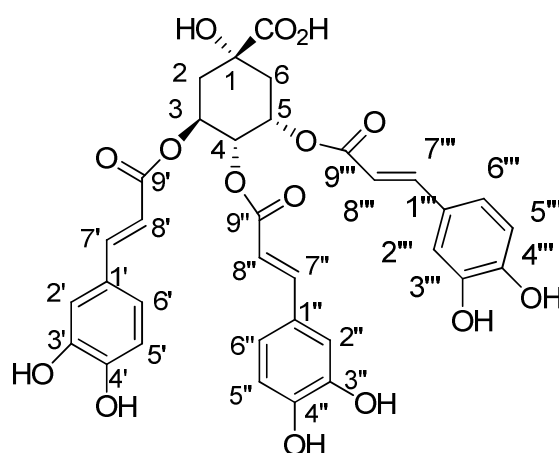
Le composé **5** présente dans son spectre de masse ESI-MS (mode-négatif) l'ion quasi moléculaire à  $m/z$  677 correspondant à  $[M-H]^-$ , dans ESI-MS/MS (mode-négatif) les ions fils à  $m/z$  515, 353, 265 et 160 et dans HRESIFT-MS  $m/z$  677.1507  $[M-H]^-$  (calculé pour  $C_{34}H_{29}O_{15}$ , 677.15065) ce qui concorde avec une formule moléculaire  $C_{34}H_{30}O_{15}$ , 678g/mole. Son spectre IR présente des bandes d'absorptions d'un hydroxyl ( $3369\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH acide carboxylique ( $2959\text{ cm}^{-1}$ ), un C=O ester ( $1691\text{ cm}^{-1}$ ), un ester  $\alpha,\beta$ -insaturé ( $1629, 1601\text{ cm}^{-1}$ ), C-C Ar ( $1445\text{ cm}^{-1}$ ), un hydroxyl Ar ( $1365\text{ cm}^{-1}$ ), un C-OH Ar ( $1274\text{ cm}^{-1}$ ), un C-O ester ( $1160\text{ cm}^{-1}$ ) et un C-OH ( $1115\text{ cm}^{-1}$ ).

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **5** révèlent la présence de trois groupes cafféoyl confirmés par le triplement des signaux correspondant et par le couplage observé en HMBC entre le proton H-3, H-4 et H-5 et le carbone C-9', C-9'' et C-9''' le caractère très déblindé des protons H-3, H-4 et H-5 montrent qu'il s'agit des sites d'acylation par l'acide caféique.

Le spectre HMBC le confirme par les tâches H-3 et C- 9', H-4 et C- 9'' et H-5 et C- 9''' qui places les trois cafféoyl en C-3, C-4 et C-5. De plus la grande similitude sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  des signaux de H-3, H-4 et H-5 confirme ce positionnement.

Ces données spectroscopiques, ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire spécifiques  $[\alpha]_D^{25} -285,1^\circ$ , ont suggéré pour le composé **4**, la structure identifiée comme Acide 3, 4, 5-tri-O-(hydroxycinnamoyl)-L-quinique ou 3, 4, 5-di-O-caféylquinique acide, ce qui est confirmé par la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celle décrite dans la littérature.<sup>169</sup>

Les déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et Les corrélations COSY et HMBC en RMN 2D sont regroupés dans le tableau 25.



**Acide 3, 4, 5-tri-O-caféoylquinique**

**Tableau 25.** données de RMN <sup>1</sup>H, de RMN <sup>13</sup>C et RMN 2D dans CD<sub>3</sub>OD

<b>Acide 3, 4, 5-tri-O-caffeoylquinique (5), δ (ppm)</b>				
<b>C n</b>	<b>1H-</b>	<b>COSY (H)</b>	<b><sup>13</sup>C-, HSQC</b>	<b>HMBC (C)</b>
1	-	-	74,87	-
2	2,39-2,25 (2H; m)	H-3	38,73	C-1, C-3, C-4, C-7
3	5,67 (1H; m)	H-4	69,15	C-1, C-4
4	5,32 (1H; dd; 8,5 et 3,3Hz)	H-3, H-5	72,79	C-3, C-5
5	5,67 (1H, m)	H-4	70,07	C-1
6eq	2,46 (1H; d; 12,8Hz)	H-6ax, H-5	36,71	C-5, C-4
6ax	2,18 (1H; dd; 12,8 et 4,3Hz)	H-6eq, H-5		
7	-	-	177,41	-
1'	-	-	127,78	-
2'	7,06 (1H; 1,6 Hz)	H-6'	115,15	C-6', C-3', C-7', C-4'
3'	-	-	146,71	-
4'	-	-	149,61	-
5'	6,77 (1H; d.; 8,3Hz)	H-6'	116,50	C-6', C-1', C-3', C-4'
6'	6,93 (1H; dd; 1,6 et 8,3Hz)	H-2', H-5'	123,22	C-2', C-7', C-4'
7'	7,60 (1H; d; 15,8Hz)	H-8'	147,57	C-8', C-6', C-9'
8'	6,32 (1H; d; 15,8Hz)	H-7'	115,16	C-1', C-9'
9'	-	-	168,51	-
1''	-	-	127,54	-
2''	7,01 (1H; d; 1,8Hz)	H-6''	115,24	C-6'', C-3'', C-7'', C-4''
3''	-	-	146,71	-
4''	-	-	149,66	-
5''	6,74 (1H; d; 8,3Hz)	H-6''	116,54	C-6'', C-1'', C-3'', C-4''
6''	6,91 (1H; dd; 1,8 et 8,3Hz)	H-2'', H-5''	123,18	C-2'', C-7'', C-4''
7''	7,53 (1H; d; 15,9Hz)	H-8''	147,71	C-8'', C-6'', C-9''
8''	6,21 (1H; d; 15,9Hz)	H-7''	114,61	C-1'', C-9''
9''	-	-	168,09	-
1'''	-	-	127,65	-
2'''	6,98 (1H; d; 1,9Hz)	H-6'''	115,02	C-6''', C-3''', C-7''', C-4'''
3'''	-	-	146,76	-
4'''	-	-	149,71	-
5'''	6,70 (1H; d; 8,3Hz)	H-6'''	116,54	C-6''', C-1''', C-3''', C-4'''
6'''	6,83 (1H; dd; 1,9 et 8,3Hz)	H-2''', H-5'''	123,41	C-2''', C-7''', C-4'''
7'''	7,51 (1H; d; 15,9Hz)	H-8'''	147,91	C-8''', C-6''', C-9'''
8'''	6,20 (1H; d; 15,9Hz)	H-7'''	114,34	C-1''', C-9'''
9'''	-	-	168,12	-

Le composé (1) a déjà été isolé dans cette plante,<sup>101</sup> les composés (3) et (4) ont été isolés à partir d'autres espèces d'*Artémisia*,<sup>177-181</sup> mais les composés (5) et (2) sont des nouveaux produit naturel dans l'espèce *Artémisia*.<sup>169, 174</sup>

### II.3.4. Activité radicalaire des antioxydants isolés

L'évaluation de l'activité antioxydante des composés isolés de l'*A.herba-alba* a été effectuée en termes de capacité de capture des radicaux libres, en utilisant le radical DPPH. Pour chaque composé nous avons préparé six concentrations différentes, de sorte qu'elles couvrent la gamme qui comprend à la concentration produisant 50% de la capture du radical. Le pourcentage de DPPH restant a été calculé comme suit:<sup>182</sup>

$$\% \text{ DPPH}_{res} = \frac{[\text{DPPH}]}{[\text{DPPH}]_0} \times 100 \quad \text{où}$$

[DPPH] est la concentration du radical DPPH mesurée à (t = 15 min)

[DPPH]<sub>0</sub> est la concentration initiale de la solution méthanolique du radical DPPH (t = 0 min). Les deux concentrations sont déterminées par l'interpolation de la valeur de l'absorbance dans l'équation de régression d'une courbe d'étalonnage de calibrage de DPPH (y = 0.1121x + 0.0055, R<sup>2</sup> = 0,9991). Le DPPH% restant est proportionnelle à la concentration en antioxydants.

Les valeurs des pourcentages de DPPH restant à 15min sont représentées comme une fonction de la concentration en antioxydant. La concentration efficace (CE<sub>50</sub>)<sup>163</sup> d'un composé ayant une activité antioxydante est définie comme une concentration d'antioxydant nécessaire pour que le pourcentage de DPPH se réduise de moitié (50% de capture du radical)

Dans le tableau 26 et annexe 23 sont rapportées les valeurs de CE<sub>50</sub> des composés purs isolés de l'*A.herba-alba* dans l'ordre décroissant de l'activité. Parmi ces composés acides, le plus actif est le 3, 4, 5-tri-*O*-cafféoylquinique (**5**), suivi par le 3, 4-di-*O*-cafféoylquinique (**4**), et le 3, 5-di-*O*-cafféoylquinique (**3**) avec des valeurs de CE<sub>50</sub> presque égales. Le (*E*)-2-β-Glucopyranosyloxy-4-méthoxy- acide cinnamique (**2**) présente une concentration plus élevée que 250µg/mL

On constate une faible activité exercée par la molécule **2** sur le DPPH. Ceci n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où la structure chimique de la molécule ne comporte aucun groupement typiquement antioxydant. Les dérivés cafféoylquiniques testés ont, eux, montré une bonne activité inhibitrice. L'activité antioxydante augmente avec le nombre de groupement cafféoyl présents dans le composé.

**Tableau 26.** Valeurs des CE<sub>50</sub> (µg/mL) des composés isolés dans le test de l'inhibition du radical DPPH

Composés	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
3, 4, 5-tri- <i>O</i> -cafféoylquinique (5)	9.96
3, 4-di- <i>O</i> -cafféoylquinique (4),	14.08
3, 5-di- <i>O</i> -cafféoylquinique (3),	14.29
5- <i>O</i> -cafféoylquinique (1),	25.17
( <i>E</i> )-2-β-D-Glucopyranosyloxy-4-méthoxy- acide cinnamique (2)	>200

#### II.4. Intérêt biologique

L'acide 3,5-*O*-dicafféoylquinique (3, 5-diCQ) et ses différents dérivés ont été identifiés chez de nombreuses espèces d'intérêt agronomique appartenant à différentes familles botaniques (rozases, astéracées, rubiacées et convolvulacées). Plusieurs centaines de publications décrivent la présence de ces substances chez ces différentes espèces et mettent en évidence leurs propriétés chimiques et biologiques.

Ces composés présentent une forte activité antioxydante, qui leur confère un grand intérêt d'un point de vue nutritionnel.<sup>183-186</sup> Ils montrent également de multiples propriétés médicinales, entre autres en tant qu' analgésiques,<sup>187</sup> antihypertenseurs,<sup>188</sup> hépatoprotecteurs,<sup>189</sup> antiinflammatoires<sup>190</sup> et anticancéreux.<sup>191</sup>

Ces composés sont présents dans des préparations utilisées en médecine traditionnelle, dans des extraits végétaux actuellement commercialisés (extraits à base d'artichaut ou d'échinacée) et dans la propolis.<sup>188, 189</sup> Ils possèdent également d'importantes propriétés anti-infectieuses, notamment antivirales. Ils constituent une nouvelle classe d'antirétrovirus, en particulier pour le traitement du SIDA, par leur action inhibitrice sur l'intégrase du HIV.<sup>191-194</sup>

Le brevet EP 1008344 décrit l'utilisation de ce groupe de molécules dans le traitement de l'hépatite B, la demande internationale WO2006127525 encourage leur utilisation dans le traitement du sida, la demande japonaise JP2006213636 préconise l'utilisation de ce groupe de molécules dans le traitement de cancers, la demande EP0577516 décrit des compositions dermatologiques dépigmentantes qui les contiennent et la demande EPI 312373 évoque leurs effets anti-allergiques.

Les propriétés fongicides de ces molécules ont également été fréquemment montrées.<sup>195-197</sup> En revanche, les propriétés insecticides ont été beaucoup plus rarement étudiées et les résultats sont très discordants. Bien que certains auteurs aient établi une

corrélation entre la teneur élevée en diCQA des racines de cultivars de laitue et leur résistance à un aphidé (*Pemphigus bursarius*), ils n'ont jamais montré l'activité biologique directe de ces molécules vis à vis de l'insecte.<sup>198</sup> D'autres auteurs ont montré que certains dérivés présentaient peu ou pas d'activité insecticide chez des insectes broyeurs.<sup>199</sup> Certains auteurs ont même montré un effet phagostimulant de 3, 5-diCQA sur des insectes broyeurs.

Cependant, le 3, 5-diCQA et ses isomères, à part le 1, 3-diCQA (ou cynarine), isolée de l'artichaut, ne sont pas aisément disponibles commercialement. Aussi ces composés doivent-ils être extraits de différents végétaux. Outre l'artichaut, on peut citer le café (EP0299107) et le tournesol chez qui on a décrit la surproduction de composés phénoliques et plus particulièrement d'acides dicaféoylquiniques.

Il existe donc un besoin important de développer des procédés d'obtention de 3, 5- diCQA et de ses dérivés faciles à mettre en œuvre et présentant un fort rendement.

### **III. Partie expérimentale**

#### **III.1. Etude préliminaire et activité antioxydante**

##### **III.1.1. Matière végétale et conditions d'extraction**

###### **a. Matériel Botanique (EVa)**

Les échantillons d'A *herba-alba* utilisés dans cette étude ont été recueillis des régions de M'sila, de Bouira, de Djelfa et de Laghouat dans les hauts plateaux algériens en Juin 2007 au stade de floraison. L'authentification des échantillons a été réalisée au Laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université Houari Boumediene. Bab Ezzouar, Alger. Les échantillons on été séchés à température ambiante avant de les broyer.

###### **b. Extraction par hydrolyse (EVb)**

La matière végétale (2g) broyée de chaque région est hydrolysée par 100mL de HCL 2N pendant 40 min à 40°C et extraite par l'éther de pétrole à température ambiante, la solution obtenue est évaporée à sec pour donner un extrait étheré. La phase aqueuse (acide) est ensuite extraite par le n-BuOH ; après évaporation à sec, on obtient un résidu buthanolique.

### **c. Extraction par soxhlet (EVc)**

La matière végétale (40g) de la région de M'sila coupée en menus morceaux de 1 cm de long est extraite au soxhlet par différents solvants (méthanol, diéthyl éther, chloroforme et éthanol). L'extraction continue durant 5 heures. La récupération de la concrète du solvant s'effectue à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide.

## **III.1.2. Etude structurale des composés antioxydants**

### **a. Matériel Botanique (EVd)**

L'échantillon d'A *herba-alba* utilisé dans cette étude a été recueilli de la région de M'sila (400 km au sud-est d'Alger) dans les hauts plateaux algérien en Juin 2008 au stade de floraison. L'authentification des échantillons a été réalisée au Laboratoire de Biologie végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université Houari Boumediene. Bab Ezzouar, Alger. L'échantillon a été stocké un mois dans un endroit sec et sombre à température ambiante. Juste avant de commencer l'extraction, les parties aériennes sont réduites en poudre.

### **b. Extraction et isolement (EVe)**

La partie aérienne en poudre (1,20 kg) d'A *herba-alba* a été extraite par macération pendant 24h avec de l'EtOH à température ambiante, la phase récupérée est évaporée à sec à pression réduite et à une température inférieure à 40°C pour donner un résidu verdâtre N0 (59.93g). Le résidu (10g) solubilisé dans 200mL de NaCl 10% est extrait par (3x200ml) de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, évaporé à sec on récupère l'extrait N1 (35.72g). La phase aqueuse est ensuite extraite par (3x200mL) l' EtOAc, deux extraits sont récupérés après évaporation à pression réduite N2 (2.84g) et le précipité P (6.64g). La phase aqueuse est acidifiée à PH 3 avec du HCL à 5% et extraite par EtOAc (3x 150mL), on obtient un extrait N3 (1.41g). La phase aqueuse extraite par le n-BuOH (3x 200mL) donne l'extrait N4 (4.97g).

Toutes les fractions ont été évaluées pour leur activité de capture du radical DPPH par la mesure spectrophotométrique et par analyse HPLC et HPLC on-line par les méthodes citées ci dessus.

L'extrait acétate d'éthyle (N2) (2.84g) a été fractionné par chromatographie sur colonne conventionnelle ouverte sur 250g de gel de silice Flash (0,04-0,06 mm) humecté avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (90:10). L'échantillon introduit est adsorbé sur 6g de gel de silice (0,04-0,20mm) et élué en utilisant des mélanges CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH de polarité croissante (400mL), 22

fractions de 175 ml ont été collectées (2,365g) et analysées par CCM et HPLC, les fractions qui présentent une même composition sont rassemblées et évaporées à sec à pression réduite et à une température inférieure à 40°C. Les regroupements ont conduit à cinq fractions majeures (tableau 27).

**Tableau 27** : Fractionnement de l'extrait N2

<b>Extrait N2</b>		
<b>Regroupement</b>	<b>Fractions</b>	<b>Masse (mg)</b>
N2a	2-6	356
N2b	7-12	1,214
N2c	13-15	341
N2d	16-18	309
N2e	19-22	145

Fractions d'éluion : DCM-EtOH (90:1, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 15:85), EtOH et MeOH.

Une fois les regroupements réunis, ils sont analysés par CCM et par HPLC à des concentrations de 10mg/mL dans du méthanol et 10µl sont injectés en utilisant un mélange H<sub>2</sub>O avec 0,2% de CH<sub>3</sub>COOH (solution A) et MeOH avec 0,2% de CH<sub>3</sub>COOH (solution B) à un débit de 0,7mL/min par la méthode d'éluion indiquée dans (III.1.2c).

La fraction N2c a par chromatographie préparative RP-HPLC avec un gradient linéaire de 30 à 70% de solvant A en 30 min conduit au composé **3** pur (15.5mg). La fraction N2e a par chromatographie préparative RP-HPLC avec un gradient linéaire de 30 à 70% de solvant A en 30 min, conduit au composé **4** pur (7,7 mg).

### **Composé 3**

Temps de rétention: 25min

$[\alpha]_D^{25} -123.2^\circ$  (c 078cg/mL, MeOH) ; UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (0.76), 328 (0.56) nm.

IR (MeOH)  $\nu_{max}$  3373 (O-H), 2916; 2849 (R-COOH), 1733 (C=O ester) 1600 (C=O ester  $\alpha,\beta$ -insaturé), 1469 (C-C ar) 1375 (O-H ar), 1271 (C-OH ar), 1181 (C-O ester) et 1121 (C-OH)  $cm^{-1}$

ESI-MS  $m/z$  515 ([M-H]<sup>-</sup>); ESI-MS/MS  $m/z$  353, 191 et 173; HRESIFT-MS  $m/z$  515.1169 [M-H]<sup>-</sup> (calculé pour C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub>, 515.1190)

### **Composé 4**

Temps de rétention: 27min

$[\alpha]_D^{25} -199.6^\circ$  (c 0,39cg/mL, MeOH) ; UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (0.81), 329 (0.59).

IR (MeOH)  $\nu_{\max}$  IR (neat)  $\nu_{\max}$  3373 (O-H), 2916; 2849 (R-COOH), 1697 (C=O ester) 1597 (C=O ester  $\alpha,\beta$ -insaturé), 1466 (C-C ar) 1375 (O-H ar), 1268 (C-OH ar), et 1162 (C-O ester)  $\text{cm}^{-1}$

ESI-MS  $m/z$  515 ( $[\text{M-H}]^-$ ); ESI-MS/MS  $m/z$  513, 353 et 173; HRESIFT-MS  $m/z$  515.1207  $[\text{M-H}]^-$  (calculé pour  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_{12}$ , 515.1190).

L'extrait d'acétate d'éthyle après acidification à PH3 (N3) (1.405g) a été fractionné par chromatographie sur colonne ouverte sur 150g de gel de silice Flash (0,04-0,06 mm) humecté avec 500mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (80 ; 20), l'échantillon introduit est adsorbé sur 3g de gel de silice (0,04-0,20 mm) et élué en utilisant des mélanges  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$  de polarité croissante. 110 fractions de 50 ml ont été collectées avec un total de masse de 1,415g, les fractions sont évaporées à sec est analysées par CCM et par HPLC. Les fractions similaires sont regroupées et évaporées pour donner six fractions de masse totale de 1,287g (tableau 28).

**Tableau 28.** Fractionnement de l'extrait N3

<b>Extrait N3</b>		
<b>Regroupement</b>	<b>Fractions</b>	<b>Masse (mg)</b>
N3a	2-22	166
N3b	23-24	174
N3c	25-27	128
N3d	28-61	291
N3e	62-87	456
N3f	88-98	72

Fractions d'éluion : DCM :AcOEt (80:2, 70:30), DCM:EtOH (70:30, 65:35, 60:40, 50:50, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 10:90), EtOH et MeOH.

Une fois les regroupements réunis, ils sont analysés par CCM et par HPLC à des concentrations de 10mg/mL dans du méthanol et 10 $\mu$ l sont injectés en utilisant un mélange  $\text{H}_2\text{O}$  avec 0,2% de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (solution A) et MeOH avec 0,2% de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (solution B) à un débit de 0,7mL/min par la méthode d'éluion indiqué dans (III.1.2c).

La fraction N3c a, par chromatographie préparative RP-HPLC avec un gradient linéaire de 30 à 70% de solvant A en 30 min, conduit au composé **2** pur (5,1 mg). La fraction N2e (150 mg) a par chromatographie préparative RP-HPLC avec un gradient linéaire de 20 à 50% de solvant A en 30 min, conduit au composé pur **1** (6,3 mg).

### Composé 1

Temps de rétention: 15min

$[\alpha]_D^{25} -7.6^\circ$  (*c* 0,32cg/mL, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (0.75), 327 (0.38) nm.

IR (MeOH)  $\nu_{\max}$  3342 (O-H), 2957; 2926 (R-COOH), 1730 (C=O ester) 1601 (C=O ester  $\alpha,\beta$ -insaturé), 1457 (C-C ar) 1377 (O-H ar), 1271 (C-OH ar), 1182 (C-O ester) et 1124, 1072 (C-OH)  $\text{cm}^{-1}$

(ArOH); ESI-MS  $m/z$  353 ([M-H]<sup>-</sup>); ESI-MS/MS  $m/z$  191; HRESIFT-MS  $m/z$  353.0882 [M-H]<sup>-</sup> (calculé pour C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>, 353.0873).

### **Composé 2**

Temps de rétention: 22min

$[\alpha]_D^{25} -70.6^\circ$  (*c* 0,26cg/mL, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 203 (0.80), 279 (0.30), 309 (0.26) nm.

IR (neat)  $\nu_{\max}$  3327  $\text{cm}^{-1}$ (O-H), 1786  $\text{cm}^{-1}$  (acide carboxylique), 1632  $\text{cm}^{-1}$  (C=O acide  $\alpha,\beta$ -insaturé), 1160  $\text{cm}^{-1}$  (éther), 1006  $\text{cm}^{-1}$  (éther pyranique) et 1074  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>-OH).

ESI-MS  $m/z$  355 ([M-H]<sup>-</sup>); ESI-MS/MS  $m/z$  193 et 149; HRESIFT-MS  $m/z$  355.1020 [M-H]<sup>-</sup> (calculé pour C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>, 355.1029).

Le précipité extrait (P) (6,64 g) a été chromatographié sur gel de silice Flash (130g) dans 400mL de DCM. L'extrait est absorbé sur 14g de gel de silice (0,04-0,20mm) et élué avec 250mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH: acide formique (0,2 ml/250 ml de chaque mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH) de polarité croissante. 13 fractions de 125 mL ont été collectées de masse de 3,658g, suivies par CCM et HPLC. Les fractions de même constitution regroupées et évaporées ont donné cinq fractions majeures (tableau 29).

**Tableau 29.** Fractionnement de l'extrait P

<b>Extrait P</b>			
<b>Regroupement</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH: acide formique</b>	<b>Fractions</b>	<b>Masse (mg)</b>
P1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2-4	85
P2	90 :10 :0,2	5+6	757
P3	80 :20 :0,2	7	391
P4	70 :30 :0,2	8+9	1256
P5	60 :40 :0,2/50 :50 :0,2/50 :50 :0,2	10-13	1179

Fractions d'éluion : DCM :EtOH : Ac formique (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 50 :50)

La fraction P4 (1,256g) a été fractionnée sur 50g de gel de silice Flash humecté dans 300mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH: acide formique (70 :30 :0,2). La fraction est absorbé sur 3,5g de gel de silice et élué avec 200mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH: acide formique (0,2 ml/200 ml de chaque mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH) de polarité croissante. 30 fractions de 50 ml ont été collectés avec une masse totale de 1,244g, les fractions sont évaporées à sec est analysées par CCM et par

HPLC. Les fractions de mêmes compositions sont regroupées et évaporées pour donner cinq fractions majoritaires de masse totale de 1,218 g (tableau30).

Une fois les regroupements réunis, ils sont analysés par CCM et par HPLC à des concentrations de 10mg/mL dans du méthanol et 10µl sont injectés en utilisant un mélange H<sub>2</sub>O avec 0,2% de CH<sub>3</sub>COOH (solution A) et MeOH avec 0,2% de CH<sub>3</sub>COOH (solution B) à un débit de 0,7mL/min par la méthode d'éluion indiquée dans (III.1.2c).

**Tableau 30.** Fractionnement de la fraction P4

<b>Fraction P4</b>		
<b>Regroupement</b>	<b>Fractions</b>	<b>Masse (mg)</b>
P4a	1-7	133
P4b	8+9	279
P4c	10-15	594
P4d	16-19	156
P4e	20-23	56

Fractions d'éluion : DCM :EtOH : Ac formique (90:10 ; 87,5:12,5 ; 85:15 ; 82,5:17,5 ; 80:20 ; 77,5 :22,5 ; 75 :25 ; 72,5 : 27,5)

La fraction P4b (279 mg) a par chromatographie préparative RP-HPLC avec un gradient linéaire de 40 à 70% de solvant A en 20 min conduit au composés purs **3** (70 mg) et **5** (34 mg).

### **Composé 5**

Temps de rétention: 31min

$[\alpha]_D^{25}$  -285.1° (c 1,15cg/mL, MeOH) ; UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 216 (0.84), 329 (0.84) nm.

IR (MeOH)  $\nu_{max}$  3369 (O-H), 2959 (R-COOH), 1691 (C=O ester), 1629, 1601 (C=O ester  $\alpha,\beta$ -insaturé), 1445 (C-C ar) 1365 (O-H ar), 1274 (C-OH ar), 1179, 1160 (C-O ester) et 1115 (C-OH)  $cm^{-1}$

ESI-MS  $m/z$  677 ( $[M-H]^-$ ); ESI-MS/MS  $m/z$  515, 353, 265 et 160; HRESIFT-MS  $m/z$  677.1507  $[M-H]^-$  (calculé pour C<sub>34</sub>H<sub>29</sub>O<sub>15</sub>, 677.15065).

