



University of Bejaia
Faculty of Technology
Laboratory of Organic Materials



OPEN ACCESS

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS



2014, Vol.2, N° 1 (E- ISSN: 2353-0391)

Editor in chief:
Prof. Kamel BELHAMEL

Editorial

Algerian Journal of Natural Products

www.ajnp.webs.com/
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Mission Statement:

The **Algerian Journal of Natural Products** publishes papers, in French and English languages, based on original research that are judged to make a novel and important contribution of all aspects of Plant and Natural Products.

Today, the **Algerian Journal of Natural Products** continues to be a standard-bearer for excellence in the fields of chemistry of the Natural Products, biochemistry and molecular biology.



Photo: *Solanum sisymbriifolium*

AJNP Editor-in-Chief Prof. Kamel Belhamel at the Laboratory of Organic Materials, University of Bejaia, says affinity groups make browsing the Journal's extensive collections of research articles, communications and reviews of scientific advances known as reflections more efficient, possibly fostering collaboration among the Journal's contributors. All content is reviewed by [top-scientists](#).

More about AJNP :

- Published quarterly, **Free of charge**
- Content published immediately upon acceptance and accessible online from the website of the Journal:
 - www.ajnp.webs.com
 - www.univ-bejaia.dz/ajnp
- Redacted articles free to all years after publication
- No page limits.
- Free color figures.
- Published by the non-profit [Laboratory of Organic Materials, University of Bejaia, Algeria.](#)
- To underline its commitment to the progress of science, the AJNP offers [teaching tools](#) for educating young scientists

Topics:

Our peer-review is very fast, highly rigorous and it takes just a few days and authors are carried along adequately in all the publication processes. Submission must be well researched, informed and demonstrate familiarity with the relevant literature, concept and theoretical perspective in the area of the study. Papers are solicited from, but not limited to the following topics:

- Chemistry of Bio-active compounds
- Phytochemistry (Isolation, Structure elucidation, Spectroscopic properties)
- Antimicrobial, antiviral, antiparasite activities
- Biopolymers, biocomposites
- Electrochemical process using natural products
- Separation process using natural products
- Pharmacology, toxicology of plant and their active principles
- Pharmaceutical formulations and evaluation of natural products
- Environmental impact and risk assessment

Editor in chief

Prof. Kamel BELHAMEL

Laboratory of Organic Materials,
Process Engineering Department,
Faculty of Technology,
University of Bejaia,
DZ-06000 Bejaia - ALGERIA

kamel.belhamel@univ-bejaia.dz
kamel.belhamel@yahoo.fr
ajnp2014@gmail.com

Tel./Fax : 00 213 34 21 51 05

Editorial board

- Prof. Boualem Saidani, University of Bejaia - Algeria
- Prof. Laid Makhloifi, University of Bejaia - Algeria
- Prof. Tahar Sadoun, University of Bejaia- Algeria
- Prof. Farouk Rezgui, University of Bejaia- Algeria
- Prof. Mohamed chérif ABERKANE, University of Batna-Algeria
- Prof. Ammar Dibi, University of Batna-Algeria
- Prof. YOUSFI Mohamed, University of Laghouat- Algeria
- Prof. Hocine Ilikti, USTO-Algeria
- Prof. Armando J. D. Silvestre, University of Aveiro- Portugal
- Prof. Antonia Pérez de los Ríos, Universidad de Murcia- Spain
- Prof. Francesco Jose HERNANDEZ FERNANDEZ, Universidad de Murcia- Spain
Prof. Salih S. AL-Juaid, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia
- Prof. Alessandro Casnati, University of Parma - Italy
- Prof. Emmanuel Rocca, University of Lorraine, France
- Prof. Azizi Omar, University of Setif- Algeria
- Prof. Rainer Ludwing, Freie Universität Berlin- Germany
- Prof. Yahia Harek, University of Tlemcen- Algeria
- Prof. Lahcen Larabi, University of Tlemcen- Algeria
- Prof. Larbi Zeroual, University of Setif- Algeria
- Prof. Abdelkrim Kahoul, University of Setif- Algeria
- Prof. Djaafar Benachour, University of Setif- Algeria
- Prof. Nacer-eddine Chelali, University of B.B.A-Algeria
- Prof. Khodir Madani, University of Bejaia- Algeria