### **c. Evaluation de l'activité antioxydante des composés isolés et identifiés dans l'*A.herba-alba* par DPPH**

L'évaluation de l'activité antioxydante des composés purs isolés a été mesurée comme la capacité de capture du radical DPPH des solutions méthanoliques des composés (III.1.4.b). Pour chaque composé nous avons préparé six concentrations différentes. Les concentrations utilisées ont été préparées dans la fourchette de 3-30mg/mL excepté le composé **2** dont les concentrations sont dans l'intervalle 15-500 mg/mL.

## **III.2. Techniques générales et instrumentation**

### **III.2.1. Réactifs et solvants**

Les réactifs utilisés sont: le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, DPPH (95%, Sigma Aldrich), le 2,6-di-tert-butyl-4-méthyl phénol, le BHT (99%, Aldrich), le dichlorométhane (99%, Panreac), le chlorure de sodium, NaCl (99%, Panreac),

Les solvants utilisés dans la partie expérimentale de ce travail sont purifiés, avant de les utiliser, suivant les procédures décrites par Armarego et Chai, 2003<sup>183</sup>. Le méthanol utilisé pour la chromatographie liquide à haute résolution et pour les tests de l'activité antioxydante est de qualité HPLC.

**L'acétate d'éthyle** : Séché sur  $K_2CO_3$  (10% p/v) pendant la nuit, distillé et stocké sur tamis moléculaire (environ 4 Å).

**Le dichlorométhane** : Séché sur  $CaCl_2$  (5% p/v) pendant la nuit et distillé et stocké sur  $CaCl_2$  anhydre.

**L'éthanol** : Tout d'abord, on prépare l'éthanolate de magnésium à partir de l'éthanol absolu (75 mL), du magnésium (5g) et de l'iode (0,5g). Par la suite on ajoute de l'éthanol à sécher (1L), on maintient à reflux pendant 2-3 h et on distille, puis stocké sur tamis moléculaire (4 Å).

**Le méthanol** : même procédure décrite que pour l'éthanol.

### **III.2.2. Techniques chromatographique**

#### **a. Chromatographie sur colonne (CC)**

Nous avons utilisé du gel de silice Flash (Merck) 60 avec la taille des particules 0.04-0.06 mm, en utilisant 40-100 g de silice par gramme d'échantillon à chromatographier. La colonne est remplie avec une solution composée de gel de silice et l'hydratant indiqué dans chaque cas.

L'échantillon introduit est adsorbé sur gel de silice 60 de taille de particule 0,04-0,20mm, en utilisant le double de celui-ci en quantité. Le gradient d'élution a été effectué en polarité croissante, suivi de la séparation par chromatographie sur CCM et la pesé des fractions.

#### **b. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Nous avons utilisé essentiellement des plaques de silica gel 60 F254 0,25 mm d'épaisseur prête à l'emploi à support en aluminium Merck. Comme éluant nous avons normalement utilisé des systèmes de solvant les plus couramment employés  $CH_2Cl_2/EtOH$

dans des proportions variables adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse. La révélation des taches est réalisée en visualisant les taches sous la lumière ultraviolette à 254 et 366 nm, et en imprégnant avec une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique à 7% la plaque permettant ainsi une meilleure visibilité des molécules, suivie du réchauffement

### c. Chromatographie liquide (HPLC)

L'analyse et la séparation par HPLC ont été réalisées sur un chromatographe 2996 Area Water photodiode équipé d'un module de contrôle Delta 600, d'un injecteur automatique SIL-10AP et manuel Reodyne 7725, de deux pompes binaires LC-10ADvp, un système de dégazage à l'hélium (30mL/min), d'un détecteur à barrettes de photodiodes SPD-M10Ap (DAD) et d'un collecteur d'échantillon FRC-10A. Le tout est piloté via le logiciel LC solutions. Le système a été équipé d'une colonne analytique à phase inverse Spherisorb S5 ODS2 (3,0 × 250 mm, 5 µm) et d'une colonne préparative Spherisorb S5 ODS2 (10 × 250 mm, 5 µm) à des débits de 0,7mL / min et 5 mL / min, respectivement.

Les deux solvants d'analyse sont une solution A d'acide acétique (AcOH) à 0,2% dans le MeOH (99,8:0,2 : v / v) d'une part et une solution B d'AcOH dans H<sub>2</sub>O ( 99,8:0,2 : v / v) d'une autre part à une température de 30°C. Le gradient utilisé dans la HPLC analytique est détaillé dans le tableau ci-dessous.

Les solutions méthanolique des extraits et des fractions ont été préparées à une concentration de 10mg/mL et le volume d'injection était de 10µL.

**Tableau 31.** Gradient utilisé pour l'analyse par CLHP

Temps	Gradient	
	Phase A(%)	Phase B(%)
0	10	90
35	70	30
40	100	0
45	100	0
50	10	90
60	10	90

(A) MeOH:CH<sub>3</sub>COOH; 99.8:0.2 (v/v) et (B) H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH; 99.8:0.2 (v/v).

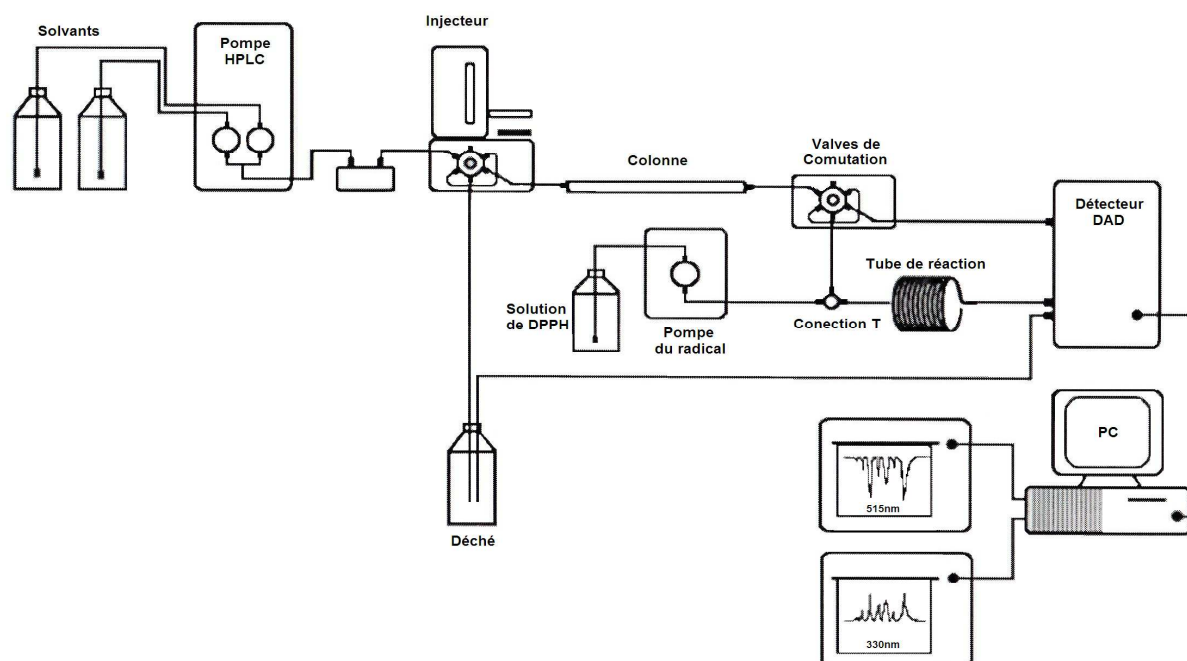
La chromatographie préparative RP-HPLC a été réalisée avec un gradient linéaire indiqué dans chaque cas.

### e. Chromatographie liquide : On-line HPLC-DAD-DPPH

L'appareil de HPLC décrit ci-dessus est combiné avec un système de réaction postérieur à la colonne (post-colonne) (figure 44)

A la sortie de la colonne (débit 0.7 mL/min) existe une valve de commutation de 6 ports *Waters Switching Valve* qui permet de diriger l'éluant directement au détecteur DAD, dans une première injection de l'échantillon, ou de le diriger vers le tube de réaction, de 3 m de longueur et 0.5 mm de diamètre interne, dans une seconde injection, où les éluants se mélangent avec une solution du radical DPPH ( $7.09 \times 10^{-5}M$ ) dans le méthanol avec un débit de 0.7 mL/min par une pompe *Waters Reagent Manager*. A la sortie du tube de réaction, le détecteur DAD mesure la diminution dans l'absorbance pour le radical libre DPPH à 515 nm. Les extraits et les fractions isolées à séparer sont préparés dans des solutions méthanoliques à une concentration de 10mg/mL et injectés à une quantité de 10 $\mu$ L en utilisant un gradient linéaire de 10 à 70% de solvant A en 35 min, maintenu en isocratique à 100% de solvant A pendant 5 minutes. Le gradient linéaire de 100 à 10% de solvant A en 5min et maintenu pendant 10 minutes en isocratique à 10% de solvant A a servi pour le rééquilibrage de la colonne.

Les deux phases sont : (A) MeOH:AcOH; 99.8:0.2 (v/v) et (B) H<sub>2</sub>O:AcOH; 99.8:0.2 (v/v).



**Figure 44.** Schéma de l'équipement de HPLC-DAD-DPPH pour la détection de composés avec une activité antioxydante

### III.2.3. Techniques analytiques et spectroscopiques

#### a. Pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D$ ) :

Il est déterminé à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241, en utilisant une cellule de 10 cm de longueur (2mL) et en utilisant du méthanol ou du chloroforme comme solvant. La concentration est exprimée en cg/mL.

$$\alpha_D^{25} = \frac{\alpha}{c \times l} \times 100$$

Où  $\alpha_D$  : le pouvoir rotatoire spécifique

$\alpha$  : la moyenne des trois mesures de la rotation optique

$c$  : la concentration de l'échantillon en cg / ml

$l$  : longueur de la cellule en décimètre

#### b. Spectroscopie UV/VIS

Les spectres UV sont obtenus dans du méthanol sur un spectrophotomètre Varian Cary 4000 UV/VI en utilisant une cuve 1 cm de faisceau optique.

L'absorbance ou la densité optique se définit comme:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon cl$$

Où  $I_0$  : l'intensité de la lumière incidente

$I$  : l'intensité de la lumière transmise

$\epsilon$  : le coefficient d'extinction

$l$  : faisceau optique de la cuve en cm

$c$  : la concentration en mole/L.

Les solutions de composés isolés sont préparées dans du méthanol à des concentrations de 40 ppm et diluées en cas de nécessité.

#### c. Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres IR ont été réalisés sur un spectromètre infrarouge FTIR Bruker TENSOR 27 ATR System, en pellicule liquide. La position des bandes est indiquée en nombre d'ondes ( $\text{cm}^{-1}$ ), signalant uniquement les plus significatives.

#### **d. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres de RMN-<sup>1</sup>H (400Hz), RMN-<sup>13</sup>C (100Hz) et RMN-2D (400Hz) ont été réalisés sur un spectromètre Bruker Avance en utilisant comme solvant le CD<sub>3</sub>OD et le tétraméthylsilane (TMS, 0.00 ppm) comme référence interne en RMN-<sup>1</sup>H, l'échelle en RMN-<sup>13</sup>C est ajustée au pic central septuplé du CD<sub>3</sub>OD (49.00 ppm). Le degré de substitution des carbones s'établi avec l'aide de la séquence DEPT Multi pulse-135. Les déplacements chimique ( $\delta$ ) sont donnés en parties par million (ppm) et les constantes d'accouplement (J) en hertz (Hz). La multiplicité des signaux s'exprime avec les abréviations habituelles.

L'échantillon a été préparé pour des petits volumes (50  $\mu$ L) en le solubilisant dans un tube conventionnel de RMN.

#### **e. Spectrométrie de masse (MS)**

Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre Esquire 6000 Bruker Daltonics qui dispose de deux fentes d'ionisation à pression atmosphérique : electrospray (ESI) et ionisation chimique (APCI) et avec une trompe d'ions comme analyseur. La fente d'ionisation ESI a été utilisée en mode négatif [M-H]<sup>-</sup> à EI (70eV).

Cette technique est particulièrement utile pour les molécules de masse moléculaire élevée, notamment les polyphénols. Cet appareil permet en outre d'utiliser le mode SM-SM (ou SM<sup>2</sup>), qui consiste en la défragmentation de fragments sélectionnés, pour une analyse plus fine.

#### **f. Spectrométrie de masse TOF-HPLC**

Les spectres ont été réalisés sur un équipement composé d'un chromatographe en phase liquide, à haute résolution, Waters Alliance 2795 couplé à un spectromètre de masse avec un analyseur à temps de vol d'accélération orthogonale de haute résolution, Micromass LCT Premier de waters avec trois fentes d'ionisation à pression atmosphérique : electrospray (ESI), ionisation chimique (APCI) et photoionisation et avec une trompe d'ions comme analyseur. La source d'ionisation est double pour les mesures de masse exacte. La source d'ionisation ESI a été utilisée en mode négatif. Un logiciel qui permet le contrôle et l'acquisition de données HPLC et HPLC/MS, ainsi que le traitement des résultats.

Cette technique est utilisée pour la détermination de la masse moléculaire exacte, donc la formule moléculaire, l'identification de la structure moléculaire, l'analyse qualitative et

quantitative des mélanges complexes grâce à la séparation chromatographique et les spectres de masses individuels engendrés.

Les échantillons ont été analysés en mode ionisation ESI à des concentrations de 1ppm dans du méthanol et avec un débit de 10 $\mu$ L/min. La quantité injectée est de 10 $\mu$ L.

### **III.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante**

#### **a. Evaluation de l'activité antioxydante par la capacité de capturer des radicaux libres:**

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits, des fractions chromatographiées, des produits isolés et des références est mesurée par la capacité à capturer le radical DPPH, en utilisant la méthode légèrement modifiée décrite.<sup>163, 164</sup>

#### **b. Evaluation quantitative**

Une solution méthanolique (2,4 ml) du radical DPPH ( $7,09 \times 10^{-5}$  M) est mélangée directement dans une cuve UV en plastique avec une solution méthanolique (1,2 mL) de l'échantillon à évaluer, préparée en trois essais, agitée et maintenue à température ambiante et dans l'obscurité avant de prendre la mesure de l'absorbance dans un spectrophotomètre à 515 nm. Les mesures sont prises après 15 minutes. La solution méthanolique du radical DPPH a été préparée en dissolvant 2,9 mg de DPPH dans 100 mL de MeOH et dilué avec du MeOH jusqu'à ajuster la valeur de l'absorbance à  $0,800 \pm 0,030$  (515 nm). La concentration exacte de la solution est calculée par interpolation de la valeur de l'absorbance dans la courbe d'étalonnage du radical DPPH ( $y = 0.1121x + 0.0055$ ,  $R^2 = 0,999$ ). Le blanc a été préparé à partir de 2,4 ml de la solution méthanolique du radical DPPH et 1,2 mL de MeOH.

## **VI. Conclusion.**

Les acides chlorogéniques sont des acides produits par les plantes. Chez certaines d'entre elles ils sont le précurseur de l'acide dicafféoylquinique, un composé polyphénolique qui est un antioxydant réputé avoir des propriétés intéressantes pour le foie et la vésicule biliaire. Le terme acides chlorogéniques désigne aussi une famille des acides de structure chimique similaire à l'acide chlorogénique avec des propriétés bactéricides, fongicides et antivirales.

Les résultats de cette étude montrent que les parties aériennes de l'*A.herba-alba* contiennent des dérivés de l'acide caféoylquinique biologiquement actifs (propriétés

antioxydantes et antimutagènes), ce qui pourrait être préventif contre certaines maladies comme le cancer et les maladies cardio-vasculaires.

Nous avons isolé 4 dérivés de l'acide caféique: l'acide 3-mono-*O*-cafféylquinique (acide chlorogénique; CHA); l'acide 3, 4-di-*O*-cafféylquinique (3, 4-diCQA), acide 3, 5-di-*O*-cafféylquinique (3, 5-diCQA) et l'acide 3,4, 5-tri-*O*-cafféylquinique (3, 4, 5-triCQA).<sup>200</sup>

Le 3-*O*-acide cafféoylquinique, l'3,4-di-*O*-acide cafféoylquinique et le 3, 5-di-*O*-acide cafféoylquinique sont les inhibiteurs les plus efficaces pour des tumeurs de la peau.<sup>201</sup> Le 3, 4, 5-triCQA montre une inhibition sélective de la réplication du VIH alors que l'acide 4, 5-di-*O*-cafféoylquinique avait seulement une légère activité anti VIH.<sup>202</sup>

Ces polyphénols ont montré différents types de fonctions physiologiques, une activité antiradicalaire, une activité antimutagène, anticancéreuse, antidiabétique, et antibactérienne in vitro ou in vivo, qui peuvent être utiles pour le maintien de la santé. La fonction physiologique de l'acide cafféoylquinique est plus efficace avec des polycafféoyl qu'avec un monocafféoyl.<sup>203</sup>

# *Conclusion Générale*

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail est d'abord une contribution à l'étude analytique des essences d'*Artemisia herba-alba* poussant en Algérie obtenues par hydrodistillation et micro-onde. Le choix des échantillons étudiés a mis en évidence une différence remarquable dans la composition chimique et les rendements d'extraction selon les régions et les techniques d'extraction utilisées. L'extraction par micro-ondes a donné des rendements relativement faibles comparés à l'hydrodistillation: [0,15-0,55%] pour la micro-onde contre [0,31-1,00%] pour l'hydrodistillation.

Les indices physiques des huiles essentielles des plantes provenant des onze régions montrent quelque similitude. Leurs densités varient entre 0,918 et 0,949 et sont comprises dans la norme Afnor ainsi que dans celles rapportées par la littérature. Les indices de réfraction sont pratiquement identiques aux valeurs trouvées pour les huiles essentielles d'*A.herba-alba* d'Algérie rapportées par la bibliographie et aux valeurs Afnor. Le pouvoir rotatoire des 7 échantillons des 11 régions sont lévogyres et les 5 autres huiles essentielles sont dextrogyres.

L'analyse des essences par GC et par GC/MS, a montré des différences importantes dans leur composition du point de vue qualitatif et quantitatif. Les composés cétoniques tels que : l' $\alpha$ -thujone, la  $\beta$ -thujone, le camphre, la chrysanthénone et la davanone en constituent la majeure partie.

La combinaison de la GC et de la GC/MS, nous a permis d'identifier 164 constituants, représentant entre 65,2 et 98,3% de la composition totale pour les essences extraites par hydrodistillation et entre 61,4 et 95,6% pour celles obtenues par micro-onde. La composition en pourcentage des principales classes de familles de ces huiles révèle qu'elles sont riches en cétones : leurs proportions varient entre (37.8 et 84.5%) et sont relativement identiques pour les échantillons obtenus par hydrodistillation ou par micro ondes.

Cette étude nous a permis ainsi, de confirmer les hypothèses annoncées par des travaux antérieurs,<sup>11,13</sup> notamment sur la diversité des chémotypes dont l'existence serait étroitement liée à des variations de patrimoines génétiques.

L'étude de l'activité anti microbienne des huiles essentielles a été testée sur 14 souches : 4 bactéries à Gram +, 3 à Gram -, 5 champignons et 2 levures. .

La détermination de la CMI (ne dépassant pas 10mg/mL) des différentes essences montre un très bon pouvoir inhibiteur contre toutes les souches bactériennes. Parmi tous les échantillons testés, l'huile essentielle de Medjedel (M) est la plus active sur toutes les bactéries et les levures comparées aux autres essences, excepté le *Fusarium oxysporum* lini qui lui est mieux inhibé par l'essence de Ghardaia (CMI<0,5mg/mL) contre 1mg/mL pour Medjedel.

Par contre, l'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* vis-à-vis du radical DPPH est très faible comparée à celle du BHT.

Cette même étude a révélé que les extraits d'acétate d'éthyle présentent un pouvoir antioxydant très important. Le repérage des composés actifs dans les extraits par la méthode on-line HPLC-DAD-DPPH nous a permis de procéder à l'isolement et à l'identification de 5 composés des extraits d'acétate d'éthyle de l'*Artemisia herba-alba* de la région de M'sila.

Cinq de ces composés présentent tous des structures apparentées à celles déjà isolées dans d'autres espèces et un d'entre eux dans l'espèce *Artemisia herba-alba*.

L'isolement des antioxydants a été réalisé par chromatographie sur colonne de gel de silice et par HPLC semi-préparative en phase inverse et les structures de ces composés ont été déterminées par RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, RMN 2D, UV, IR, HRESI-SM. Les données spectrales des composés (1), (3), (4) et (5) sont en accord avec les données publiées: du 3-*O*-caféylquinique acide (1), du 3, 5-di-*O*-caféylquinique acides (3), du 3, 4-di-*O*-caféylquinique acides (4) et du 3, 4, 5-tri-*O*-cafféolquinic acides (5).

Le composé (1) a déjà été isolé dans l'*A.herba-alba* alors que (3) et (4) l'ont déjà été à partir d'autres espèces d'*Artemisia* mais les composés (2) et (5) sont de nouveaux produits dans l'espèce *Artemisia*.

La détermination de l'activité anti radicalaire des composés purs sur le DPPH révèle une faible activité anti radicalaire exercée par la molécule (2) sur la DPPH, Ceci n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où la structure chimique de la molécule ne comporte aucun groupement typiquement antioxydant. Les dérivés cafféoylquiniques testés on, eux, montré une bonne activité inhibitrice en rapport avec le nombre de groupements cafféoylquiniques.

Enfin, ce travail s'est voulu un complément et un approfondissement de ce qui a été reporté auparavant sur l'*Artémisia herba-alba* d'Algérie.

### **Perspectives**

- Elargir l'étude des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* à d'autres régions d'Algérie.
- Suivre la variation de la composition des huiles essentielles en fonction des périodes d'extraction : étude antibactérienne, antifongique et antioxydantes.
- Faire appel à la chimiométrie pour des meilleures études.
- Approfondir l'étude des produits lourds extraits par solvants.

# *Bibliographie*

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Bahorun T. Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentiel. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Reduit. Mauritius **1997**.
2. Valnet J. Aromathérapie traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. France. **1984**, 10, 23 – 178.
3. Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A et Cannatelli M.A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lettres en microbiologie appliquée. **2002**, 30(5), 379.
4. Paris M., Hurabielle M. Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie. Masson. **1981**
5. Trabut L. Précis de botanique médicale. Masson & cie. Paris. **1988**.
6. Pourra Y., Hubac C. Comparison of drought-resistant mechanisms in two desert plants, *A. herba alba* Asso and *Carex pachystylis*. Lab. Phytotron, CNRS. France. Physiologie Végétale. **1974**, 12(2), 135-47.
7. Djebaïli S. Steppe Algérienne. Phytosociologie et Ecologie OPU. Alger. **1984**, 1-138.
8. Benmansour A.; Taleb Bendiab S. A. Comparative investigation of proteins and amino acids in *A. herba-alba* residues and Algerian date stones. Proposal to use them as additional feed for livestock. J. Soc. Alg. Chim. **1998**, 8(1), 67-71
9. Fenardji F., Klur M., Furlon C et Ferrando R. Contribution à l'étude de l'Armoise Blanche (*A. herba-alba*). Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop. **1974**, 27(2), 203-206.
10. Aidoud A. Contribution à l'étude des écosystèmes steppiques du sud Oranais. Thèse de Doctorat de 3ème cycle. Institut de Biologie. USTHB. Alger, **1983**, 116-200.
11. Benjlali B., Richard H. Etude de quelques peuplement d'armoïse blanche du Maroc (*A. herba-alba*). Riv. Ital. EPPOS. **1980**, 62(2), 69-74.
12. Benjlali B., Richard H., Liddle P. Lavande. Lavandin. Plante à parfum. Aromatique et médicinales. Congrès International de la Soc. Ital. Phyto. **1984**, 131- 151
13. Lemberg S. *Artemisia herba alba*. Perfumer and flavorist. **1982**, 7, 58 - 63.
14. Beylier-Manuel M.F. Activités bactériostatiques des matières premières de parfumerie. Riv. Ital. EPPOS. **1976**, 58, 283-286.
15. Yasphe J., Segal R., Breuer A., Ardreich N G. Antibacterial activity of *A. herba-alba*. J. Pharm. Sci. **1979**, 68(7), 924-925.
16. Khafagy S.M., Gharbo S.A., Sarg T.M. Phytochemical investigation of *A. herba-alba*. Planta med. **1971**, 20(1), 90-96.

17. Idris U.E., Adam S.E., Tartour G. The anthelmintic efficacy of *A. herba-alba* against haemonchus contortus infection in goats. National Institute of Animal Health quarterly. **1982**, 22(3), 138-143.
18. Baba Aïssa F. Les plantes médicinales d'Algérie. Bouchène & Ad Diwan. Alger. **1991**, 56-70.
19. Afnor. Huiles essentielles, échantillonnage et méthode d'analyse, Tome 1. **2000**.
20. Naves Y.R. Technologie et chimie des parfums naturels, essences concrètes, résinoïdes huiles et pommades aux fleurs, Masson & Cie, Paris. **1974**.
21. Grandery L., 1974. Dictionnaire de chimie. Ed Dunod. Paris, p 81.
22. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Lavoisier. Inois, USA. **1993**.
23. Benjlali B., Richard H., Bartaux O. Study of essentials oils of two species of Moroccan oregano *Origanum compactum* and *Origanum elongatum*. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. **1986**, 19 (1), 22-26.
24. Werker E., Putievsky E., Ravid U. The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. Journal Annals of Botany. **1985**, 55, 793-801.
25. Perrin A., Colson M. L'appareil sécréteur chez les menthes : modalités de stockage des essences dans les glandes à tête pluricellulaire: Les menthes en France ; aspects scientifiques, économiques et industriels. Univ. Claude Bernard. Lyon. **1985**, 200 – 205.
26. Bendjlali B., Sarris J., Richard H. New chemotypes of *A. herba-alba*. Science des aliments. 1982, 2, 515 - 527.
27. Segal R., Feuersteine I., Danin A. Chemotypes of *A. herba-alba* in Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution. Biochemical Systematic and Ecology. **1987**, 15(4), 411- 416.
28. Lockwood G.B. Technique for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. J.chromatogr. A. **2001**, 936, 23-31.
29. Benkaci A., Baaliouamer A., Meklati B.Y. Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* L. Seeds. Chromatographia. **2006**, 64(3-4), 227-231.
30. Lagunez Rivera L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique. Toulouse. **2006**.
31. Jin-yu H., Wei H., Shun-de H., Bo-yong X., Xiu D. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *A. annua* L, Separation and Purification Technology. **2002**, 28(3), 191-196.
32. Paré J.R.J., Belanger J.M.R., Stafford S.S. Microwave assisted process (MAP): A new tool for the analytical laboratory. Trends in Analytical Chemistry. **1994**, 13, 176-184.

33. Peyron L. Techniques classique actuelles de fabrication des matières naturelles aromatiques, Techniques et Documentation. Lavoisier. Paris. **1982**, 220-231.
34. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., M. Lacroix. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control. **2007**, 18(5), 414-420.
35. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. **1997**, 82 (2) 291–295.
36. Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., McAnalley B. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. Glyco Science & Nutrition. **2003**, 4(6), 7
37. Morel Y., Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem. J. **1999**, 342 (3), 481-496.
38. Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et experimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. **2003**, 108-115.
39. Vansant G. Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « antioxydant et alimentation ». Institut Danone. **2004**.
40. Cohen M., Stress oxydant, glycation protéique, vieillissement et maladies liées à l'âge. Phytothérapie Européenne. **2002**, 6, 18-26.
41. Novelli G.P. Role of free radicals in septic shock. J. Physiol Pharmacol. **1997**, 48, 517527.
42. Hadi M. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et application thérapeutique. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur. **2004**, 155
43. Hosein S.R., Lytle M. Les antioxydants. Traducteur : Alain Boutilier. Catie feuillet d'information. **2001**, 5.
44. Byers T and Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. Annu. Rev. Nutr. **1992**, 12, 139-159.
45. Jacob R. A and Burri B. Oxidative damage and defense. J. Am. J. Clin. Nutr. **1996**, 63, 985S-990S.
46. Krippeite-Drews P., Lang F., Haussinger D., Drews G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. Pflugers Arch. **1994**, 426, 552-554.
47. Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaisseaux, cœur, poumon. **1999**, 4(5).
48. Vinson J.A. Oxidative stress in cataracts. Pathophysiology. **2006**, 13, 151-162.
49. Inoue K., Garner C., Ackermann B.L., Oe., Blair I.A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry characterization of oxidized amyloid beta peptides as potential biomarkers of Alzheimer's disease. Rapid. Commun. Mass Spectrom. **2006**, 20, 911-918.

50. Ahmad M., Yousuf S., Khan M.B., Hoda M.N., Ahmad A.S., Ansari M.A., Ishrat T., Agrawal A.K., Islam F. Attenuation by *Nardostachys jotamansi* of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats : behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, 83, 150-160.
51. Astawodi S.E. Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* **2005**, 4(2), 128-133.
52. Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini A., Fonseca M. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm.Sci.* **2003**, 5(2), 5.
53. Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *MS.* **1998**, 73
54. Mohammedi Z., Atik Bekkara F. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magister. Université Tlemcen. **2006**.
55. Maydani M. Effect of functional ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71, 1665S-1668S.
56. Maydani M. Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients. *Nutr. Rev.* **2000**, 58, 278-281.
57. Sies H., Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 62, 1315S-1321S.
58. Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, 17, 235-248.
59. Takahashi O., Sakamoto Y., Hiraga K. Lung hemorrhagic toxicity of butylated hydroxyanisole in the rat. *Toxicol. Lett.* **1985**, 27: 15-25.
60. Kehrer, J.P., Digiovani, J. Comparison of lung injury induced in 4 strains of mice by butylated hydroxytoluene. *Toxicol. Lett.* **1990**, 52: 55-61.
61. Grimal E. Essential oil of *A.herba alba* of Algeria. *J. Chem. Soc.* **1904**, 86, I, 605.
62. Schemmel A. Chieh Oil. *Semi-An. Rep.* **1909**, 98.
63. Bermudez R., Suarez Y. Chemical analyses of forage plants of Spain. *Separate. Madrid. Langa y Compania.* **1912**, 94.
64. Roure-Bertrand F. Essential oils. *Sci. ind. bull.* **1920**.
65. Alinari E. Ethereal oil from *A. herba alba*. *Riv. It. delle essenze e profumi.* **1922**, 4, 75-77.
66. Alinari E. The probable presence of thujone in the essential oil of *A.herba-alba* *Asso. Annali di Chimica Applicata.* **1924**, 14, 109-12.
67. Maugini A. Some plants of Cyrenaica. *Agr. Coloniale.* **1930**, 24, 74-77,127-131,189-191.

68. Callegari L., Rossi A. The active principles of Lybian *A.herba-alba* and their pharmacological action. Arch. Ital. Sci. Farmacol. **1939**, 8, 145-160.
69. Fesneau M. Spanish essential oils. Industries de la Parfumerie. **1950**, 5, 132-133.
70. Cohen A., Lavergne J. P., Leblanc A., Viallefont Ph. Constituents of *A. Herba-Alba* (typica). I. Essential oils. Bull. Soc. Sci. Natur. Phys. Maroc. **1972**, 52(1-2), 1-19.
71. Sanchez I.; Gomis J. Organic principles in east Spanish plants. Separation and identification of the components of an *A. herba-alba* Valentina wax by gas-liquid chromatography. Grasas y Aceites (Sevilla, Spain). **1978**, 29(5), 323-327.
72. Segal R., Breuer A., Feuerstein I. Irregular monoterpene alcohols from *A. herba-alba*. Phytochem. **1980**, 19(12), 2761-2762.
73. Hurabielle M., Malsot M., Paris, M. Chemical study of two oils from wormwood: *A. herba-alba* Asso and *A. vulgaris* L of chemicotaxonomic interest. Riv. Ital EPPOS **1981**, 63(6), 296-299.
74. Villar A., Caldach M. L., Zafra-Polo M. C. Essential oils from different *Artemisia* species. Ars Pharmaceutica. **1983**, 24(2), 149-159.
75. Feuerstein I., Müller D., Hobert K., Danin A., Segal R. The constitution of essential oils from *A. herba-alba* populations of Israel and Sinai. Phytochem. **1986**, 25, 2343 - 2347.
76. Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïli-Alaoui M., Ayadi A. Plantes Médicinales et Phytothérapie. **1986**, 20(2),155-167.
77. Segal R., Feuersteine I., Danin A. Chemotypes of *A. herba-alba* in Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution. Biochemical Systematic and Ecology. **1987**, 15(4), 411 - 416.
78. Yashphe J., Feuerstein I., Barel S., Segal R. The antibacterial and antispasmodic activity of *A. herba-alba* Asso. Examination of essential oils from various chemotypes. Int. J. Crude Drug. Res. **1987**, 25(2), 89-96.
79. Feuerstein I., Danin A, Segal R. Constitution of the essential oil from an *A.herba-alba* population of Spain. Phytochem. **1988**, 27, 433 - 434.
80. Mahmoud S A S., Hazem A., EL-Sebaie M A F., El-Borollosy M A., EL-Dady A H. Egyptian Journal of Microbiology. **1988**, 22 (1), 55-77.
81. El-Sayed, A. M., Seida A. A. Comparative study of the major constituents of the essential oils of wild and cultivated Egyptian *A. herba-alba* with those of plants produced abroad. Bulletin of the Faculty of Pharmacy. **1990**, 28(1), 57-58.
82. Ouyahya A., Negre R., Viano J., Lozano Y. F., Gaydou E. M. Essential oils from Moroccan *A. negrei*, *A. mesatlantica* and *A. herba- alba*. Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie. **1990**, 23(6), 528-530.

83. Boutekedjiret C., Charchari S., Belabbes R., Bessiere J. M. Chemical composition of the essential oil of *A. herba-alba*. Riv. Ital EPPOS. **1992**, 3(8), 39-42
84. Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H., Errifi A., Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. J.Essent. Oil Res. **1993**, 5, 535-545.
85. Lima E O., Gompertz O F., Paulo M Q., Giesbrecht A M. Rev Microbial. São Paulo. **1992**, 23, 235-238.
86. Lima E O., Gompertz O F., Giesbrecht A M., Paulo M Q. Mycoses. **1993**, 36, 333-336.
87. Lima E O., Morais V M F., Gomes S T A., Filho V C., Miguel O., Yunes R A. Acta Farm Bonacres. **1995**, 14(3), 1-4.
88. Bourrel C., Vilarem G., Michel G., Caset A. Riv. Ital. EPPOS. **1995**, Sedicesimo, 3- 11
89. Charchari S. Contribution à la connaissance d'huile essentielle de deux espèces d'*Artémisia* : *A.herba-alba*. Asso et *A.judaïca*. L. Aspects technologiques de l'extraction de cette huile et de leur concrète. Thèse d'Etat en Génie Chimique. ENP. Alger. **1994**.
90. Vernin G and Merad L.O. Mass spectra and Kovats indices of some new cis-chrysanthenyl esters found in the essential oil of *A.herba-alba* from Algeria. J.Essent. Oil Res. **1994**, 6, 437-448 .
91. Vernin G., Merad LO., Vernin G.M.F., Zamkotsian R.M and Parkanyi G. GC/MS analysis of *A.herba-alba* Asso essential oils from Algeria. Dev. Food Sci. **1995**, 37A, 147-205.
92. Marrif H., Ali B.H., Hassan K.M. Some pharmacological studies on *A.herba-alba* Asso in rabbits and mice. J. Ethanopharmacology. **1995**, 49, 51-55.
93. Charchari S., Dahoun A., Bachi F., Benslimani A. Antimicrobial activity in vitro of essential oils of *A. herba-alba* Asso. and *A. judaïca* L. from Algeria. Riv. Ital EPPOS. **1996**, 18, 3-6.
94. Sallal A.K.J.; Alkofahi A. Inhibition of the hemolytic activities of snake and scorpion venoms in vitro with plant extracts. Biomedical Letters. **1996**, 53(212), 211-215.
95. Vernin Gaston., Merad O., Zamkotsian R.M., Vernin G.M.F., Parkanyi C. GC/MS analysis of the nonpolar and polar extracts of *A. herba-alba* Asso plants from Algeria. Comparison with the chemical composition of the essential oil. Riv. Ital. EPPOS. **2001**, 32, 3-16.
96. Salido S., Altarejos, J., Nogueras M., Sánchez A. Chemical composition of essential oil of *A.herba-alba* Asso. ssp. valentina (Lam) Marc. J.Essent. Oil Res. **2001**,13, 221-224.
97. Hifnawy M.S., Rashwan O.A., Rabeih M.A. Comparative chemical and biological investigations of certain essential oils belonging to families Asteraceae, Lamiaceae and Graminae. Bulletin of the Faculty of Pharmacy. **2001**, 39(2), 35-53.
98. Benmansour N. Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*A.herba-alba* provenant de différentes régions d'Algérie. Thèse de Magister en Biochimie Moléculaire. USTHB. **2001**.

99. Fleisher, Zhenia; Fleisher, Alexander; Nachbar, Robert B. Chemovariation of *A. herba-alba* Asso. Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part XVI. J.Essent. Oil Res. **2002**, 14(3), 156-160.
100. Salido S., Valenzuela L.R., Altarejos, J., Nogueras M., Sánchez A., Cano E. Composition and Intraspecific Variability of *A.herba-alba* from Southern Spain. Biochem. Syst. Ecol. **2004**, 32, 265–277.
101. Kim T.-H., Ito H., Hatano T., Taniguchi S., Khennouf S and Yoshida, T. Chemical constituents of *A. herba-alba* Asso. Natural Medicines **2004**, 58, 165.
102. Dahmani-Hamzaoui N et Baaliouamer A. Composition chimique de l'huile essentielle algérienne d'*A.herba-alba* originaire de Djelfa. Rivista Ital. EPPOS.**2005**, 8, 39-42.
103. Salah Sam M., Jager A.K. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. J. Ethnopharmacology. **2005**, 97(1), 145-149.
104. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. **2006**, 97(4), 654-660.
105. Saleh M., Belal M., El-Baroty G. Fungicidal Activity of *A. herba-alba* Asso (Asteraceae), was found to be associated with two major volatile compounds isolated from the fresh leaves of the plant. Carvone and piperitone. J. Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. **2006**, 41(3), 237-244.
106. Hudaib M.M., Aburjai T.A. Composition of the essential oil from *A. herba-alba* grown in Jordan. J. Essent. Oil Res. **2006**, 18(3), 301-304.
107. Dob T and Benabdelkader T. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. J.Essent. Oil Res.**2006**, 18, 685-690.
108. Soliman M.M. Phytochemical and toxicological studies of *Artemisia* L. (Compositae) essential oil against some insect pests. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. **2006**, 41(3-4), 395-406.
109. Giordani R., Hadeff Y., Kaloustian J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia. **2008**, 79, 199–203.
110. Houari M and Ferchichi A. Essential oil composition of *A. herba-alba* from Southern Tunisia. Molécules. **2009**, 14, 1585-1594.
111. Dahmani-Hamzaoui N., Baaliouamer A. Chemical composition of Algerian *A.herba-alba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation. J. Essent. Oil Res. **2009** (in press).
112. Duquenois P. L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, la normalisation et l'Europe du médicament. Parf.Cosm.Sav. **1968**, 11, 414-418.

113. Afnor. Association Française de normalisation, Recueil de normes Françaises. Les huiles essentielles. Ed. Afnor tour Europe 2<sup>ème</sup> éd. **1986**.
114. Linfield W.M., Barauksas R.A., Sivieri L., Serato S., Severson R.M. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1984**, 61, 191.
115. Buhler M., Wandrey C. Enzymatische Fettspaltung = Scission enzymatique des corps gras enzymatic fat splitting. *Fette Seifen Anstrichm.* **1987**, 89, 156-164.
116. Guenther E. *Essential oil*, Ed R.E. Krieger. **1972**.
117. Gueorguiev E. *Technologie de production des huiles essentielles*. Ed de l'ISTA. Plovdiv. 1988, 61-77.
118. Lattaoui H. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de trois espèces de thym à profils chimiques différents. Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle. Option Microbiologie. **1998** Ecole Nationale Supérieure, Rabat. Maroc.
119. Benmansour A. Etude et valorisation de l'Armoise blanche de l'ouest Algérien et des noyaux de deux variétés de dattes Algériennes. Thèse de Doctorat d'Etat en chimie. Université Aboubeker Belkaid. Tlemcen. **1999**.
120. Miguel J.D., Richard H.M. Volatile constituents of Moroccan Thyme oil. *J. Agric. Food. Chem.* **1976**, 24, 833.
121. Benkaci-Ali F., Baaliouamer A, Meklati B.Y., Chemat F. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flav Fragr., J.* **2007**, 22, 148-153.
122. Tranchant J. *Manuel pratique en chromatographie en phase gazeuse*, Ed. Masson. **1982**.
123. Van Den Dool H., Kratz P.D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **1963**, 11, 463-471.
124. National Institute of Standards and Technology, PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass spectral library. The Perkin Elmer Corporation. **1999**.
125. Adams R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy*, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL. **1995**.
126. Shibamoto T., Sandra P., Bicchi C. *Capillary gas chromatography in essential oils analysis*. Ed Hüthig Heidelberg. New York, NY. **1987**.
127. Mc Lafferty T.N. *Interprétation of mass spectra* University Science Books Publication. **1980**.
128. Masada Y. *Analysis of essential oils by GC/MS*. John Wiley, New York, NY. **1976**.
129. Joulain D. *Methodes for analyzing essential oil*. Modern analysis methodologies: use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, **1994**, 19, 5-17.

130. Jennings W., Shibamoto T. Qualitative analysis of flavors and fragrances volatils by glass capillary gaz chromatography. Academic Press, New York, **1984**.
131. Zamureenko N A., Kluyev L., Dmitriev L B. Gas-liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of essential oils. J chromatogr. **1984**, 303,109-105.
132. Adams R P., Granat M., Hogge E., Von Rudloff J. Identification of lower terpenoids from gas-chromatograph-mass spectral data by on-line computer method. J chromatogr. Sci. **1979**, 17,75.
133. Baaliouamer A. Analyse qualitative et semi-quantitative d'huiles essentielles de Citrus de la station expérimentale d'arboriculture de Boufarik. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Sci. Tech. Houari Boumédiène Alger, **1987**.
134. Breckler P N., Betts T J. Relative retention time changes with temperature fort he gas chromatographic identification of volatil oil components. J chromatogr. **1970**, 53(2), 163-170.
135. Kugler E., Langlais R., Halang W. Temperature programmed analysis of essential oils using glass capillary columns. Chromatographia, **1975**, 8(9), 468-473.
136. Nagy S., Klim M. Food technol. **1986**, 40, 95.
137. Dahmani-Hamzaoui N. Extraction et analyse d'huiles essentielles de l'Armoise Algérienne (*a.herba-alba*). Thèse de Magister. Univ. Sci. Tech. Houari Boumédiène Alger. **2004**.
138. Lamiri A., Belanger A., Berrada, M., Zrira S., Benjilali, B. Chemical polymorphism of *A. herba-alba* Asso from Morocco (in French). Rabat. Morocco. **1997**. 69-79.
139. Brian M., Lawrence R., Reynolds. Progress in essential oils. **1989**, 14, May/June.
140. Youn Yuen Shu., Ming Yu Ko., Yuan Shiun Chang. Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. Microchemical Journal. **2003**, 74(2)131-139.
141. Benkaci-Ali F. Etude de la composition chimique de la *Nigella Sativa* originaire d'Algérie. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Sci. Tech. Houari Boumédiène Alger. **2007**.
142. Wichtl M., Anton R. Plantes thérapeutiques, Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Ed Lavoisier Technique et Documentation. **1999**.
143. Deba F., Xuan T. D., Yasuda M., Tawata S., Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. Food Control. **2007**.
144. Vagionas K., Graikou K., Ngassapa O., Runyoro D., Rhinou I. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania, Food Chem. **2007**, 103, 319-324.
145. Oussalah M., Caillet S., Sucier L., Lacroix M., Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* Food Control. **2007**. 18, 414-420.

146. Yasphe J., Segal R., Breuer A., Ardreich N G. Antibacterial activity of *A. herba-alba* Journal of Pharmaceutical Sciences. **1979**, 68 (7), 924-945.
147. Tantaoui-Elaraki A., Errifi A., Benjilali B., Lataoui N. Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. Rivista Ital. EPPOS. **1992**, 6, 13-22.
148. Mahmoud S A S., Hazem A., EL-Sebaie M A F., El-Borollosy M A., EL-Dady A H. Microbiological studies on the phyllosphere of the desert plant *A.herba-alba*. Egyptian Journal of Microbiology. **1988**, 22 (1), 55-77.
149. Kurita N., Koike S. Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. Agric. Chem. **1982**, 46, 159-165.
150. Lattaoui H., Tantaoui-Elaraki A. Comparatives kinetics of microbial destruction by the essential oils of *Thymus Broussonetti*, *Thymus zygis* and *Thymus saureioides*. J.Essen.Oil. Res. **1994**, 6, 165-171.
151. Teixeira da Silva J.A. Mining the essential oils of the *Anthemideae*. African Journal of Biotechnology. **2004**, 3(12), 706-720.
152. Svoboda K.P., Hampson J.B., Bioactivity of essential oils selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory, and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK. KA6 5HW. **1999**.
153. Lopes N., Kato M.J., Andrade Eloisa H-A., Maia J.G.S., Yoshida M., Planchart A.R., Katzin A.M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol) Warb. Journal of Ethnopharmacology. 1999, 67, 313-319.
154. Takahashi O., Sakamoto Y and Hiraga K. Lung hemorrhagic toxicity of butylated hydroxyanisole in the rat. Toxicol. Lett. **1985**, 27: 15-25.
155. Kehrer, J.P and Digiovani, J. Comparison of lung injury induced in 4 strains of mice by butylated hydroxytoluene. Toxicol. Lett. **1990**, 52: 55-61.
156. Dimitrios, B. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends Food Sci. Technol. **2006**, 17, 505-512.
157. Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro M.L and Miguel M.G. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 6314-6321.
158. Hazzit M., Baaliouamer A., Verissimo A.R., Faleiro M.L and Miguel M.G. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. Food Chem. **2009**, 116 (3), 714-721.
159. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F and Stocker, P. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. Eur Food Res Technol. **2007**, 224, 801-809

160. Miliauskas G., van Beek T. A., Waard P., Venskutonis R. P and Sulhölter, E. J. R. Identificaion of radical scavenging compounds in *Rhaponticum carthamoides* by means of LC-DAD-SPE-NMR. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 168–172.
161. Niederländer H. A. G., van Beek T. A., Bartasiute A and Koleva, I. I. antioxidante activity assays on-line with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1210, 121–134.
162. Dapkevicius A., Beek T. A and Niederländer H. A. G. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection antioxidants in liquid chromatography eluates. *J. Chromatogr. A* **2001**, 912, 73–82.
163. Brand-Williams W.; Cuvelier M. E.; Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* **1995**, 28, 25–30.
164. von Gadow A.; Joubert E.; Hansmann C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with hat of other plant phenols of rooibos tea (*aspalathus linearis*),  $\alpha$ -thocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 632–638.
165. Leybros J., Frémeaux P. Technique de l'ingénieur. Technique et appareillages. **1990**, 2782, 3.
166. Altarejos J., Salido S., Pérez-Bonilla M., Linares-Palomino P. J., van Beek T. A., Nogueras M and Sánchez A. Preliminary assay on the radical scavenging activity of olive wood extracts. *Fitoterapia* **2005**, 76, 348–351.
167. Pérez-Bonilla M., Salido S., van Beek T. A., Linares-Palomino P. J., Altarejos J., Nogueras M., Sánchez A. isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea euroaea*) wood. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1112, 311–318.
168. Pauli G.F., Poetsch F., Nahrstedt A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proto nuclear magnetic resonante technique. *Phytochem.Anal.* **1998**, 9,177-185.
169. Shahidul Islam M.D., Yoshimoto M., Yahara S., Okuno S., Ishiguro K., Yamakawa, O. J. Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea bataas L*) genotypes. *Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3718-3722.
170. Simoes-Pires C.A., Queiroz E.F., Henriques A.T., Hostettmann, K. Isolation and on-line idenificaion of antioxidant compounds from three *Bacharis* species by HPLC-UV-MS/MS wih pos-column derivatisation. *Phytochem. Anal.* **2005**, 16, 307-314.
171. Choi Y.H., Kim H.K., Linthorst H.J.M., Hollander J., Alfons W., Lefeber M., Cornelis Erkeelens., Nuzillard J.M., Verporte R. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 742-748.
172. Isao Agata., Saori Goto., Tsutomu Hatano., Sansei Nishibe., Takuo Okuda. 1,3,5-tri-*o*-caffeoylquinic acid from *Xanthium strumarium*. *Phytochemistry.* **1993**, 33 (2), 508-509.
173. Changqing Wu., Feng Chen., Xi Wang., Yonnie Wu., Meidui Dong., Guoqing He., Ronald D.,Galyean., Lilin He and Guohui Huang. Identification of antioxidant phenolic compounds

- in Feverfew (*Tanacetum parthenium*) by HPLC-ESI-MS/MS and NMR. *Phytochem. Anal.* **2007**, 18, 401-410.
174. Weber B., Herrmann M., Hartmann B., Joppe H., Schmidt C.O., Bertram H.J. HPLC/MS and HPLC/NMR as hyphenated techniques for accelerated characterization of the main constituents in Chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Eur Food Res Technol.* **2008**, 226, 755–760.
175. Shuyun Shi., Yu Zhao., Honghao Zhou., Yuping Zhang., Xinyu Jiang., Kelong Huang. Identification of antioxidants from *Taraxacum mongolicum* by high-performance liquid chromatography–diode array detection–radical-scavenging detection–electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1209, 145-152.
176. Xianfeng Zhu., Hongxun Zhang., Raymond Lo. J. Agric. Phenolic compounds from the leaf extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L) and their antimicrobial activities. *Food Chem.* **2004**, 52, 7272-7278.
177. Han Jian., Ye Min., Qiao Xue., Xu Man., Wang Bao-rong. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 47(3), 516-525.
178. Xiao-jie Tan., Qing Li., Xiao-hui Chen., Zhi-wei Wang., Zheng-yuan Shi., Kai-shun Bi., Ying Jia. Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in *herba Artemisiae scopariae* from different harvest seasons by HPLC-DAD. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, 47(4-5), 847-853.
179. Carnet A., Heitz A., Fraisse D., Carnat A.-P., Guedon D and Lamaison, J.-L. Major dicaffeoylquinic acids from *Artemisia vulgaris*. *Fitoterapia.* **2000**, 587-589.
180. Xiao Yao., Gang Chen. Simultaneous determination of p-hydroxyacetophenone, chlorogenic acid, and caffeic acid in *herba Artemisiae scopariae* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal Bioanal Chem.* **2007**, 388-475.
181. Aboutabl E.A., Fathy F.I., Sleem, A.A. A contribution to the phytoconstituents and bioactivities of *Artemisia vulgaris* L. cultivated in Egypt. *Egypt. J. Biomedical Sciences* **2006**, 21 245-259.
182. Huang D., Ou B., Prior R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841–1856.
183. Ohnishi M., Morishita H., Iwahashi H., Toda S., Shirataki Y., Kimura M., Kido R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry.* **1994**, 36, 579-583.