Prospective author(s) should submit their complete manuscript to ajnp2014@gmail.com

For further assistance you can contact the editor in chief via e-mail: kamel.belhamel@univ-bejaia.dz

Best regards,
Editor in chief

Prof. Kamel BELHAMEL

Contents of this issue:

Volume 2, Number 1, (2014)

Antimicrobial and Antioxidant activities of various extracts of *Hyoscyamus albus* L. and *Umbilicus rupestris* L. leaves

Afaf BENHOUDA, Mouloud YAHIA, Djahida BENHOUDA, Nor Elhouda BOUSNANE, Souhila BENBIA, Nor Elhouda HANNACHI, Abdelmoudjib GHECHAM
Algerian J. Nat. Products, 2:1 (2014) 4-17

.....4-17

Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia

Nawel KHEYAR, Dahia MERIDJA, Kamel BELHAMEL
Algerian J. Nat. Products, 2:1 (2014) 18-26

.....18-26

Caractérisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae)

Meriem TOUAIBIA, Fatma Zohra CHAOUCH, Cherifa CHAOUIA , Hamida CHERIF
Algerian J. Nat. Products, 2:1 (2014) 27-34

.....27-34

OPEN ACCESS

Online ISSN: 2353-0391

Algerian Journal of Natural Products

www.ajnp.webs.com

Type of the Paper (Original paper)

Antimicrobial and Antioxidant activities of various extracts of *Hyoscyamus albus* L. and *Umbilicus rupestris* L. leaves

Afaf BENHOUDA *, Mouloud YAHIA, Djahida BENHOUDA, Nor Elhouda BOUSNANE, Souhila BENBIA, Nor Elhouda HANNACHI, Abdelmoudjib GHECHAM

Biotechnology's Laboratory of the Bioactive Molecules and the Cellular Physiopathology,
Department of Biology, University of BATNA, ALGERIA
afaf.benhouda@gmail.com

Received: 01-02-2014 / Revised: 21-02-2014 / Accepted: 25-02-2014

Abstract: Our objectives were to investigate the antioxidant activity by the means of two methods: the β -carotene bleaching method and DPPH assay as well as testing the antimicrobial activity by the Agar-gel diffusion method and the microdilution method with liquid medium of the extracts (EEp, EChl and EMeOH) of the leaves of *H. albus* and (EEp, EChl and EMeOH) of *U. rupestris*. The quantitative analysis are showed that the highest content of total phenolic was concentrated in the butanolic extract of *H. albus* with 111.1 ± 1.82 μg EAG/mg of extracts, in the second level the methanolic extract of *U. rupestris* with 105.7 ± 0.37 μg EAG/mg of extracts. The content of flavonoids was determined by specrophotometry and showed the presence of these compounds in the all extracts from the two plants.

In the β -carotene bleaching test, the EMeOH of *H. albus* displayed highest antioxidant activity (76.00 %) and the EMeOH extract with a radical-scavenging activity (72.97%). On the other hand, the quantitative evaluation of the antiradical activity towards DPPH showed that the EMeOH of *U. rupestris* is the most active ($IC_{50} = 35.33 \pm 0.136$ $\mu\text{g/ml}$) followed by the EMeOH ($IC_{50} = 75.19 \pm 0.211$ $\mu\text{g/ml}$) of *H. albus*.

All the polar extracts of the two plants reacted positively at least on one of the bacterial strains tested. These extracts showed different activities and the CMI were determined starting from the most active extracts in gelose medium, Extract EBut of *H. albus* testified to a strong antimicrobial activity followed by the EMe of *U. rupestris*. Results of the anticandidose activity showed the inefficiency of the all extracts against the yeast *Candida albicans*.

Keywords: *Hyoscyamus albus*, *Umbilicus rupestris*, polyphenols, Antioxidant activity, Antimicrobial Activity.