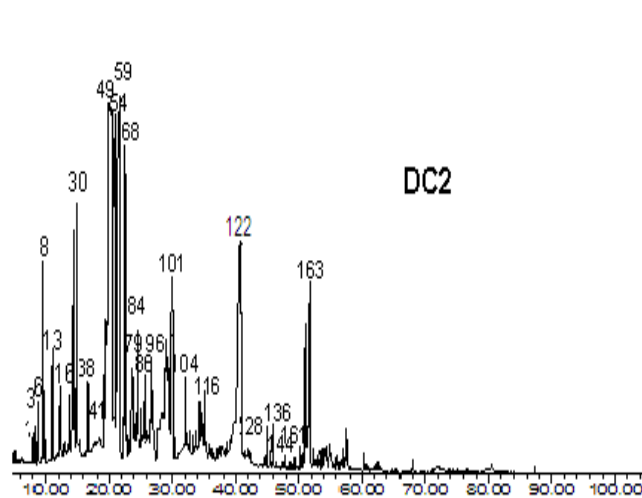
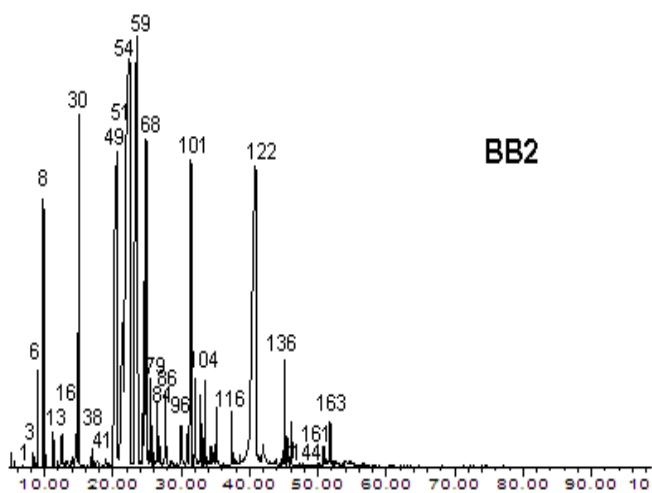
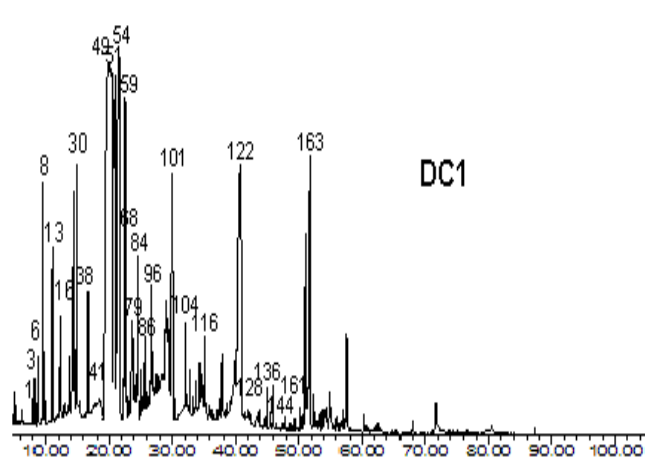
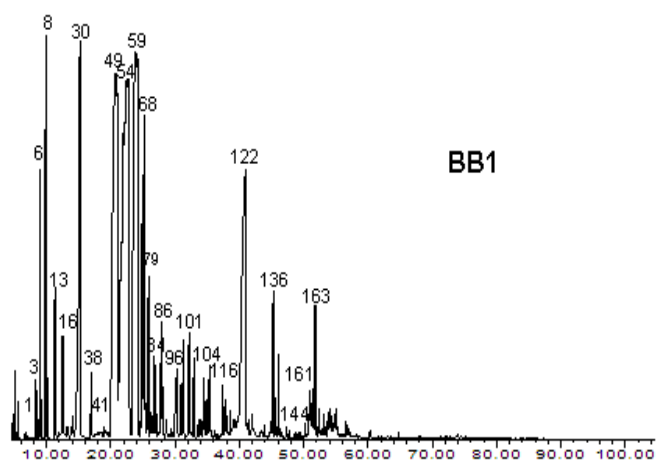
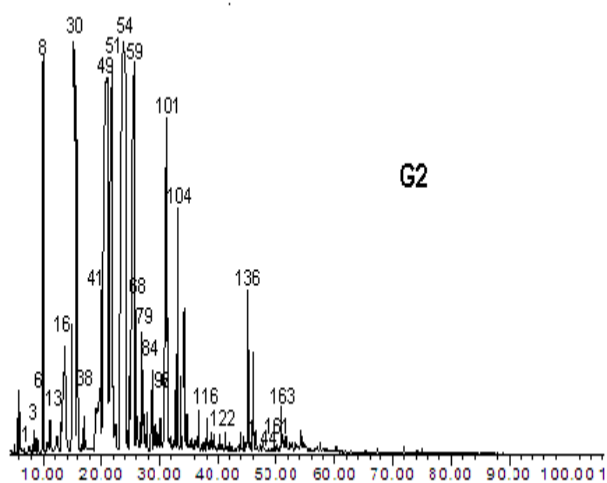
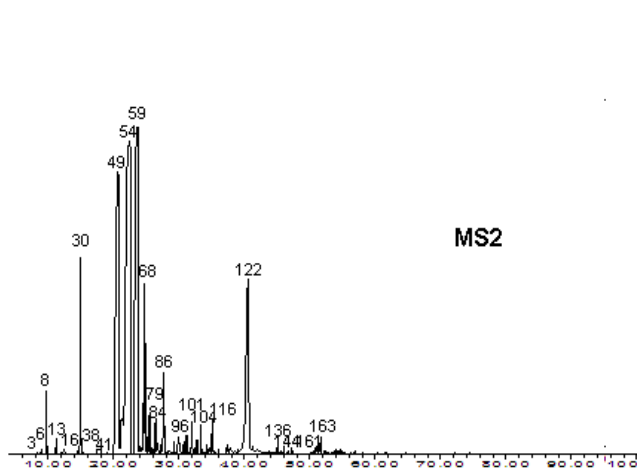
184. Iwai K., Kishimoto N., Kakino Y., Mochida K., Fujita T. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, 4893-4898 ;
185. Kim H., Lee Y.S. Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. *Planta Medica*, **2005**, 71(9), 871-876.
186. Saito S., Kurakane S., Sekia M., Takaia E., Kasaia T., Kawabata J. Radical scavenging activity of dicaffeoyloxycyclohexanes: Contribution of an intramolecular interaction of two caffeoyl residues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**, 13(13), 4191-4199).
187. Dos Santos M.D., Gobbo-Neto L., Albarellab L., Petto de Souza G.E., Pepporine Lopes N. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 96, 545-549.
188. Mishima S., Inoha Y., Naritaa Y., Ohtaa S., Sakamotoa T., Arakia Y., Suzukia K.M., Akaob Y., Nozawab Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**, 13(20), 5814- 5818.
189. Basnet P., K. Matsushige K., Hase K., Kadota S., Namba T. Four di - O - caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol Pharm*. **1996**, 19, 1479-1484.
190. Peluso G., Feo V.D., Simone F.D., Bresciano E., Vuotto M.L. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. *J. Natural Products*. **1995**, 58, 639-646).
191. Mahmood N., Moore P.S., De Tommasi N., De Simone F., Colman S., Hay A. J., Pizza C. 1993. Inhibition of HIV infection by caffeoylquinic acid derivatives. *Antivir. Chem. Chemother*. **1993**, 4, 235-240.
192. McDougall B., King P.J., Wen Wu B., Hostomsky Z., Reinecke M.G., Robinson Jr W.E. Dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids are selective Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 Integrase. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. **1998**, 42, 140-146.
193. Zhu K., Cordeiro M.L., Atienza J., Robinson Jr W.E., Chow S.A. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. *J Virol*. **1999**, 73, 3309-3316.
194. Robinson Jr W.E., Cordeiro M., Abdel-Malek S., Jia Q., Chow S.A., Reinecke M.G., Mitchell W.M. Dicaffeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. *Mol Pharmacol*. **1996**, 50, 846-855.

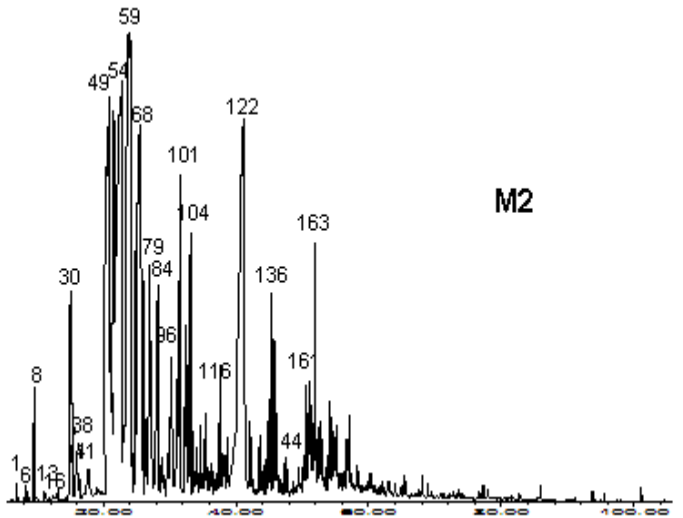
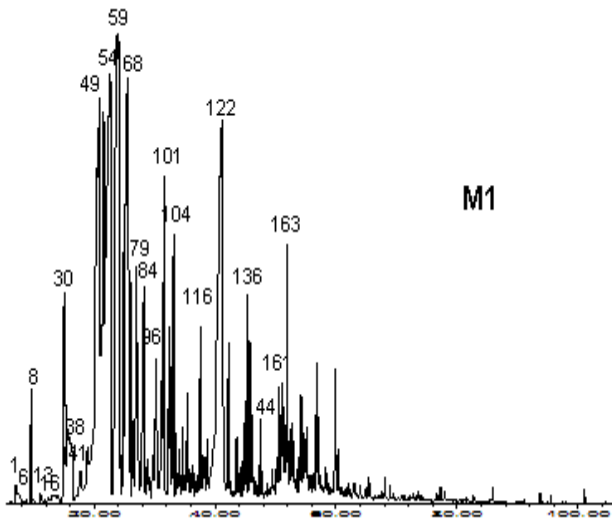
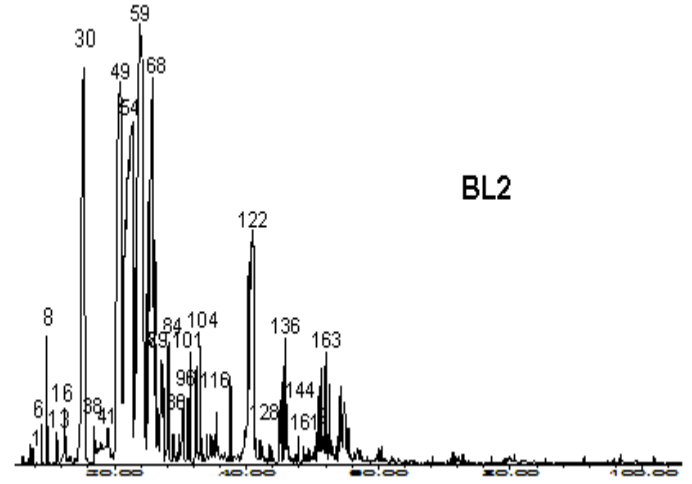
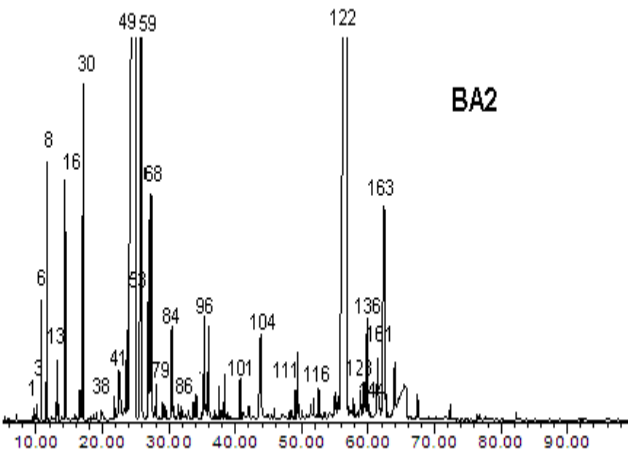
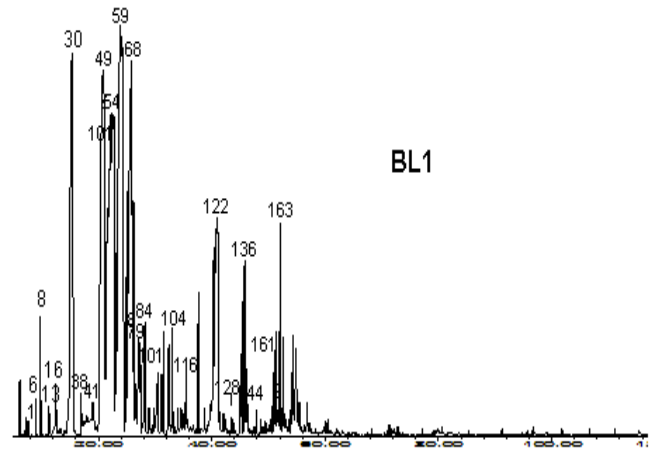
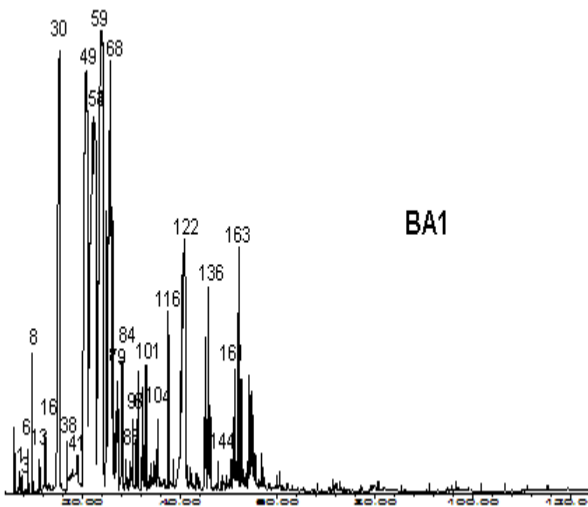
195. Bazzalo M.E., Heber E.M., Delpero Martinez M.A ., Caso O.H. Phenolic compounds in stems of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and their inhibitory effects on this fungus Phytopathol. **1985**, 112, 322-332.
196. Kodoma M., Wada H., Otani H., Kohomoto H., Kimura Y. 3,5-*O*-dicaféoylquinic Acid, an infection-inhibiting factor from *Pyrus pyrifolia* induced by infection with *Alernaria alternata* . Phytochem. **1998**, 47, 371-373.
197. Stange R.R., Midland S.L., Holmes G.J., Sims J.J., Mayer R.T. Constituents from the periderm and outer cortex of *Ipomoea batatas* with antifungal activity against *Rhizopus stolonifer*. Postharvest Biology & Technology. **2001**, 23, 85-92.
198. Cole R.A. Phenolic acids associated with the resistance of lettuce cultivars to the lettuce root aphid. Annals of Applied Biology. **1984**, 105, 129–145.
199. Beninger C.W., Abou-Zaid M.M., Kistner A.L.E., Hallett R.H., Iqbal M.J., Grodzinski B., Hall J.C. A Flavanone and two phenolic acids from *Chrysanthemum morifolium* with phytotoxic and insect growth regulating activity. J Chem Ecol. **2004**, 30, 589-605
200. Islam I., Shaikh A.U., Shahidul I.M. Antioxidative and antimutagenic potentials of phytochemicals from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. International Journal of Cancer Research. **2009**, 5 (3), 83-94
201. Kaul A., Khanduja K.L. Polyphenols inhibit promotional phase of tumorigenesis: relevance of superoxide radicals. Nutrition and cancer **1998**, 32 (2), 81-5.
202. Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Bruke A., Hay A. Inhibition of HIV infection by flavonoides. Antivir. Res. **1993**, 46(7), 1257-1271.
203. Yoshimoto M., Kurata R., Okuno S., Ishiguro K., Yamakawa O., Tsubata M., Mori S., Takagaki K. Nutritional value and physiological functions of *Sweetpotatos leaves*. Acta Horticultrae. **2006**, 703, 107-116.

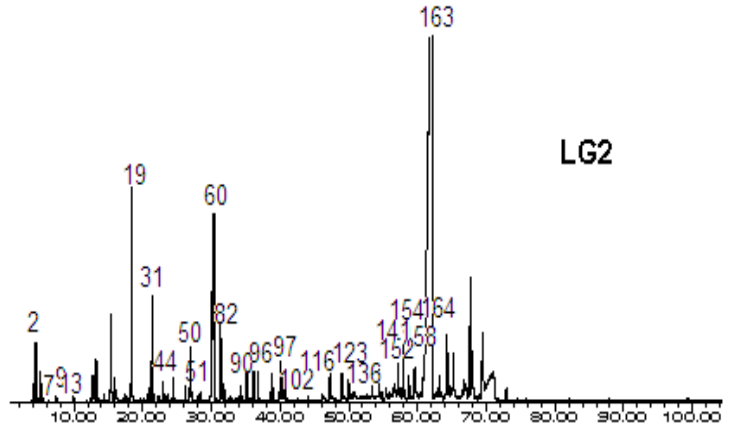
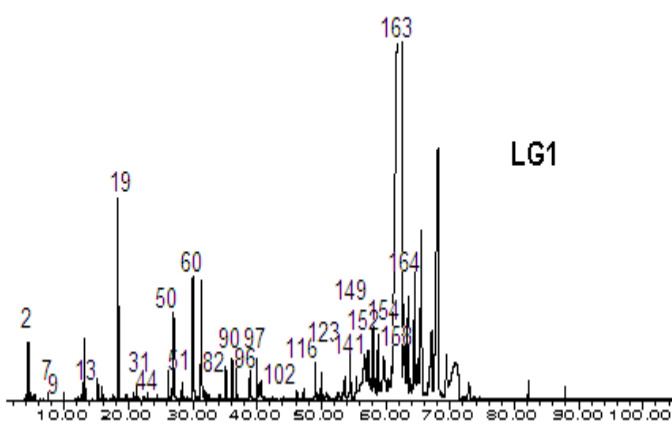
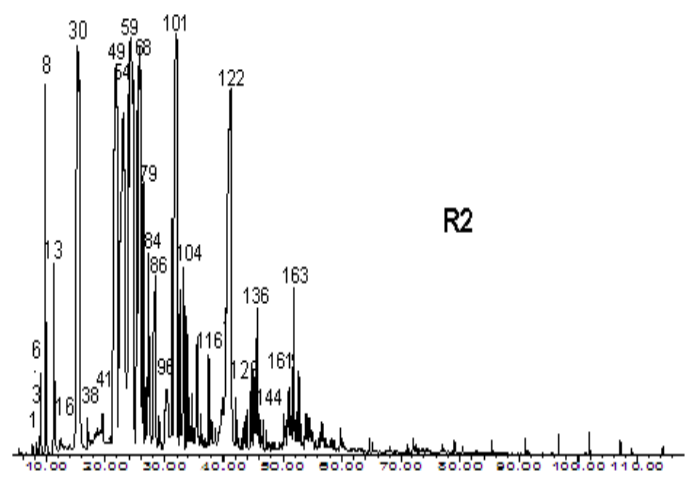
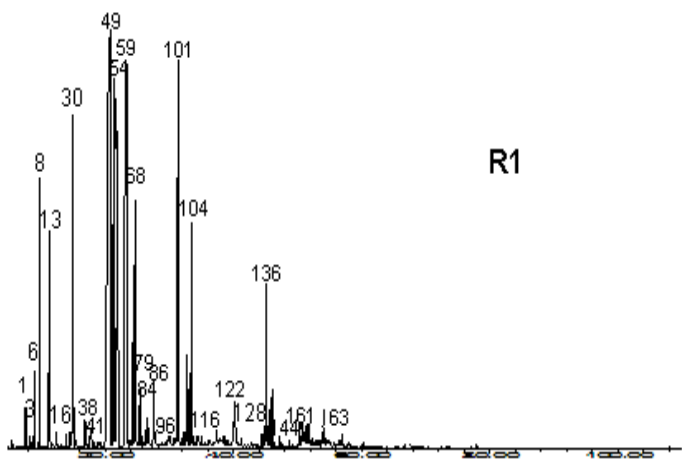
*Annexe*

# Annexe 1

Chromatogrammes en phase gazeuse des huiles essentielles d'*A.herba-alba*  
Obtenus par HD (1) et par MD (2)

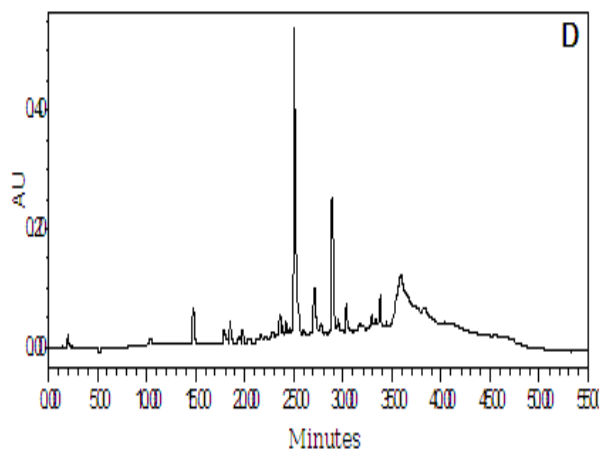




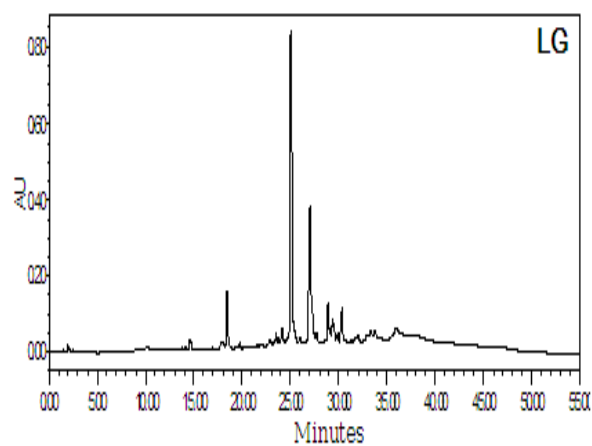


## Annexe 2

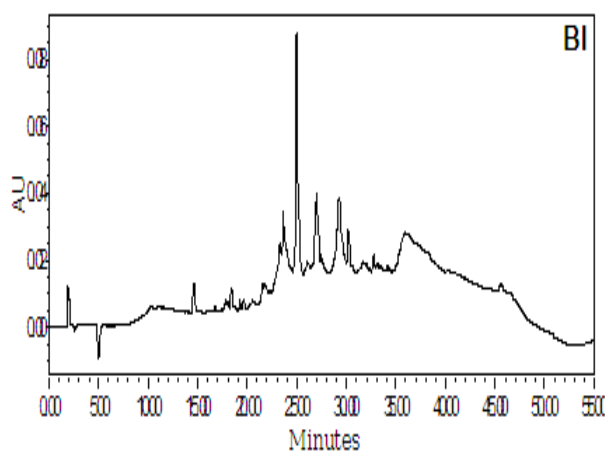
Chromatogramme HPLC des extraits de différentes régions obtenus par hydrolyse à 254 nm



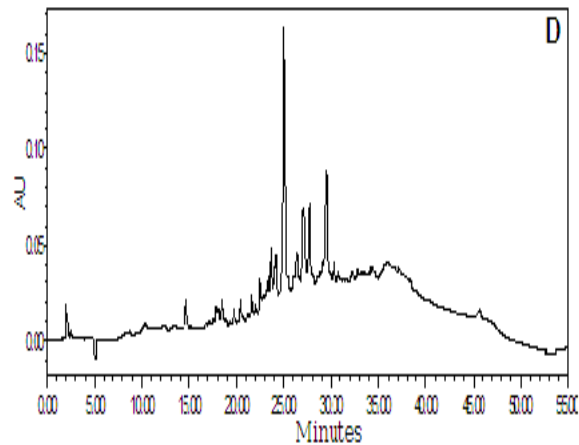
**Figure a.** Profil chromatographique de l'extrait d'éther d'*A.herba-alba* de D



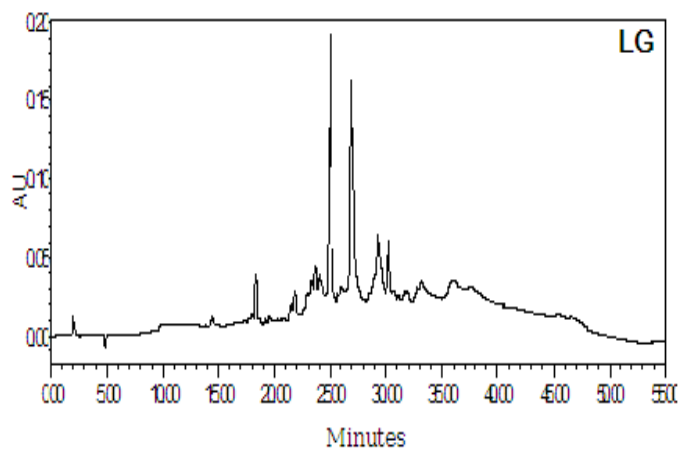
**Figure b.** Profil chromatographique de l'extrait d'éther d'*A.herba-alba* de LG



**Figure c.** Profil chromatographique de l'extrait de butanol d'*A.herba-alba* de BI



**Figure d.** Profil chromatographique de l'extrait de butanol d'*A.herba-alba* de D



**Figure e.** Profil chromatographique de l'extrait de butanol d'*A.herba-alba* de LG

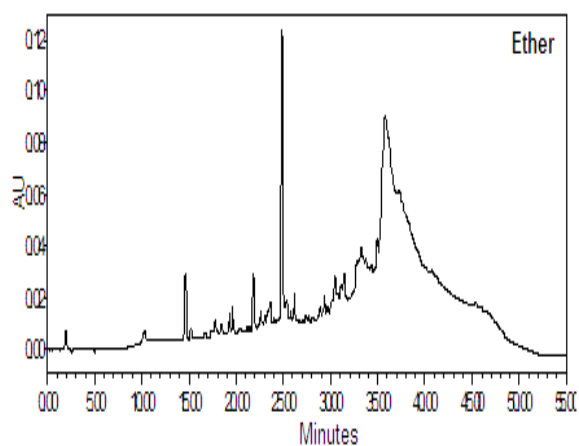
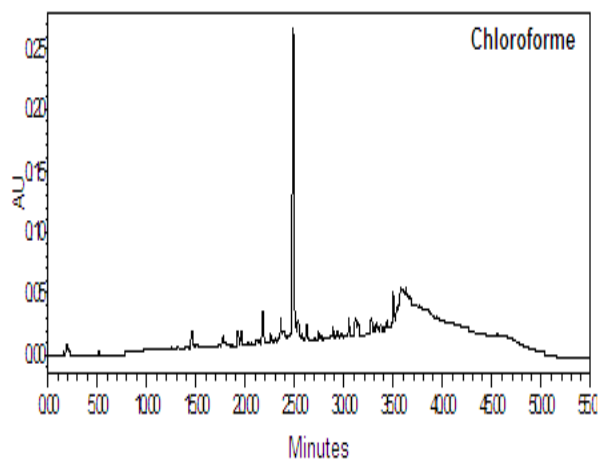
### Annexe 3

Capacité de capture du radical DPPH sur les extraits au sohxlet

Capacité de capture du DPPH			
Echantillon	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbance	%CR
Méthanol	25	0,4064	22,90
	50	0,3382	35,84
	100	0,1852	64,86
	150	0,0703	86,60
	200	0,0263	95,01
Diéthyl éther	100	0,5518	-4,69
	150	0,3366	3,62
	200	0,4807	8,80
	500	0,4211	20,11
chloroforme	100	0,5311	-0,76
	150	0,0954	6,77
	200	0,4545	13,77
Ethanol	500	0,3803	27,85
	25	0,4478	15,05
	50	0,3646	30,83
	100	0,2301	56,35
	150	0,4914	81,90
	200	0,0353	93,30