* Author for correspondence: Afaf BENHOUDA. E-mail: afaf.benhouda@gmail.com

I. INTRODUCTION

Nature has been a source of medicinal agents for thousands of years. Folk medicines of the almost civilizations of the world abound in herbal remedies. Majority of the traditional medicines used in healthcare are obtained from plants. In spite of several advancements in the field of synthetic chemistry drug and antibiotics, plants continue to be one of the major raw materials for drugs treating various ailments of humans. Clinical and pharmaceutical investigations have in fact elevated the status of medicinal plants by identifying the role of active principles present in them and elaborating on their mode of action in human and animal systems. *H.albus* is an annual and perennial plant of 20-50 cm, hairy-viscous with low poisonous odor; soft leaves, and even floral and oval-orbicular petal. In addition to hyoscine and hyoscyamine, a new compound starting insulated from leaves and stems of *H. albus* was characterized like 2,3-dimethylnonacosane by spectral studies [1]. They announced the production of sesquiterpene of the phytoalexine type in the roots of *H. albus* [2, 3,4]. *Umbilicus rupestris* (*Salisb.*) *Dandy* is a hardy perennial plant, belongs to the family of *Crassulaceae*. It presents at the level of rocks, cliffs and the old walls, on the coasts and in mountains; only in North Africa [5]. Leaves of this plant are used in traditional medicine against the ignitions of skin [6], wounds [7], like cataplasma, against burns [8] disinfectant, parasiticidal, healing [9]. Infused (leaves) of this plant is used like an ophthalmic disinfectant [10]. The goal of this study is to evaluate the antimicrobial activity by two methods, the diffusion in gelose medium and the microdilution in liquid medium of the rough extracts of *H.albus* and *U rupestris*. This evaluation is connected to the phenolic contents of these extracts.

II. MATERIAL AND METHODS

II.1. Plants Materials and extracts' preparation

Leaves of *H.albus* and *U.rupestris* were freshly collected in spring season from Batna, Algeria, in April 2012. The taxonomic identification of the plants was confirmed by Dr.Oudjhih, Department of Agronomy, University of Batna .Plants were dried 40 days in the shade under ambient temperature until total dehydration. Dried leaves parts were blended into fine powder and stored in the dark at a dry place. 1 Kg of powdered leaves was extracted with petroleum ether three times 5 L for each time. Then, the marc was dried and extracted with chloroform three times 5 L for each time and with methanol three times 5 L for each time and the supernatants were filtered sequentially using cloth filter, cotton wool, and Whatman filter paper. The solvents were then evaporated under reduced pressure (204 mbar) and controlled temperature (30°C) using a vacuum rotary evaporator (Buchi Rotavapor).

II. Preliminary phytochemical analysis

The different extracts were then subjected to preliminary phytochemical analysis to assess the presence of various phytoconstituents.

II.1. Determination of total phenolic compounds, total flavonoids and tannins

II.1.1. Determination of total phenolic compounds

Contents of polyphenols in the extracts are estimated and carried out according to the process describes by Marinova et al. [11]. The phenolic contents were given with the method

of Folin-Ciocalteu [12]. The extract diluted ten times was left; react with 1 ml of the reagent of Folin-Ciocalteu, and then the mixture was neutralized with Na_2CO_3 . The mixture was after incubated at ambient temperature during 90 min. Lastly, absorbance was measured with the spectrophotometer assistance at 750 nm. T with total polyphenols in our extracts, was calculated starting from a linear calibration curve ($y=ax+b$) established with precise concentrations of gallic acid (0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), like standard of reference, under the same conditions as the sample. The total phenolic contents were expressed in μg equivalent of gallic acid (GAE)/mg of sample.

II.1.2. Determination of total flavonoids compounds

The total flavonoids were estimated by using the method of Ordonez and *al.* [13]. 0,5 ml of ethanolic solution of AlCl_3 of 2% were added to 0,5 ml of each extract. After 1 H of incubation at ambient temperature, the absorbance is measured at 420 nm. The extract was evaluated with a final concentration of 0, 1 mg/ml. Content of flavonoids is expressed of microgram of equivalent of quercetin per milligram of extract ($\mu\text{g Eq AQ}/\text{mg}$) starting from the calibration curve established by quercetin (0-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