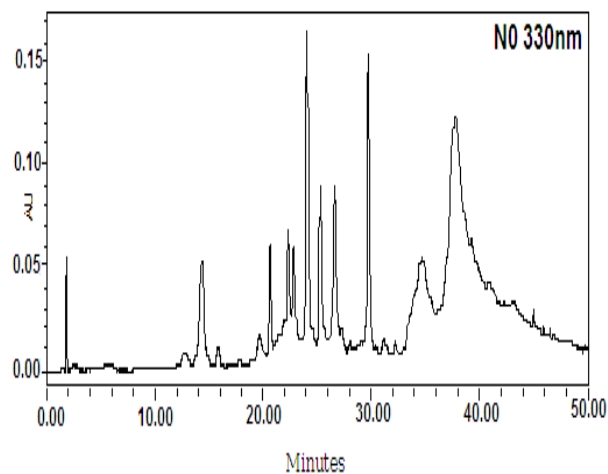
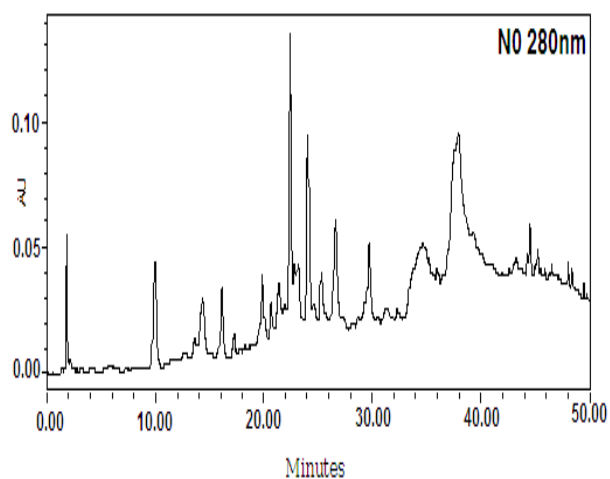
### Annexe 4

Chromatogramme HPLC des extraits d'*A.herba-alba* de MS obtenus par sohxlet à 254nm



### Annexe 5

Chromatogramme HPLC de l'extrait d'EtOH (N0) de l'*A.herba-alba* à 280 et 330nm



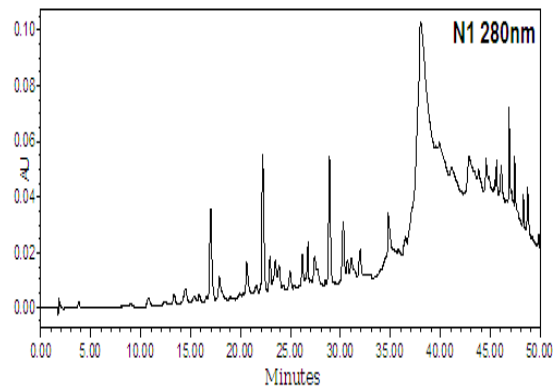
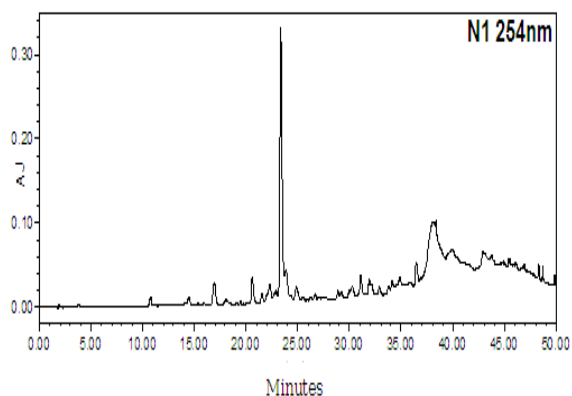
### Annexe 6

Activité antioxydante des extraits pour la capture du radical DPPH à différentes concentrations

Activité de piégeage ((% moyenne ±SD) du radical DPPH par les extraits					
Extrait	C(µg/mL)	Equation	SD	R <sup>2</sup>	%CR
<b>N0</b>	200	$y = 0,4175x + 7,1434$	0,64	0,9938	90,43
	160				72,60
	120				58,11
	100				51,46
	80				40,98
	60				29,87
	200	$y = 0,4081x + 8,2974$	0,64	0,9912	90,28
	160				71,53
	120				58,00
100	51,00				
80	42,88				
60	29,96				
200	$y = 0,4164x + 8,4843$	0,64	0,9924	91,09	
160				73,79	
120				61,27	
100				51,16	
80				42,45	
60				30,92	
<b>N2</b>	50	$y = 1,9306x + 5,8930$	0,51	0,9920	99,84
	40				83,55
	30				65,57
	20				48,71
	15				34,63
	6				13,89
	50	$y = 1,9400x + 6,1841$	0,51	0,9910	99,56
	40				85,53
	30				66,58
20	48,08				
15	35,72				
6	13,97				
50	$y = 1,9232x + 6,0513$	0,51	0,9923	99,38	
40				85,14	
30				63,48	
20				47,75	
15				36,25	
6				13,94	
<b>N3</b>	100	$y = 0,9101x + 2,5559$	2,41	0,9956	90,68
	80				77,14
	60				59,66
	40				39,14
	20				21,29
	10				9,56
	100	$y = 0,9089x + 0,5869$	2,41	0,9967	89,20
	80				74,53
	60				57,42
40	36,76				
20	19,69				
10	7,68				
100	$y = 0,9074x + 4,0553$	2,41	0,9914	90,75	
80				78,84	
60				61,91	
40				41,68	
20				22,31	
10				10,15	
<b>N4</b>	200	$y = 0,3446x + 15,1370$	1,23	0,9929	82,85
	160				71,33
	120				58,84
	100				47,75
	80				42,61
	60				35,58
	200	$y = 0,3345x + 18,0120$	1,23	0,9945	84,38
	160				71,50
	120				60,03
100	49,99				
80	45,96				
60	37,05				
200	$y = 0,3281x + 17,7460$	1,23	0,9960	82,58	
160				70,54	
120				58,65	
100				49,87	
80				44,91	
60				36,19	

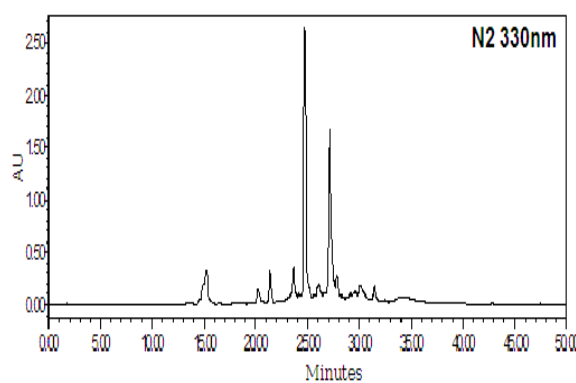
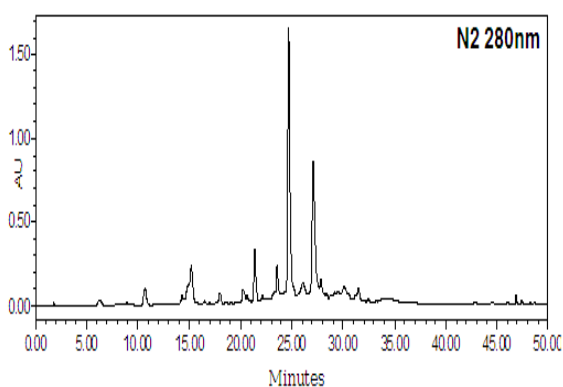
### Annexe 7

Chromatogramme HPLC de l'extrait DCM (N1) de l'*A.herba-alba* à 254 et 280nm



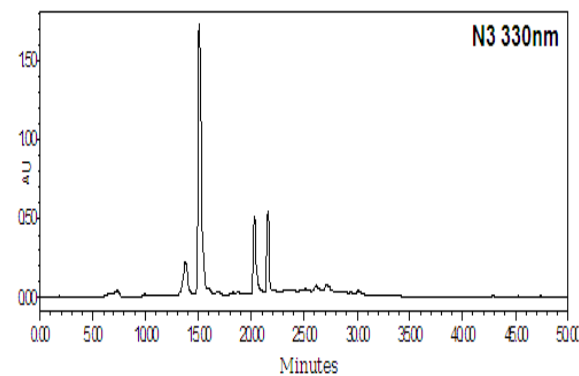
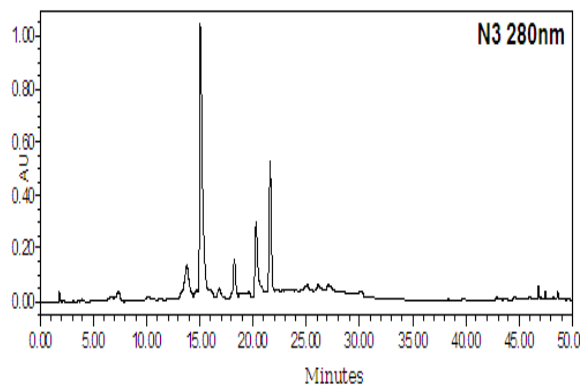
### Annexe 8

Chromatogramme HPLC de l'extrait AcOEt (N2) de l'*A.herba-alba* à 254 et 280nm



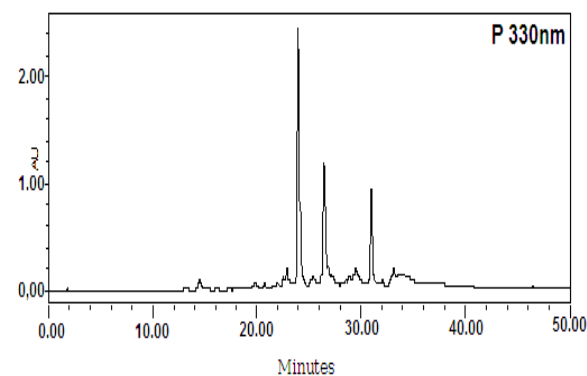
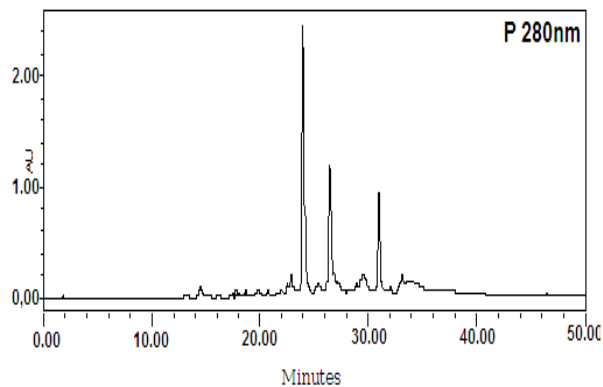
### Annexe 9

Chromatogramme HPLC de l'extrait AcOEt PH3 (N3) de l'*A.herba-alba* à 254 et 280nm



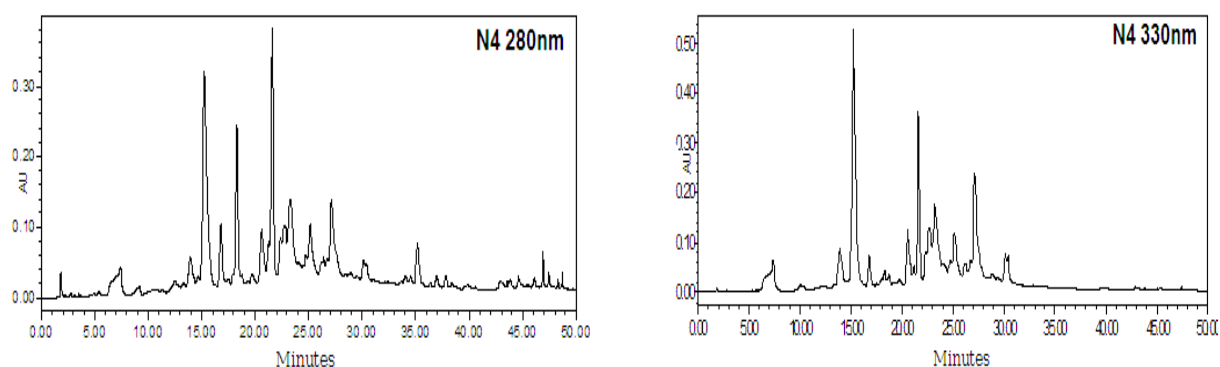
### Annexe 10

Chromatogramme HPLC du précipité (P) de l'*A.herba-alba* à 254 et 280nm



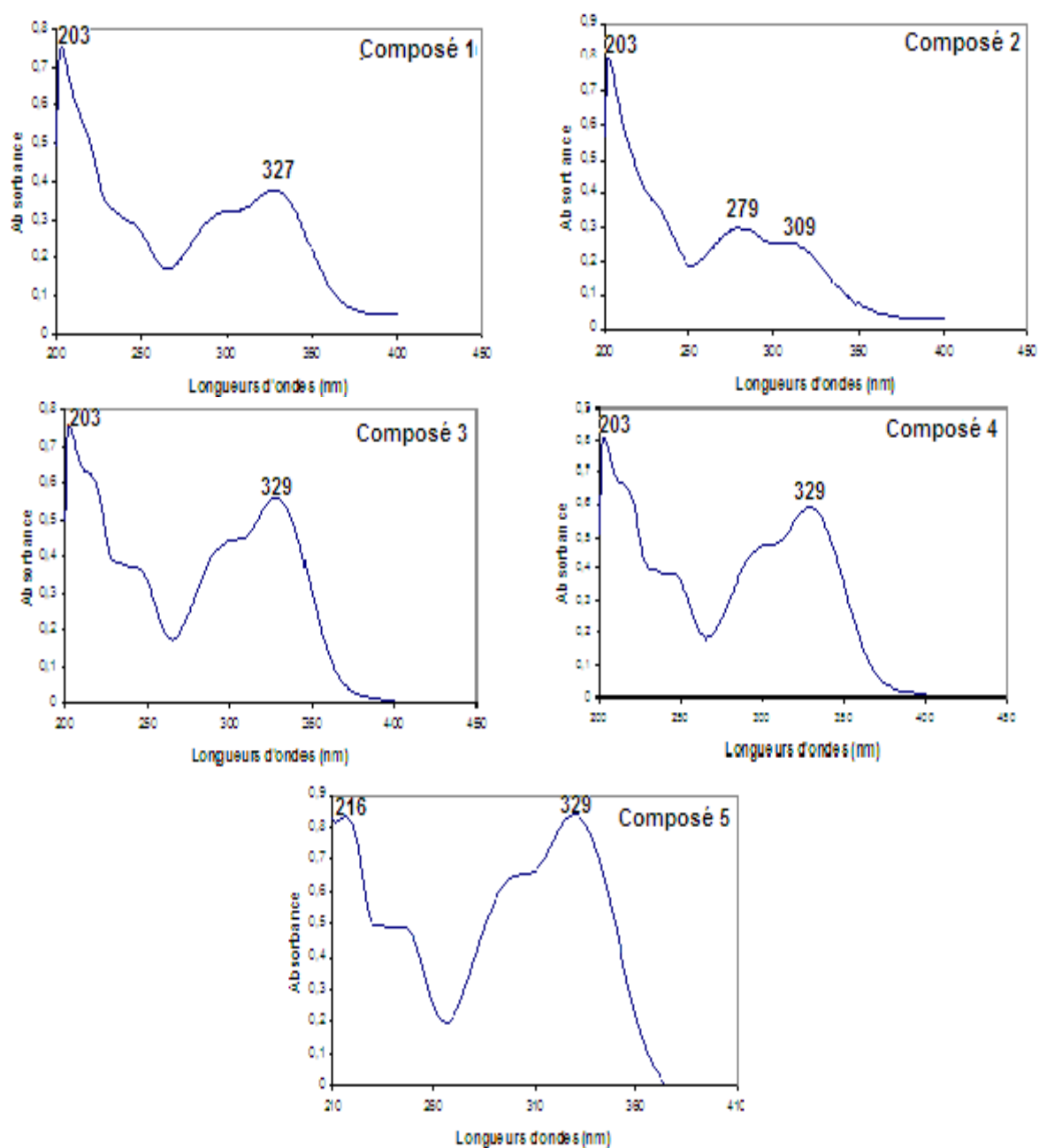
## Annexe 11

Chromatogramme HPLC de l'extrait BuOH (N4) de l'*A.herba-alba* à 254 et 280nm



## Annexe 12

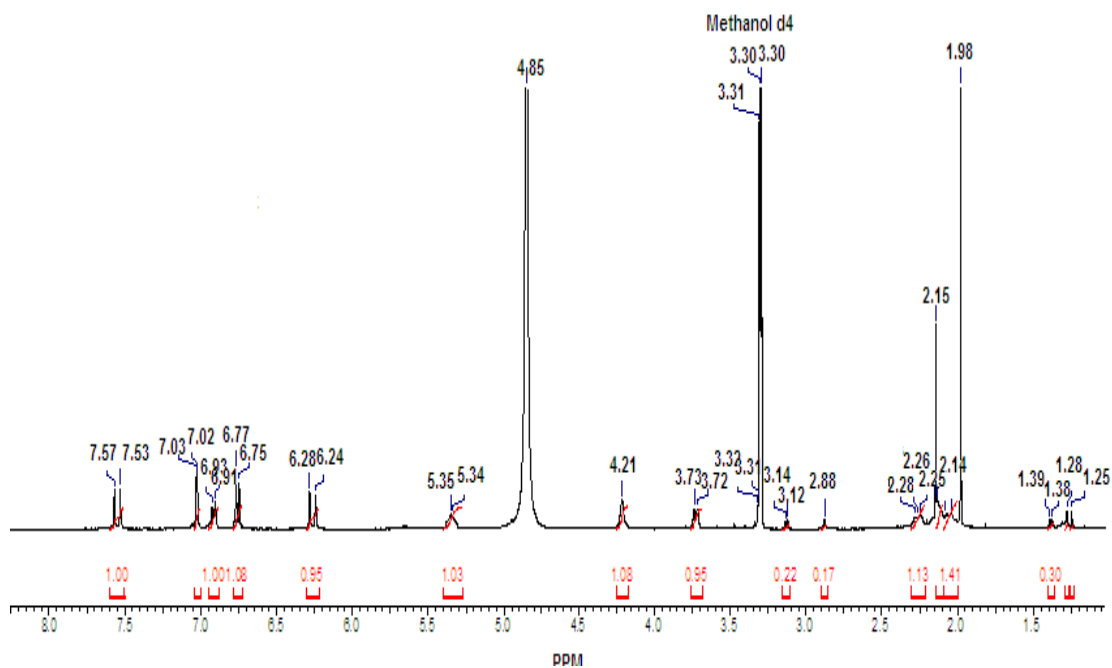
Spectres UV des composés purs à une concentration de 10 ppm



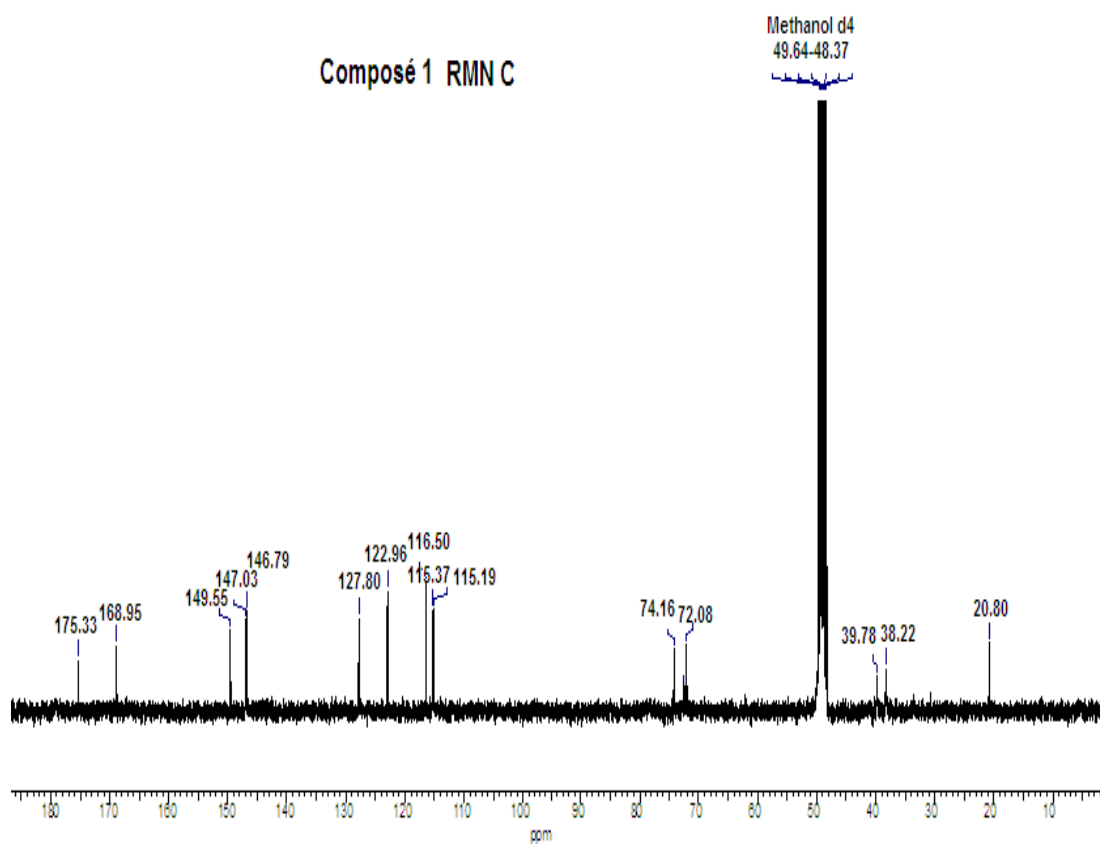
# Annexe 13

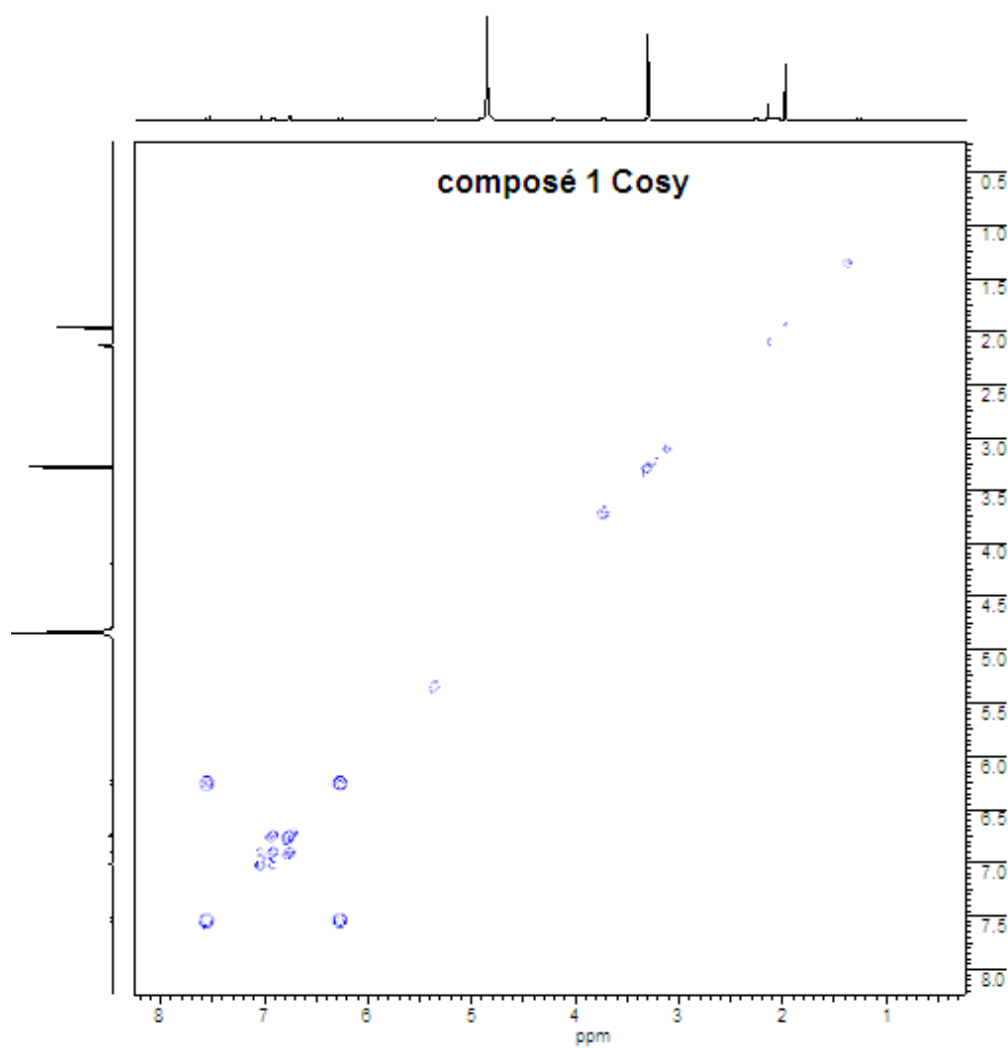
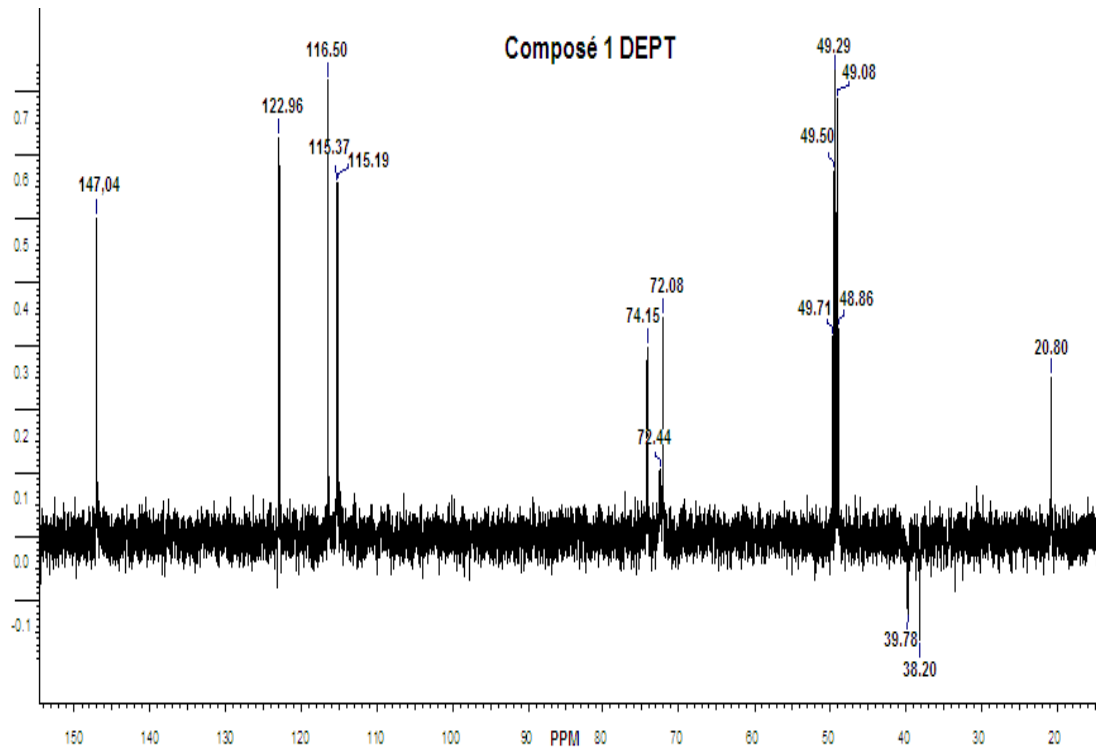
## Spectres RMN du composé pur 1 isolé

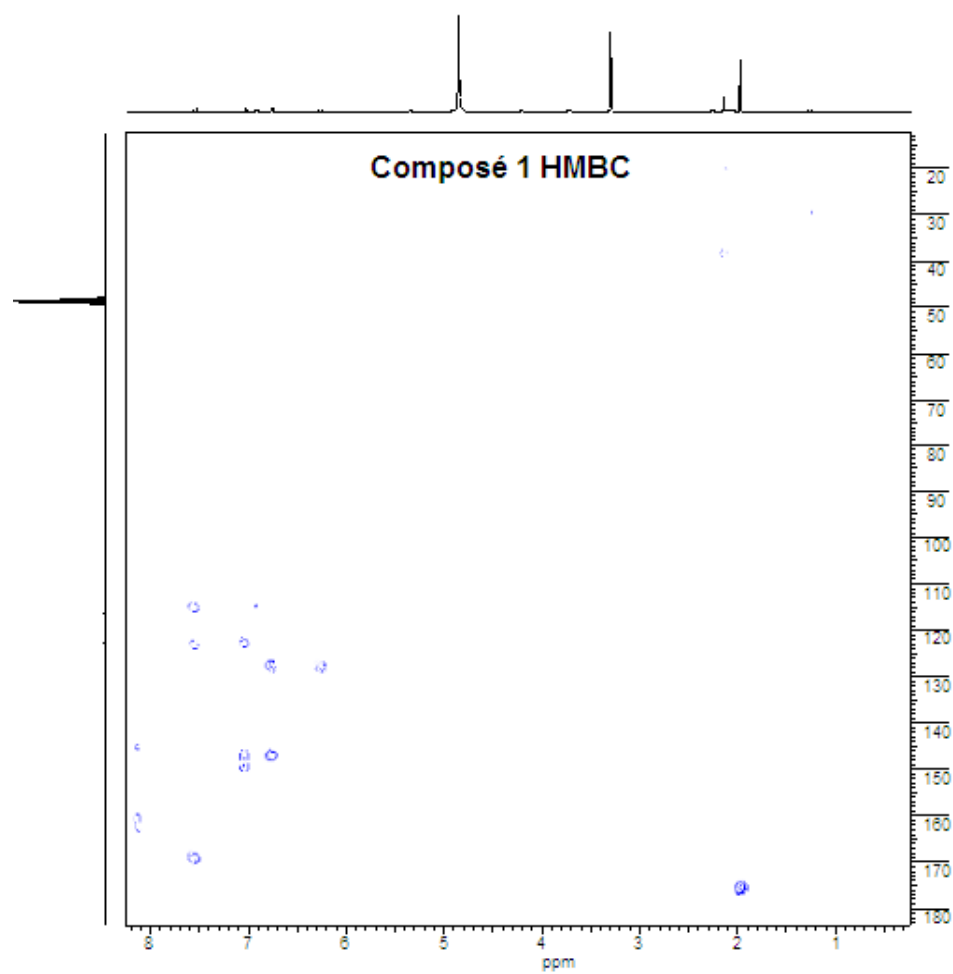
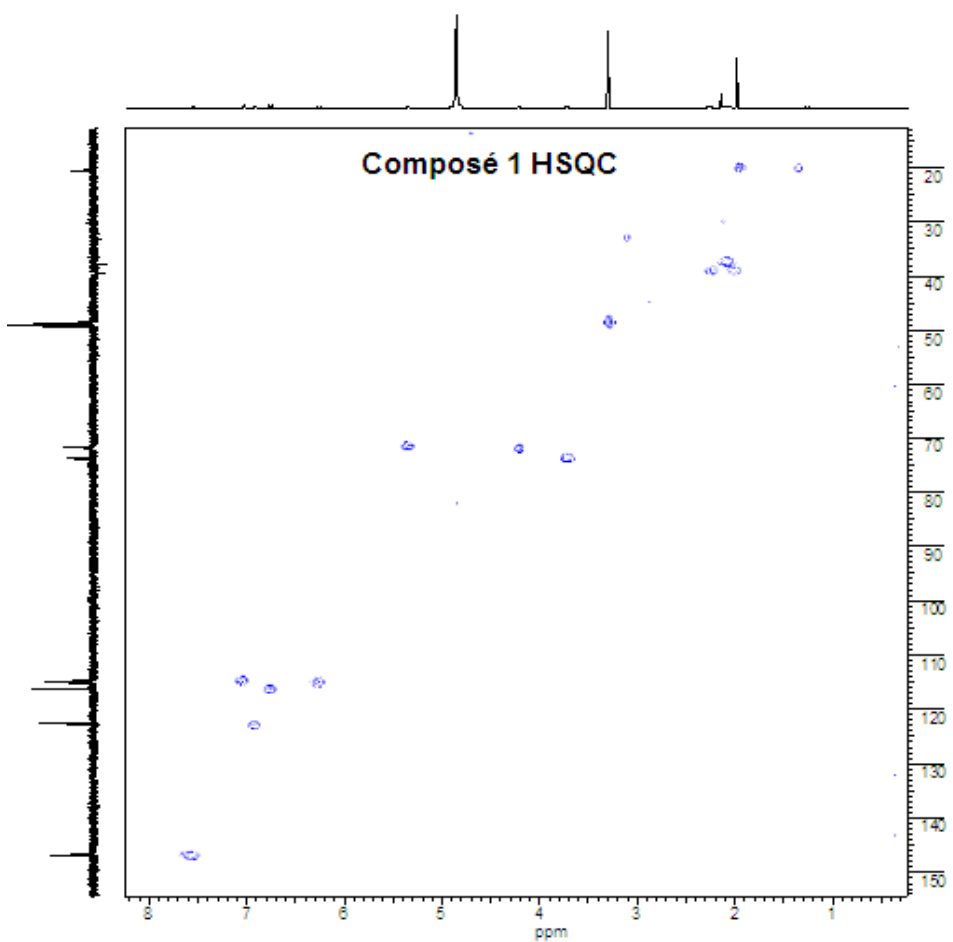
### Composé RMN H



### Composé 1 RMN C

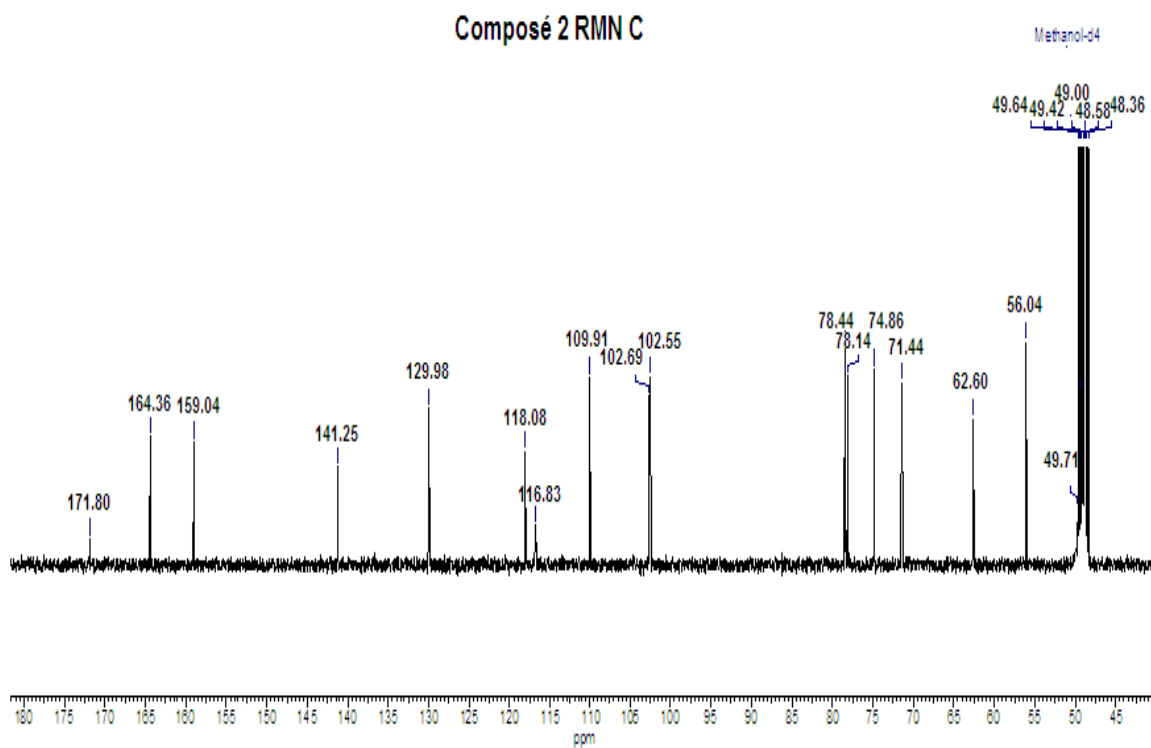
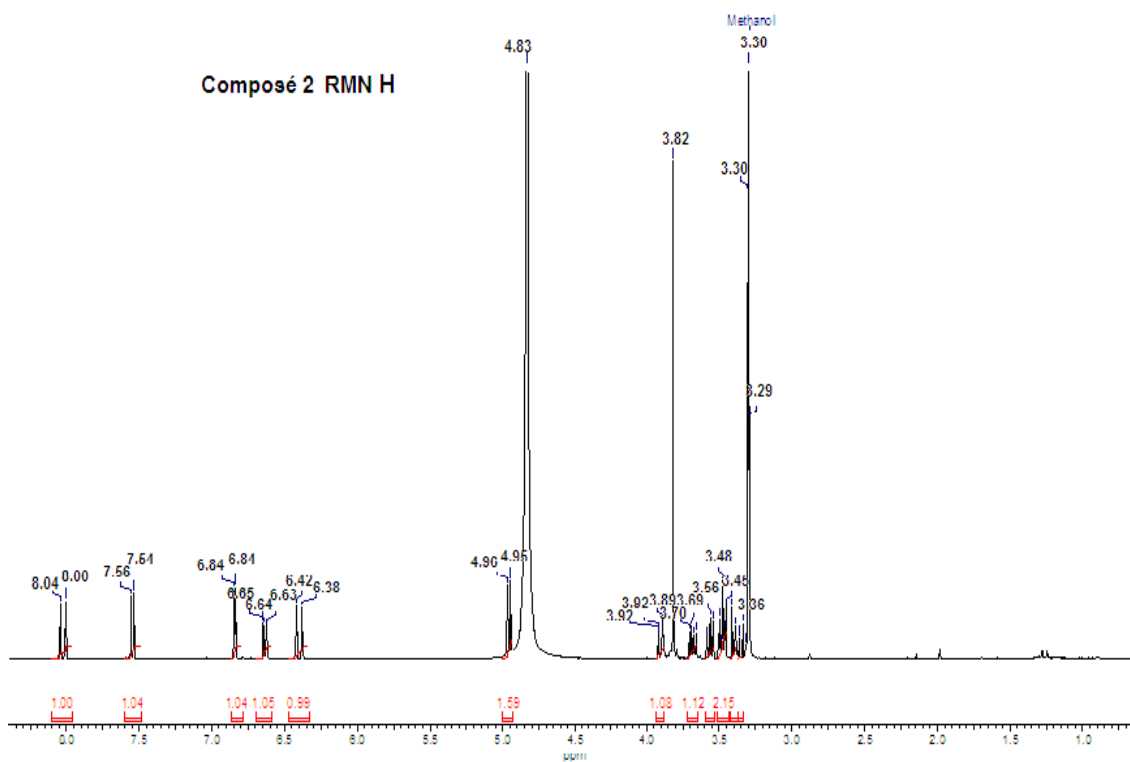






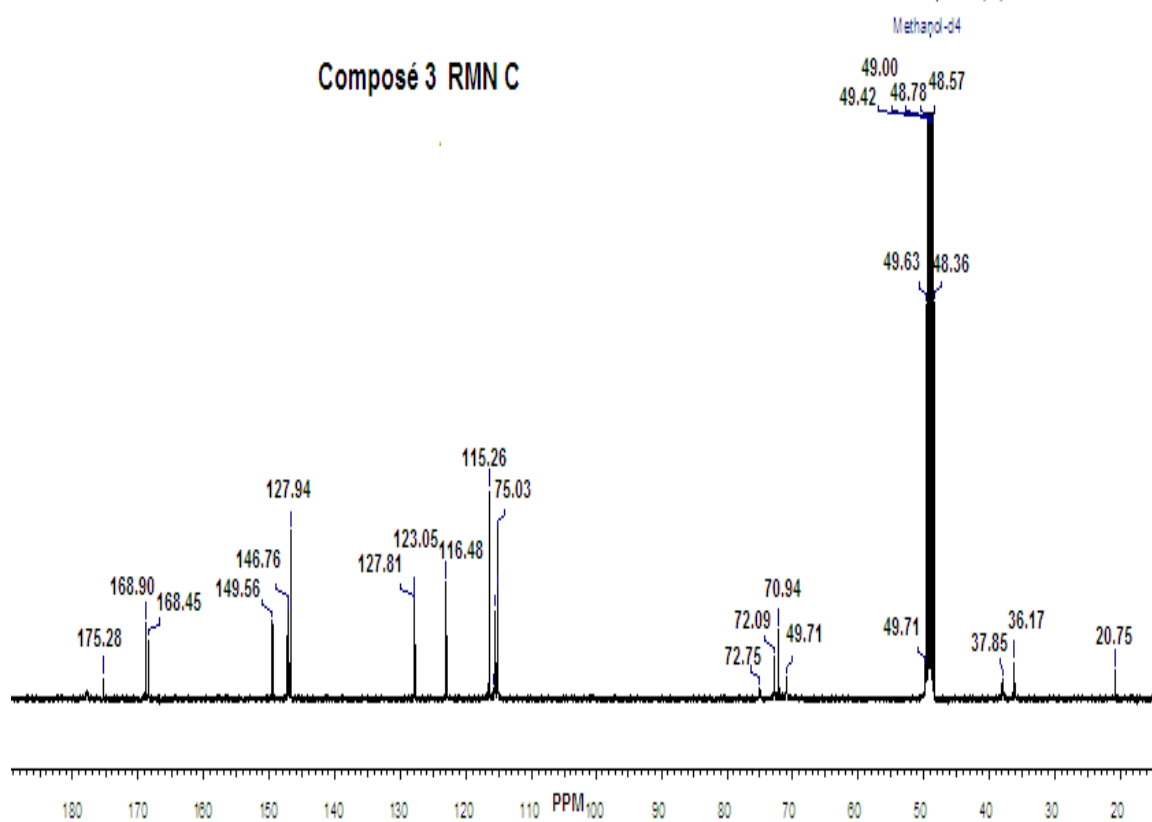
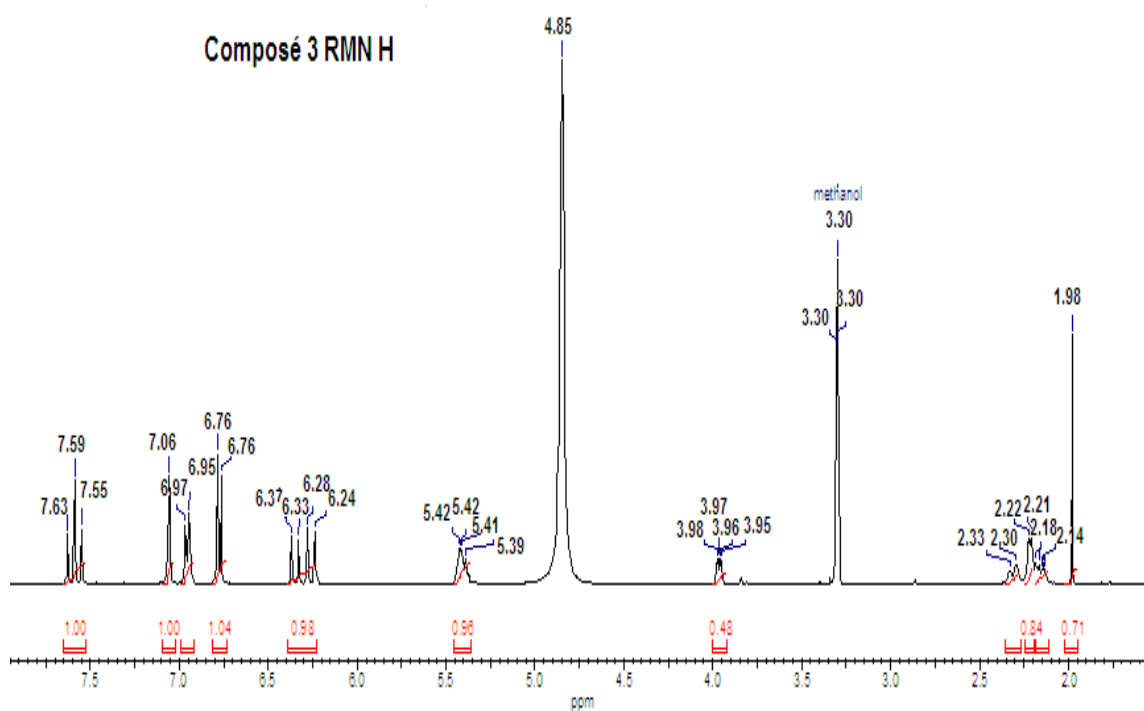
# Annexe 14

## Spectres RMN du composé pur 2 isolé

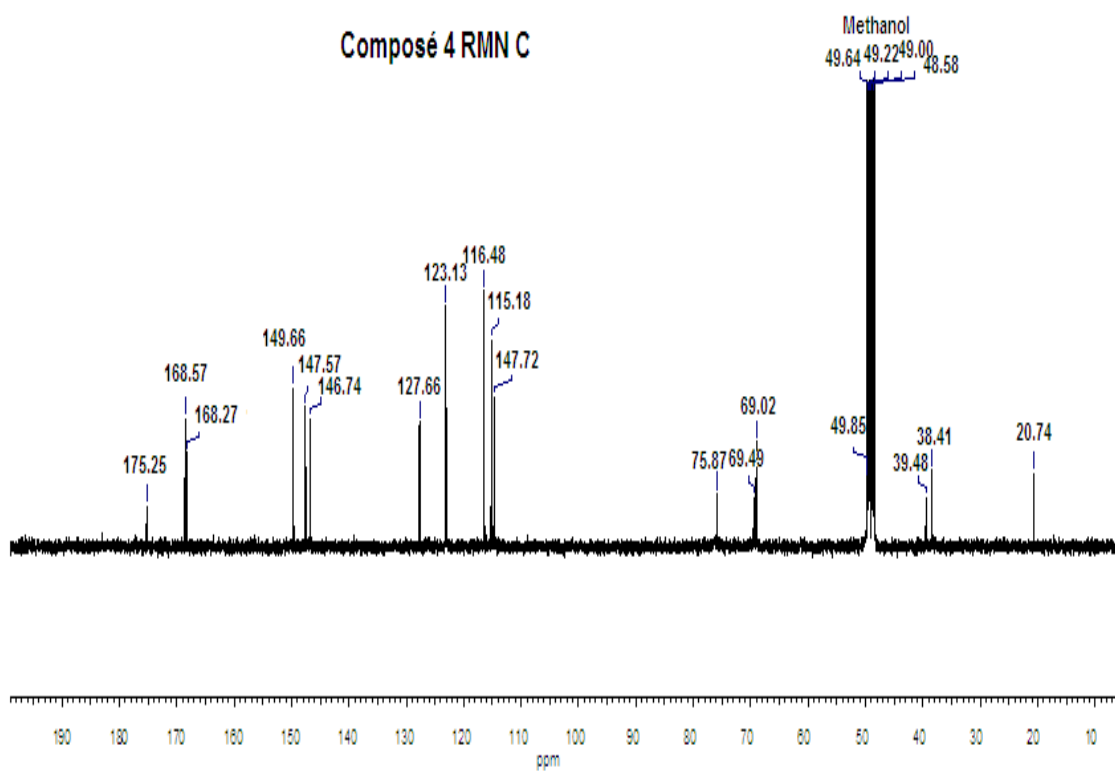
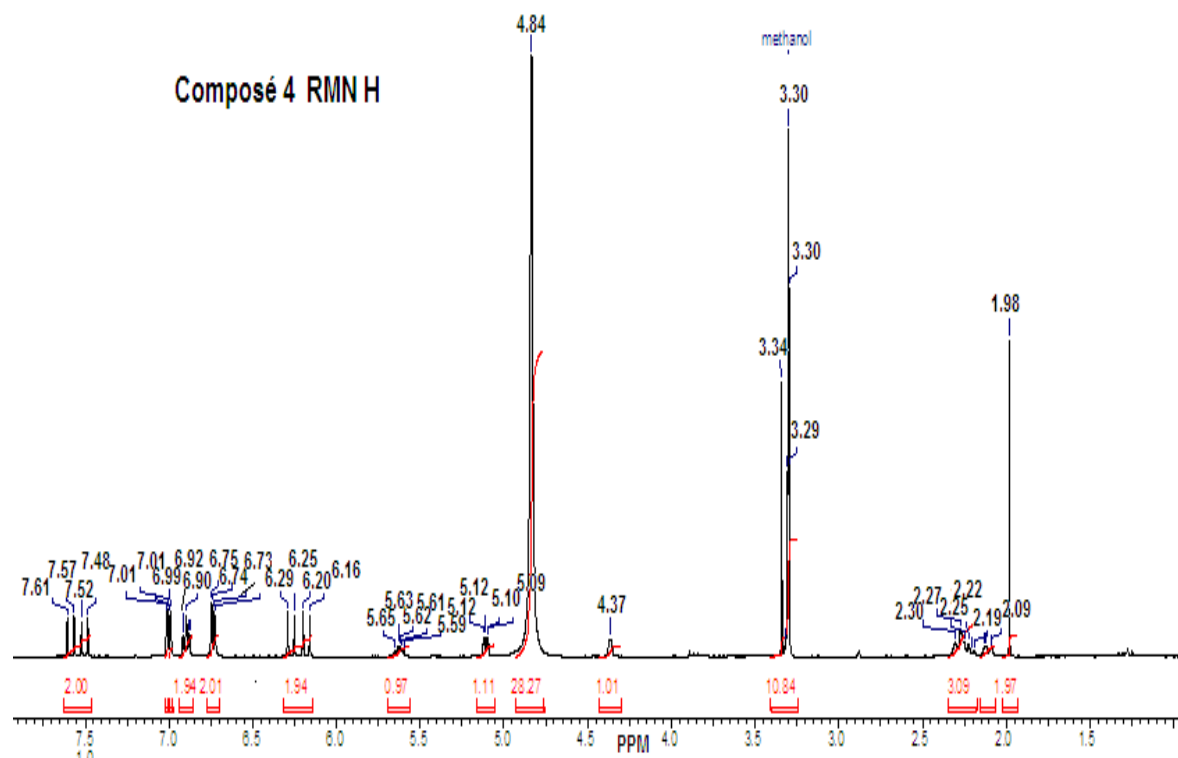


# Annexe 15

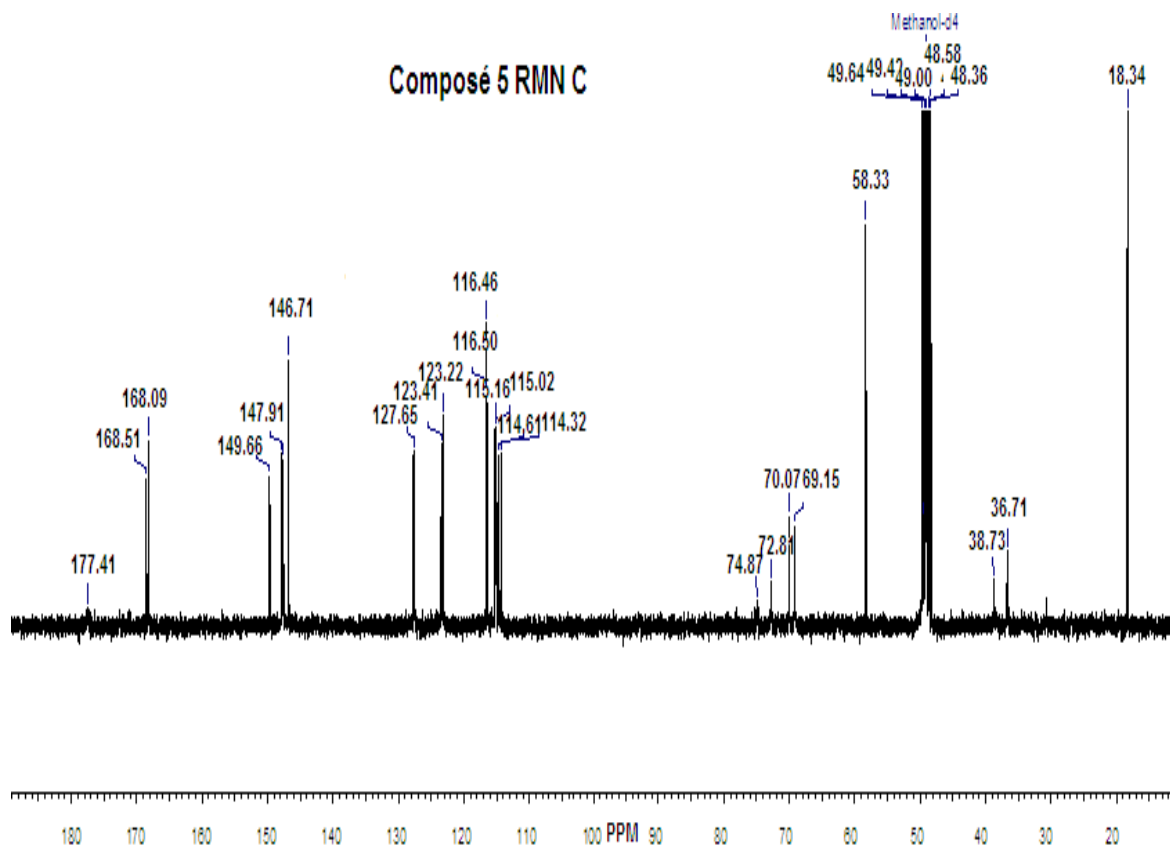
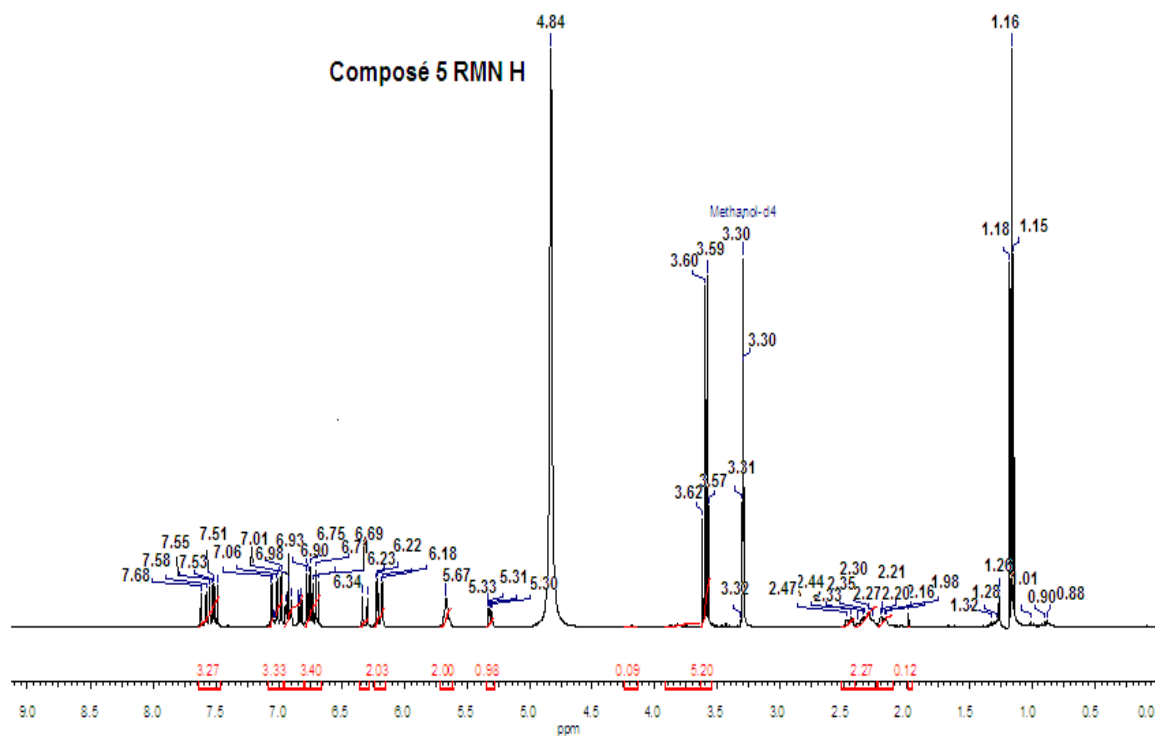
## Spectres RMN du composé pur 3 isolé



**Annexe 16**  
Spectres RMN du composé pur 4 isolé



**Annexe 17**  
**Spectres RMN du composé pur 5 isolé**



## Annexe 18

Spectres de masse ESI-MS, ESI-MS<sup>2</sup>, HRESI-MS et IR du composé pur 1 isolé

### Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

13:26:44

Acquisition Date 24/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUsuarid\Espritric\TI-176\09072401.d

Method ontr31.m

Operator jcas tro

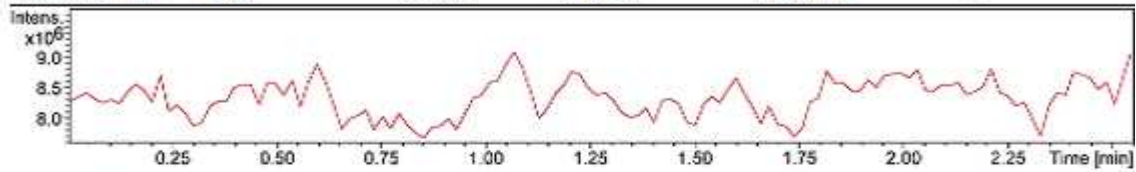
Sample Name Ntr15

Instrument esquire8000

Comment ESI- FullScan

**Acquisition Parameter**

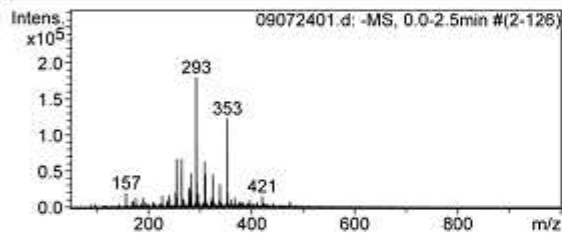
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-123.8 Volt	Skim 1	-18.4 Volt	Trap Drive	46.2
Accumulation Time	656 µs	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



— TIC -All MS

#	RT [min]	Area
n.a.	1.2	n.a.

**-MS, 0.0-2.5min #(2-126)**



#	m/z	I
1	157	15825
2	176	12414
3	191	12437
4	227	15302
5	241	16191
6	242	10843
7	263	15282
8	266	66613
9	266	13188
10	266	66754
11	266	111111
12	269	11552
13	279	26870
14	281	22938
15	283	46596
16	293	179841
17	294	34761
18	297	18253
19	309	63079
20	310	12592
21	311	44588
22	323	12712
23	325	45688
24	326	10646
25	339	31420
26	353	122798
27	354	20014
28	367	12758
29	421	15113

# Compound Mass Spectrum List Report (stct)

## Analysis Info

13:39:14

Acquisition Date 24/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Escriitor\TI-176\09072402.d

Method ontr31.m

Operator jcas tro

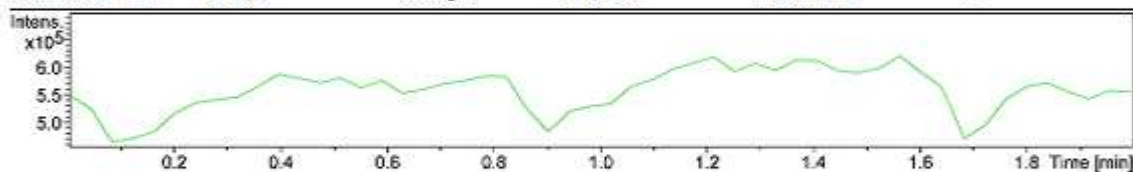
Sample Name Ntr15

Instrument esquire2000

Comment ESI- MS/MS, amplitud=0.4V

## Acquisition Parameter

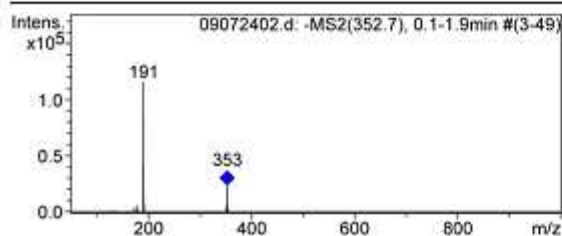
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-123.8 Volt	Skim 1	-18.4 Volt	Trap Drive	46.2
Accumulation Time	7857 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



TIC -All MSn

#	RT [min]	Area
n.a.	1.0	n.a.

## -MS2(352.7), 0.1-1.9min #(3-49)



#	m/z	I
1	135	1197
2	173	3656
3	178	5674
4	191	115753
5	192	7661
6	351	4020
7	352	944
8	353	23131
9	354	3130
10	355	898

## Elemental Composition Report

### Single Mass Analysis

Tolerance = 20.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: O f

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

70 formula(e) evaluated with 3 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-200

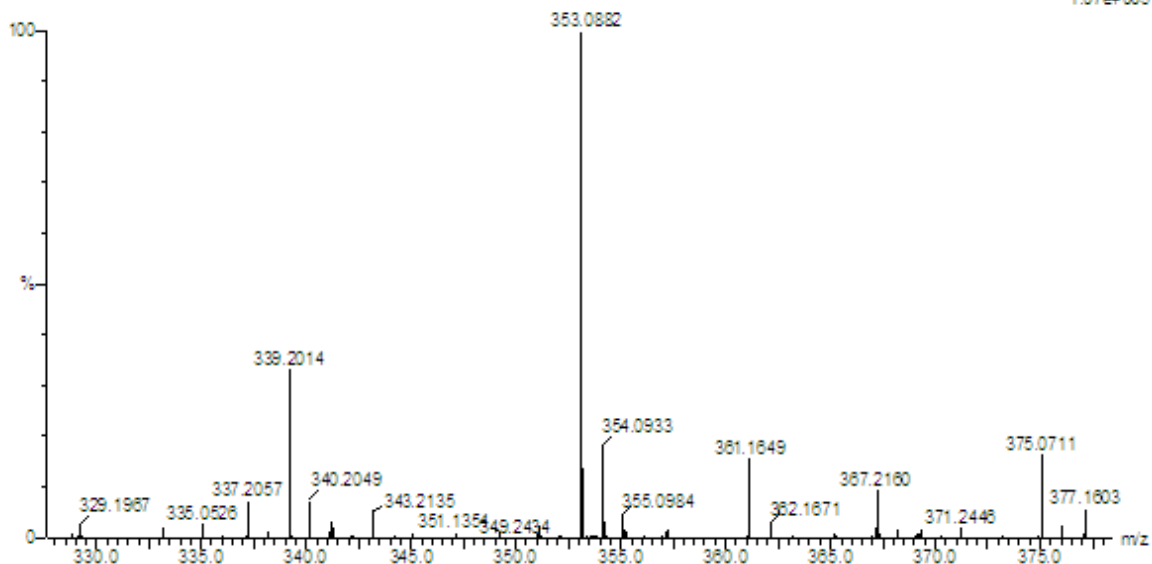
Nr15

Default  
09070205 36 (1.570) Cm(29.48)

Juan

1: TOF MS ES-

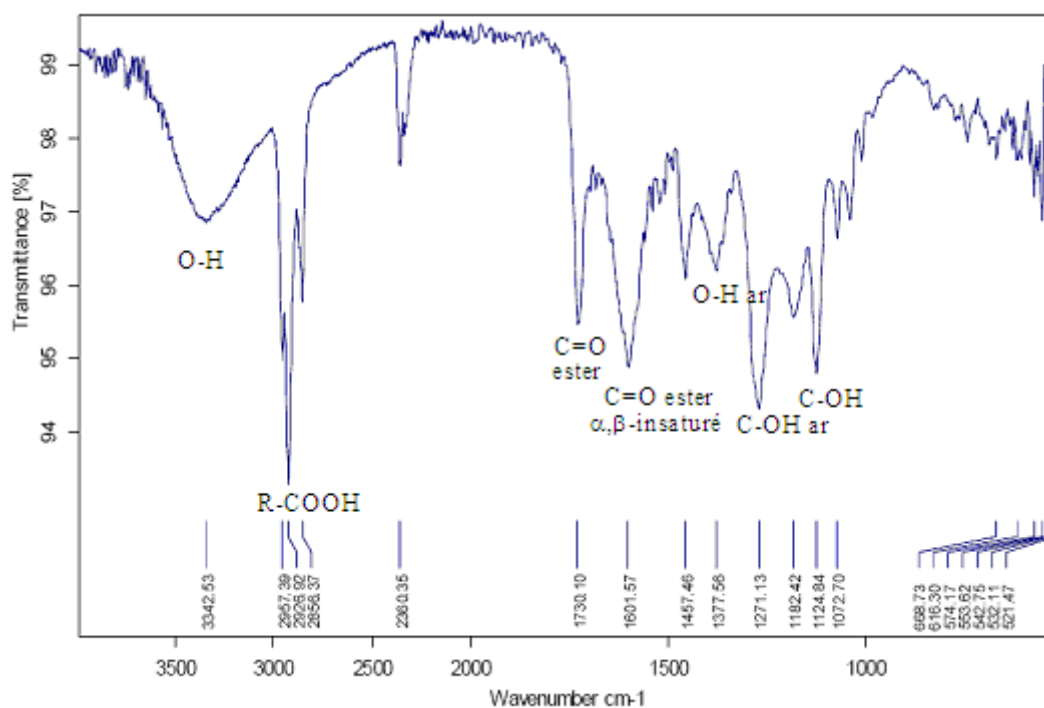
1.07e+005



Minimum: -1.5  
Maximum: 5.0 20.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
353.0882	353.0873	0.9	2.5	8.5	93.5	C16 H17 O9
	353.0931	-4.9	-13.9	-0.5	1577.0	C9 H21 O14
	353.0814	6.8	19.3	17.5	1509.3	C23 H13 O4

### Spectre IR du composé 1



## Annexe 19

Spectres de masse ESI-MS, ESI-MS<sup>2</sup>, HRESI-MS et IR du composé pur 2 isolé

### Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

11:46:29

Acquisition Date 23/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUsuar\id\Es\critorio\TI-176\09072201.d

Method oMPV112-.m

Operator jcastro

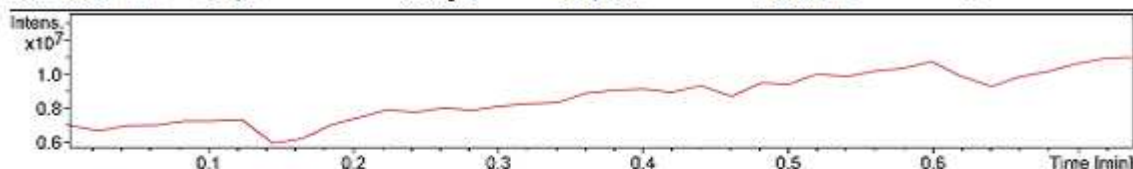
Sample Name Ntr22

Instrument esquire8000

Comment ESI+, FullScan

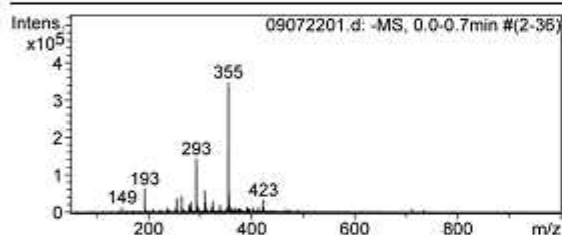
**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-117.6 Volt	Skim 1	-40.0 Volt	Trap Drive	45.2
Accumulation Time	575 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



TIC -All MS

#	RT [min]	Area
n.a.	0.4	n.a.

**-MS, 0.0-0.7min # (2-36)**


#	m/z	I
1	149	12530
2	193	62485
3	238	10700
4	253	10285
5	255	36195
6	256	41917
7	279	21056
8	281	12375
9	283	27235
10	293	142650
11	294	22707
12	297	12887
13	309	58851
14	310	10948
15	311	25838
16	323	14069
17	325	28608
18	339	18882
19	353	11703
20	355	347435
21	356	51496
22	357	19303
23	381	12002
24	387	12112
25	391	14087
26	403	11856
27	413	13615
28	421	13161
29	423	32481

# Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

11:48:53

Acquisition Date 23/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Escriitor\TI-176\09072202.d

Method oMPV112-.m

Operator jcastro

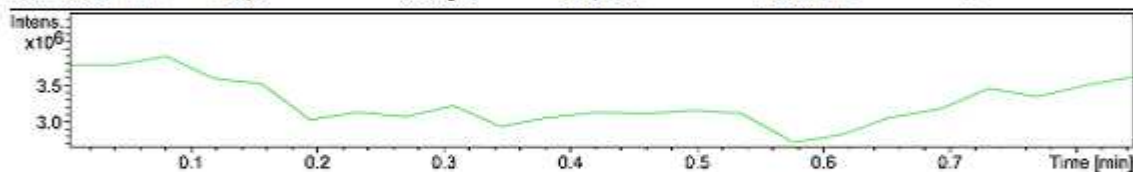
Sample Name Ntr22

Instrument esquire2000

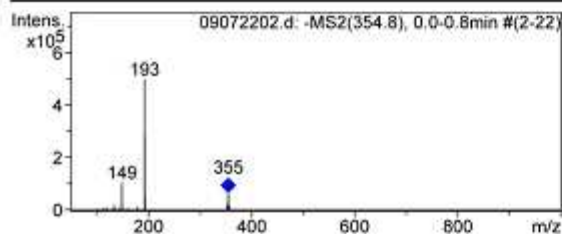
Comment ESI- MS/MS amplitude=0.35V

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-117.6 Volt	Skim 1	-40.0 Volt	Trap Drive	45.2
Accumulation Time	1107 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



#	RT [min]	Area
n.a.	0.4	n.a.

**-MS2(354.8), 0.0-0.8min #(2-22)**


#	m/z	I
1	134	15773
2	149	102858
3	150	7672
4	179	10377
5	193	496312
6	194	46657
7	353	22353
8	355	63773
9	356	9977
10	357	12387

## Elemental Composition Report

### Single Mass Analysis

Tolerance = 20.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

74 formula(e) evaluated with 3 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-200

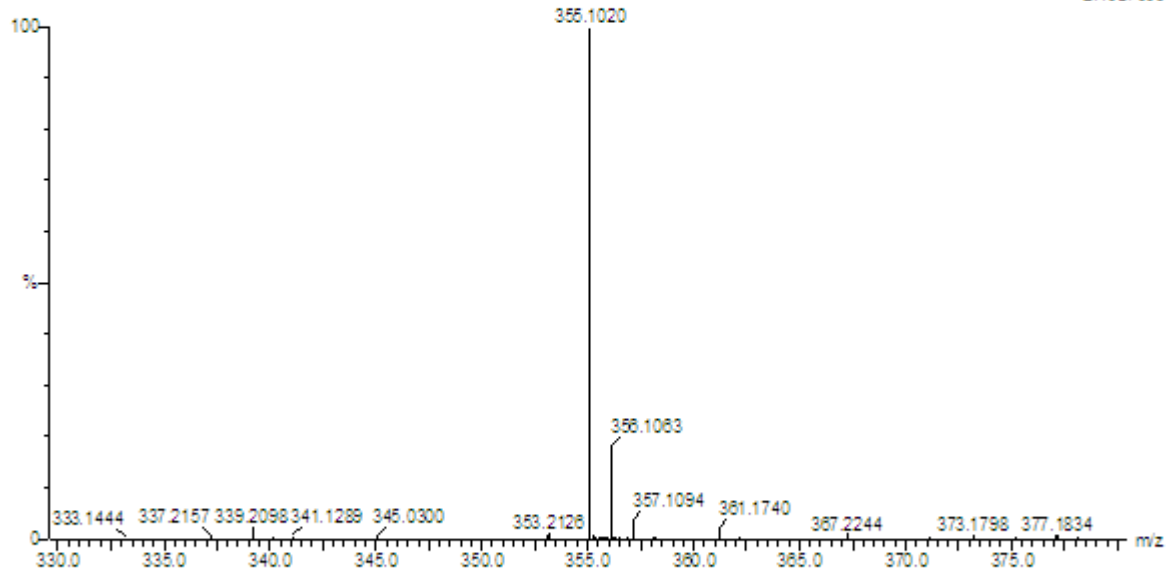
N22

Default  
09070201 85 (3.740) Cm (69.91)

Juan

1: TOF MS ES-

2.45e+006

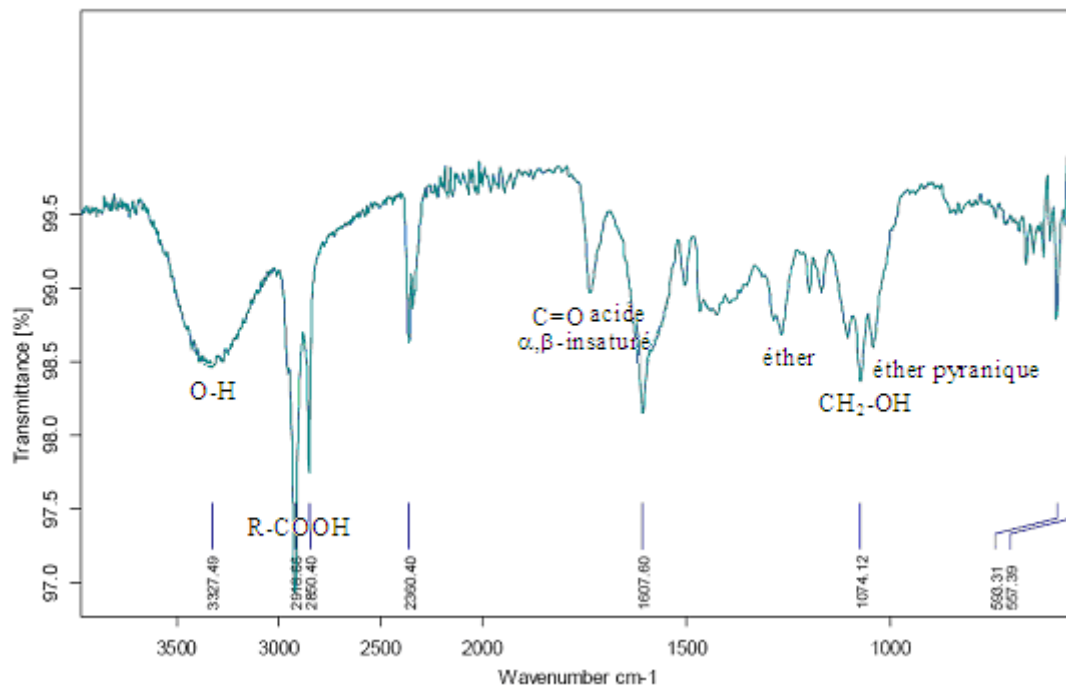


Minimum:

Maximum: 5.0 20.0 -1.5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
355.1020	355.1029	-0.9	-2.5	7.5	412.2	C16 H19 O9
	355.0970	5.0	14.1	16.5	32011.4	C23 H15 O4
	355.1088	-6.8	-19.1	-1.5	36286.6	C9 H23 O14

## Spectre IR du composé 2



## Annexe 20

Spectres de masse ESI-MS, ESI-MS<sup>2</sup>, HRESI-MS et IR du composé pur 3 isolé

### Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

13:13:41

Acquisition Date 27/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Esprit\01\TI-176\09072701.d

Method ontr25.m

Operator jcas tro

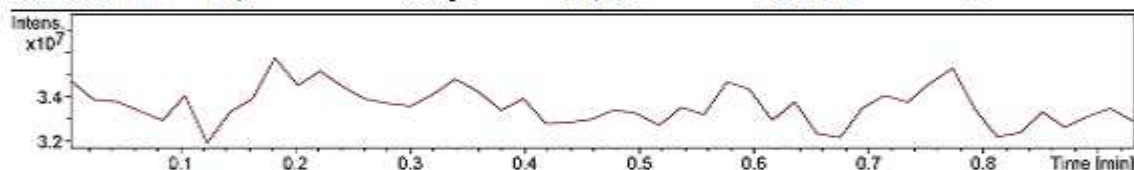
Sample Name Ntr25

Instrument esquire8000

Comment ESI - FullScan

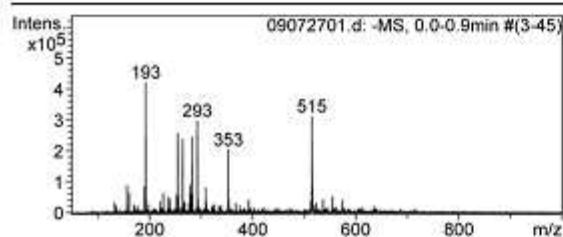
**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-156.6 Volt	Skim 1	-47.0 Volt	Trap Drive	63.2
Accumulation Time	150 µs	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



TIC -All MS

#	RT [min]	Area
n.a.	0.5	n.a.

**-MS, 0.0-0.9min #(3-45)**


#	m/z	I
1	157	88944
2	161	63306
3	191	84198
4	193	420198
5	194	42273
6	221	36122
7	227	63290
8	236	49425
9	241	45751
10	253	59088
11	255	257337
12	256	55497
13	265	238060
14	279	91180
15	281	63338
16	283	245463
17	284	55242
18	293	298976
19	294	46236
20	309	80494
21	353	203334
22	354	44225
23	393	42390
24	513	39551
25	515	310933
26	516	87077
27	537	43608
28	555	52770
29	575	43206

# Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

13:15:37

Acquisition Date 27/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Escriorio\TI-176\09072702.d

Method ontr25.m

Operator jcas trc

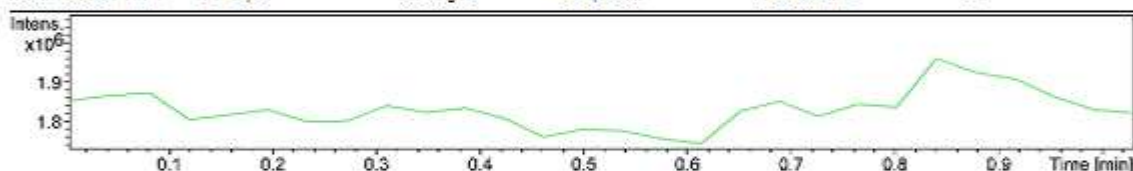
Sample Name Ntr25

Instrument esquire8000

Comment ESI-MS/MS, amplitud=0.4V

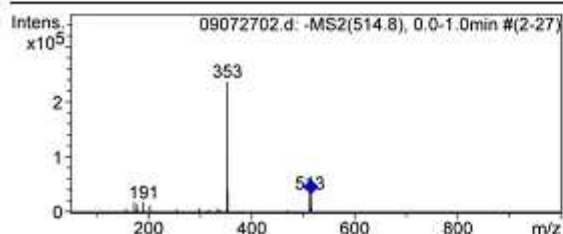
**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary/Exit	-155.6 Volt	Skin 1	-47.0 Volt	Trap Drive	63.2
Accumulation Time	2756 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



TIC -All MStn

#	RT [min]	Area
n.a.	0.5	n.a.

**-MS2(514.8), 0.0-1.0min #(2-27)**


#	m/z	I
1	157	4755
2	173	16383
3	174	1148
4	175	833
5	179	13252
6	179	1177
7	191	16586
8	192	988
9	203	11195
10	204	972
11	255	4574
12	289	5733
13	300	868
14	317	3563
15	335	5525
16	336	1115
17	337	729
18	339	1420
19	340	1046
20	351	1661
21	353	235768
22	354	35645
23	489	1708
24	470	1326
25	471	1340
26	513	33280
27	514	6412
28	515	31187
29	516	6843

## Elemental Composition Report

### Single Mass Analysis

Tolerance = 20.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: O ff

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

139 formula(e) evaluated with 5 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-200

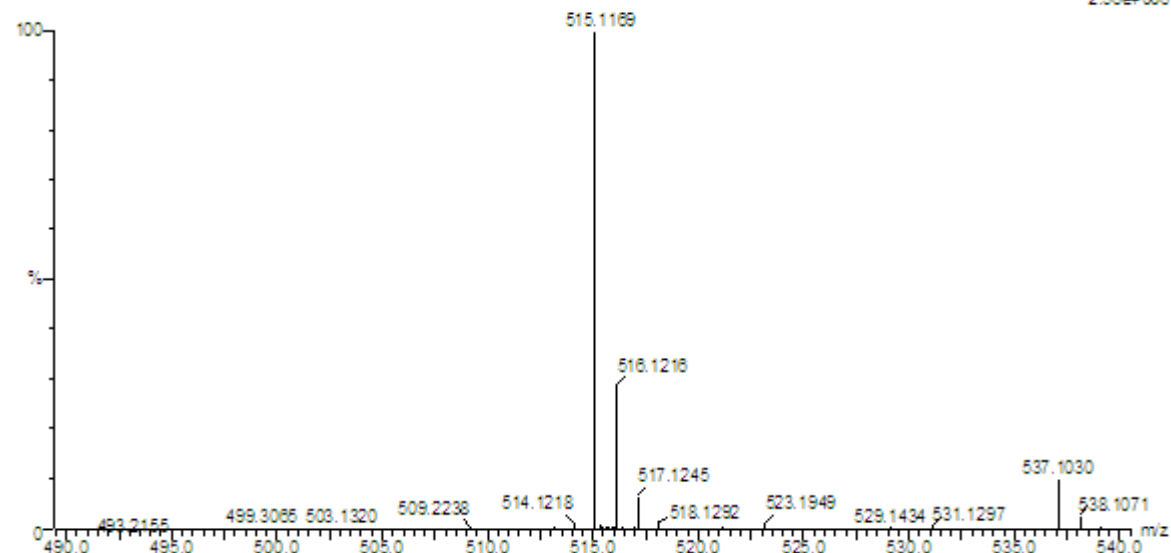
Nr25

1: TOF MS ES-

Default  
09070202 39 (1.711) Cm (33.50)

Juan

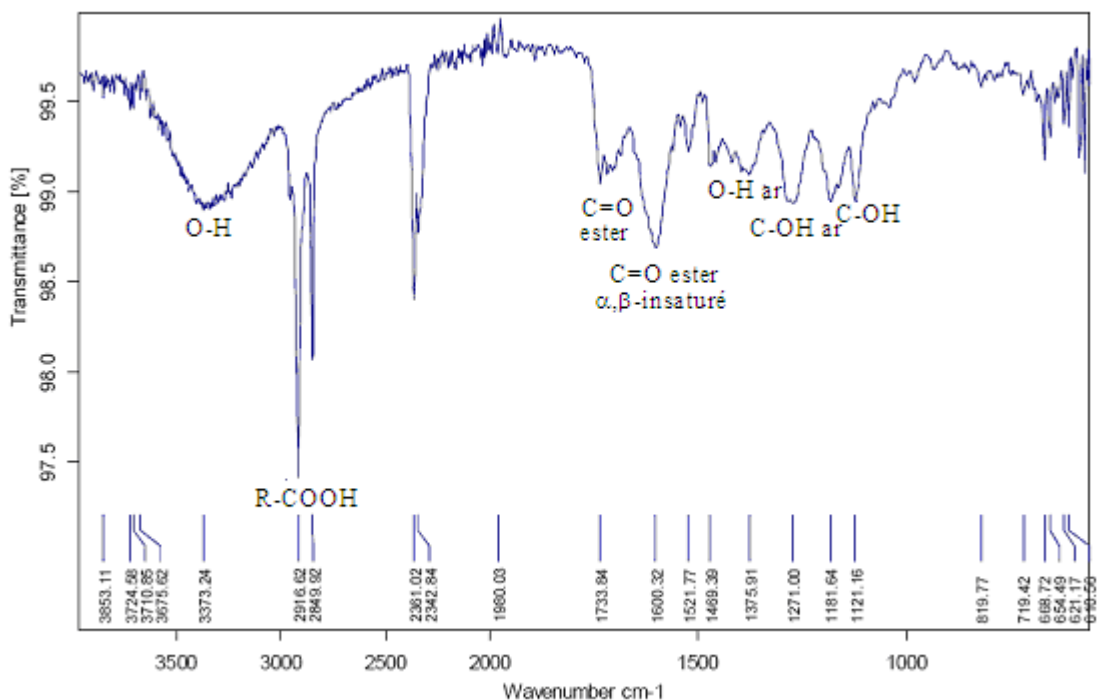
2.56e+006



Minimum: -1.5  
Maximum: 5.0 20.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
515.1169	515.1190	-2.1	-4.1	14.5	152.2	C25 H23 O12
	515.1131	3.8	7.4	23.5	19034.6	C32 H19 O7
	515.1096	7.3	14.2	1.5	61165.3	C14 H27 O20
	515.1248	-7.9	-15.3	5.5	25111.7	C18 H27 O17
	515.1072	9.7	18.8	32.5	70941.7	C39 H15 O2

## Spectre IR du composé 3



## Annexe 21

Spectres de masse ESI-MS, ESI-MS<sup>2</sup>, HRESI-MS et IR du composé pur 4 isolé

### Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

13:53:30

Acquisition Date 27/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Esprit\01\TI-176\09072703.d

Method ontr27.m

Operator jcas tro

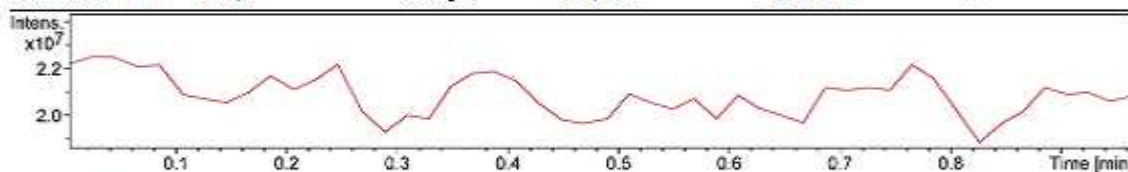
Sample Name Ntr27

Instrument esquire8000

Comment ESI- FullScan

**Acquisition Parameter**

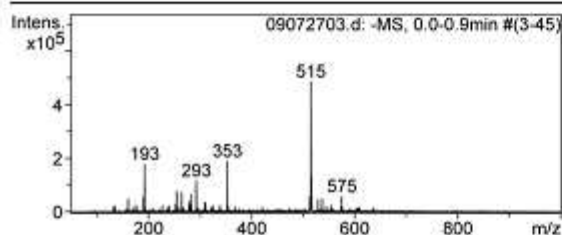
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-152.5 Volt	Skim 1	-28.9 Volt	Trap Drive	62.8
Accumulation Time	248 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



— TIC -All MS

#	RT [min]	Area
n.a.	0.5	n.a.

**-MS, 0.0-0.9min #(3-45)**



#	m/z	I
1	135	22183
2	161	47478
3	173	23502
4	191	54834
5	193	179012
6	227	23482
7	241	22873
8	253	26565
9	255	77574
10	265	72765
11	279	40426
12	281	24655
13	293	65530
14	293	116060
15	309	34939
16	311	31535
17	325	24378
18	339	23881
19	353	189609
20	354	30879
21	513	57943
22	514	37292
23	515	485737
24	516	134166
25	517	39201
26	529	45852
27	537	49105
28	555	24784
29	575	57915

## Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

13:52:03

Acquisition Date 27/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Settings\Temp\09072704.d

Method ntr27.m

Operator jcasiro

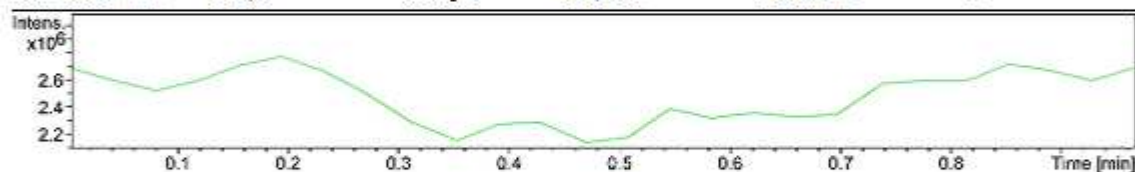
Sample Name Ntr27

Instrument esquire8000

Comment ESI-MS/MS, amplitud=0.4V

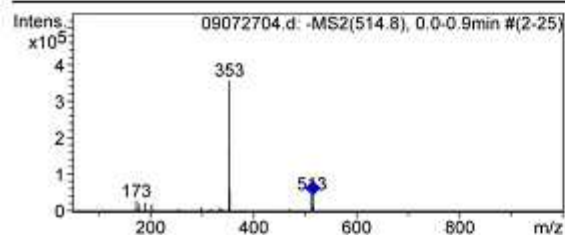
**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Ext.	-152.5 Volt	Skin 1	-28.9 Volt	Trap Drive	82.8
Accumulation Time	1827 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



TIC -All MSn

#	RT [min]	Area
n.a.	0.5	n.a.

**-MS2(514.8), 0.0-0.9min #(2-25)**


#	m/z	I
1	173	26709
2	179	19010
3	191	21732
4	203	17459
5	353	358816
6	354	57181
7	513	45875
8	514	9538
9	515	40442
10	516	10084

## Elemental Composition Report

### Single Mass Analysis

Tolerance = 20.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: O f

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

139 formula(e) evaluated with 4 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-200

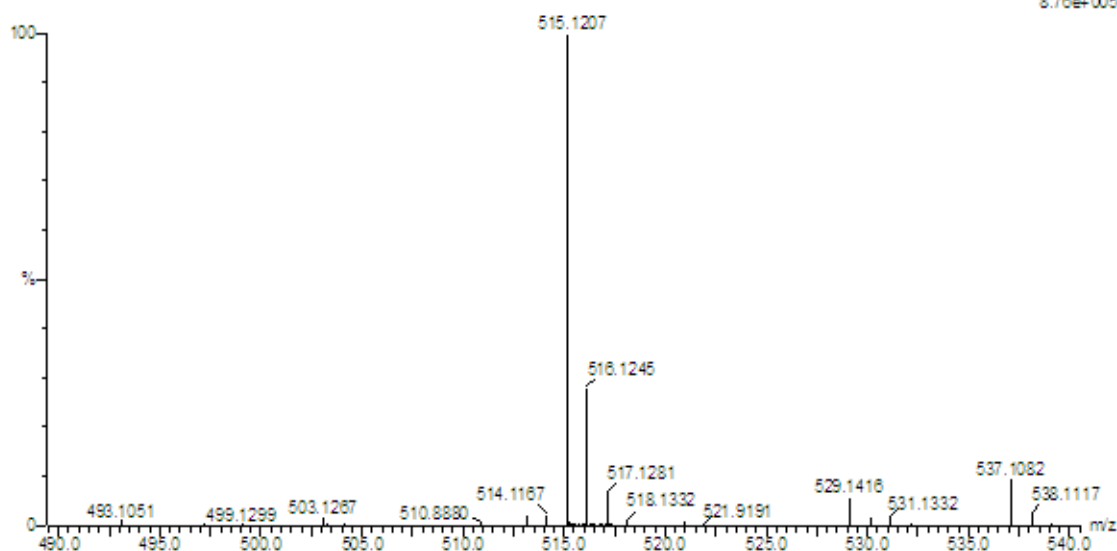
Nr27

Default  
09070203 55 (2.409) Cm (41.63)

Juan

1: TOF MS ES-

8.76e+005

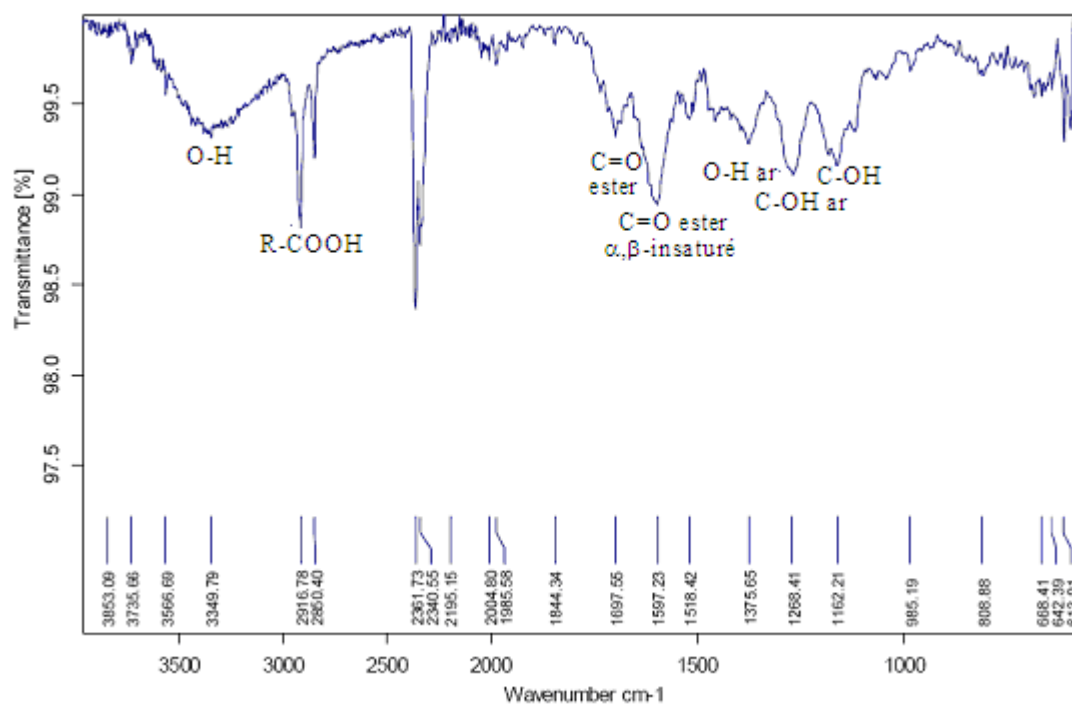


Minimum:

Maximum: 5.0 20.0 -1.5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
515.1207	515.1190	1.7	3.3	14.5	255.1	C25 H23 O12
	515.1248	-4.1	-8.0	5.5	7294.7	C18 H27 O17
	515.1283	-7.6	-14.8	27.5	16696.9	C36 H19 O4
	515.1131	7.6	14.8	23.5	7962.9	C32 H19 O7

### Spectre IR du composé 4



## Annexe 22

Spectres de masse ESI-MS, ESI-MS<sup>2</sup>, HRESI-MS et IR du composé pur 5 isolé

### Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

13:24:37

Acquisition Date 23/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Esprit\01\TI-176\09072203.d

Method ontr31.m

Operator jcas tro

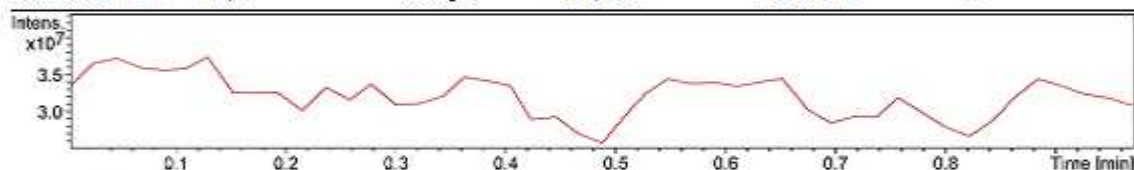
Sample Name Ntr31

Instrument esquire8000

Comment ESI- FullScan

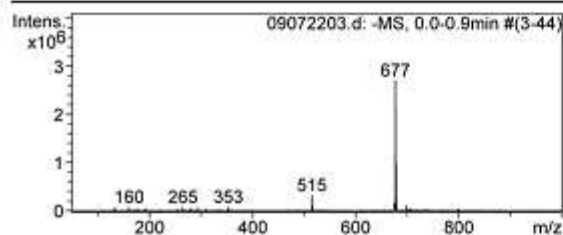
**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-197.5 Volt	Skim 1	-31.7 Volt	Trap Drive	70.2
Accumulation Time	32 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



TIC -All MS

#	RT [min]	Area
n.a.	0.5	n.a.

**-MS, 0.0-0.9min #(3-44)**


#	m/z	I
1	133	64505
2	160	73548
3	173	32841
4	179	40708
5	190	23585
6	193	44888
7	255	27654
8	256	73696
9	279	45597
10	293	58340
11	309	38293
12	335	30738
13	353	75816
14	487	28847
15	515	320970
16	516	112902
17	517	31341
18	537	24718
19	675	156429
20	676	69838
21	677	2700217
22	678	1004082
23	679	242908
24	680	50346
25	699	98878
26	700	51928
27	707	48535
28	735	28192
29	799	31414

# Compound Mass Spectrum List Report (stct)

**Analysis Info**

13:27:03

Acquisition Date 23/07/2009

Analysis Name C:\Documents and Settings\SuperUser\Local Esprit\09072204.d

Method ontr31.m

Operator jcas tro

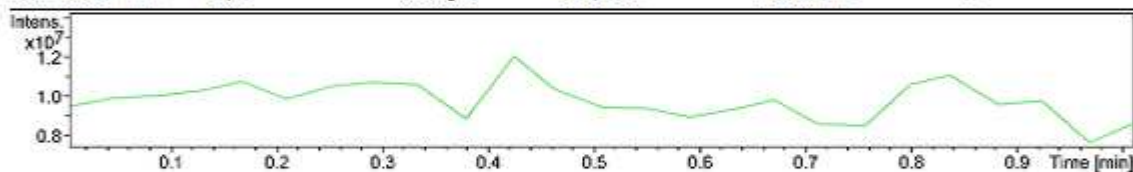
Sample Name Ntr31

Instrument esquire8000

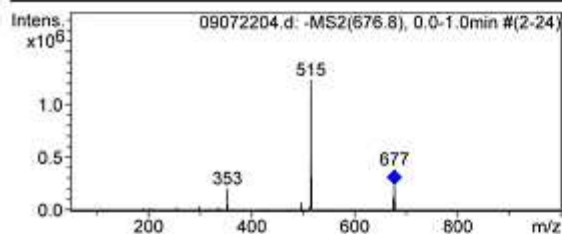
Comment ESI- MS/MS, Amplitud=0.5V

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	-197.5 Volt	Skim 1	-31.7 Volt	Trap Drive	70.2
Accumulation Time	78 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off



#	RT [min]	Area
n.a.	0.5	n.a.

**-MS2(676.8), 0.0-1.0min #(2-24)**


#	m/z	I
1	299	30475
2	353	200558
3	354	443339
4	497	68804
5	513	26811
6	515	1230988
7	516	312259
8	675	115686
9	677	233827
10	678	82236

## Elemental Composition Report

### Single Mass Analysis

Tolerance = 20.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

215 formula(e) evaluated with 9 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-200

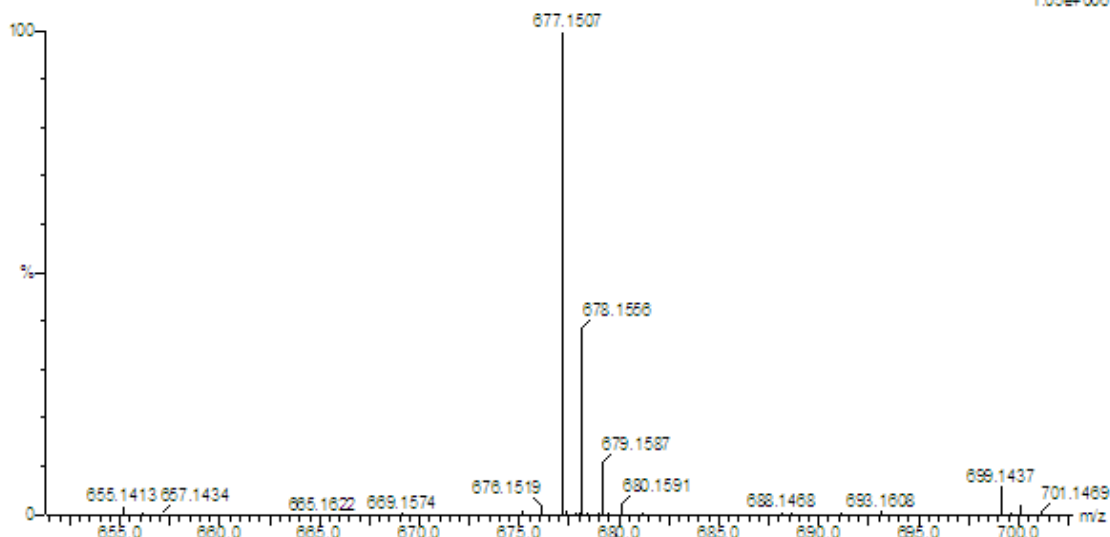
Nr31

Default  
09070208 43 (1.888) Cm(39.51)

Juan

1: TOF MS ES-

1.05e+006



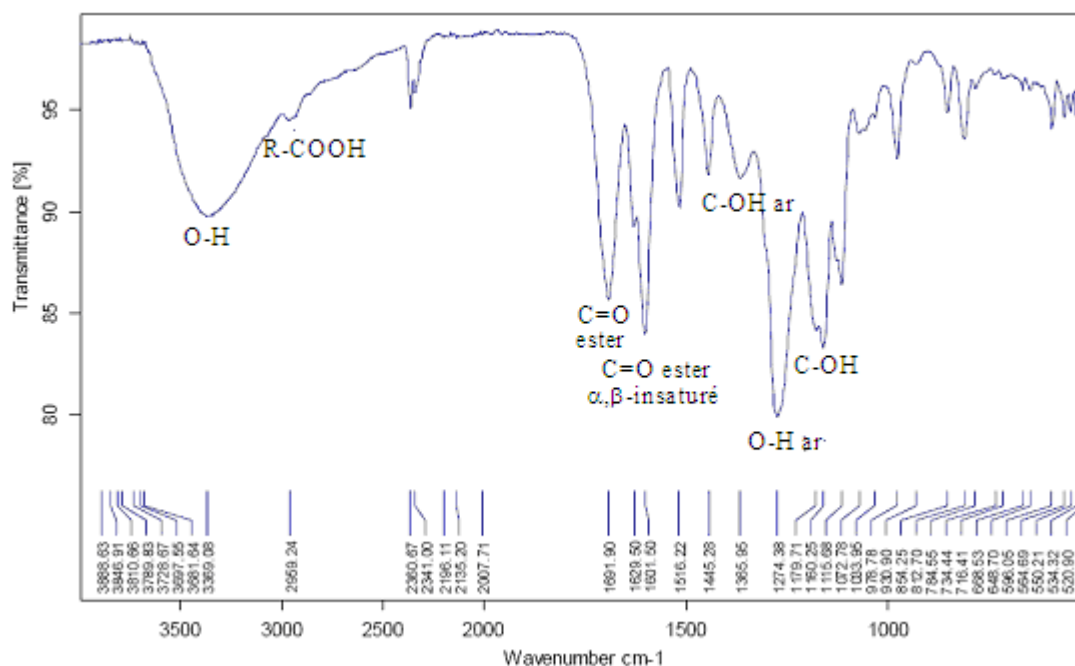
Minimum:

Maximum:

5.0 20.0 -1.5 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
677.1507	677.1506	0.1	0.1	20.5	68.0	C34 H29 O15
	677.1542	-3.5	-5.2	42.5	34233.3	C52 H21 O2
	677.1471	3.6	5.3	-1.5	48187.4	C16 H37 O2
	677.1565	-5.8	-8.6	11.5	6846.3	C27 H33 O20
	677.1448	5.9	8.7	29.5	6396.7	C41 H25 O10
	677.1600	-9.3	-13.7	33.5	14719.5	C45 H25 O7
	677.1413	9.4	13.9	7.5	17885.3	C23 H33 O23
	677.1624	-11.7	-17.3	2.5	29278.7	C20 H37 O25
	677.1389	11.8	17.4	38.5	23158.2	C48 H21 O5

## Spectre IR du composé 5



### Annexe 23

Valeurs des CE<sub>0</sub> (µg/mL) des composés isolés dans le test de l'inhibition du radical DPPH

Concentration efficace: CE <sub>50</sub> (µg/mL)							
Composé	Concentrations	[DPPH] <sub>15</sub>	%DPPH	Equations	R <sup>2</sup>	CE <sub>0</sub>	
1	3	4,498	97,783	y = -2.6281x + 105.99	0.9979	21,30	
	6	4,216	91,652				
	10	3,666	78,696				
	15	2,964	64,435				
	20	2,488	54,087				
	30	1,266	27,522				
	10	3	4,606	100,130	y = -2.0108x + 104.58	0.9961	27,14
		6	4,197	91,239			
		10	3,929	85,348			
		15	3,285	71,413			
		20	2,819	61,283			
		30	2,084	45,304			
	15	3	4,690	101,956	y = -2.0311x + 104.97	0.9920	27,06
		6	4,319	88,156			
		10	3,817	82,978			
15		3,391	73,717				
20		2,967	64,500				
30		2,066	44,913				
3	3	4,294	93,348	y = -3.3351x + 100.92	0.9972	15,27	
	6	3,629	78,891				
	10	3,044	66,174				
	15	2,682	52,304				
	20	1,527	33,196				
	30	0,068	1,478				
	6	3	4,278	93,000	y = -3.3527x + 99.978	0.9920	14,91
		6	3,614	78,565			
		10	2,792	60,696			
		15	1,814	39,435			
		20	1,201	29,109			
		30	0,204	1,435			
	10	3	4,061	88,283	y = -3.0210x + 88.360	0.9912	12,70
		6	3,342	72,652			
		10	2,388	55,913			
15		1,447	37,456				
20		0,420	22,13				
30		0,357	1,76				
4	3	4,121	89,587	y = -3.1673x + 93.168	0.9909	13,63	
	6	3,374	73,348				
	10	2,758	59,956				
	15	2,046	44,478				
	20	1,014	22,043				
	30	0,071	1,543				
	15	3	4,338	94,304	y = -3.2673x + 96.186	0.9904	14,14
		6	3,488	75,826			
		10	3,055	66,413			
		15	1,915	41,630			
		20	1,104	24,000			
		30	0,069	1,500			
	20	3	4,158	90,391	y = -3.2794x + 97.496	0.9904	14,48
		6	3,692	80,261			
		10	2,623	57,022			
15		2,182	47,435				
20		1,165	25,326				
30		0,095	2,065				

Valeurs des CE <sub>0</sub> (µg/mL) des composés isolés dans le test de l'inhibition du radical DPPH (suite)						
5	3	3,789	82,239	$y = -4.4421x + 93.742$	0.9935	9,85
	6	3,070	66,739			
	9	2,283	49,630			
	12	1,941	42,196			
	15	1,296	28,174			
	20	0,218	4,739			
	3	3,704	80,522	$y = -4.4188x + 93.925$	0.9924	9,94
	6	3,212	69,826			
	9	2,499	54,326			
	12	1,779	38,674			
	15	1,130	24,565			
	20	0,387	8,413			
	3	3,694	80,304	$y = -4.4503x + 94.850$	0.9924	10,08
	6	3,177	69,065			
	9	2,522	54,826			
	12	2,059	44,761			
	15	0,930	20,217			
	20	0,306	6,652			
2	15	4,665	98,607	$y = -0,2375x + 102,44$	0.9897	220,80
	50	4,351	94,587			
	100	3,504	76,174			
	200	2,103	55,717			
	500	0,244	5,304			