II.1.3. Determination of condensed tannins compounds

The proportioning of condensed tannins in extracts of *H.albus* and *U.rupestris* is carried out according to the method of Heimler *et al.* [14]. The principle of this proportioning is based on the aldehydic fixing of the vanillin grouping on carbon 6 of cycle A of the catechin to form a red chromophoric complex which absorbs at 500 nm (fig. 2) [15]. For 400 μl of each sample or standard, we add 3 ml of a vanillin solution (4% in methanol), and 1,5 ml of concentrated HCl. The mixture is incubated during 15 min and the absorbance is read with 500 nm. Concentrations of the condensed tannins are deduced starting from the ranges of calibration established with the catechin (0-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and are expressed in microgram of catechin equivalent per milligram of extract ($\mu\text{g ECT}/\text{mg}$).

II.2. Antioxidant activity

II.2.1. Evaluation of antioxidant activity by *Beta-carotene bleaching test*

The antioxidant capacity of each of the sample extracts was estimated by the β -carotene bleaching method following the procedure described by Velioglu *et al.* [16] with modifications. A mixture of 60 mg of β -carotene was dissolved in 20 ml of chloroform and mixed with 1,0 g of the linoleic acid and 20 ml of Tween® 60. Chloroform was eliminated by rotary evaporation at 40 °C. After evaporation, the mixture was immediately added to 25 ml of hydrogen peroxide to form an emulsion. 25 ml of this emulsion were transferred in tubes containing 1,0 ml from the extracts and the mixture was then mixed gently. 1 ml of the mixture was introduced with the pipette and mixed with 5 ml of ethanol with 95% at 0 °C. Absorbances were read at 450 nm all the 20 min throughout the 160 minute with a Spectrophotometer. The procedure above was made by using tocopherol as a standard (positive control). A negative control without extract was prepared. The relative antioxidant activity of extracts (AAR) is calculated according to the following equation:

$$\text{AAR\%} = [\text{Abs}_{160\text{h}}(\text{sample})/\text{Abs}_{160\text{h}}(\alpha\text{-tocophérol})] \times 100$$

II.2.2. Determination of antioxidant activity using the free radical scavenging activity (DPPH)

The method described by Tepe *et al.* [17] was used with slight modification, the different extracts and controls (α -tocopherol "antioxidants reference"). DPPH solution was prepared by dissolving 3 mg of DPPH in 100 ml of methanol. Samples and controls are added to 2 ml of DPPH solution after incubation for 30 min, absorbances were measured at 517 nm against the blank. The antioxidant activity is estimated using the following equation:

$$\% \text{ Antioxidant activity} = [(\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control}] \times 100$$

II.3. Antimicrobial activity

Germs tested to detect the antimicrobial activity of the extracts were three strains of reference: *S. aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Four clinical strains: *S.aureus*, *E coli* *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*. We used only one type of yeast, *Candida albicans*. They were all provided by the laboratory of Bacteriology from the university hospital center of BATNA.

II.3.1. Method of diffusion in medium gelose

Sterile filter paper discs of 9 mm of diameter, impregnated into 40 μ l of each test plant extract, were placed on the surface of the inoculated agar plates. Extracts were taken with Dimethyl sulfoxide (DMSO).The antimicrobial screening was carried out with different concentrations for each extract (1g/ml, 0.5g/ml, 0.25g/ml and 0.125g/ml). Controls soaked in DMSO were only performed. Petri dishes were incubated for 24 h at 37°C. Antimicrobial activity was determined by measuring the diameter of the inhibition's zone.

II.3.2. Determination of the MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

The MIC are determined by the standardized method of micro dilution in liquid medium [18]. The study is carried out into 96-well plate which contained a bubble Mueller- Hinton, with a bacterial inoculum of 5 UFC/ml. Samples' dilutions were distributed in cups from the strongest concentration (250 mg/ml) to the weakest one (1.95 mg/ml). Dilutions of extracts were carried out in the DMSO with 10%. Micro plaques are incubated 18h at 37°C. The MIC correspond to the first dilution where the growth is negative (not visible culture).

II.4. Statistical study

All tests were performed in duplicate or triplicate. Results are presented as mean \pm standard deviation of two or three independent determinations. All statistical analyses were carried out by Graphpad prism 5 using analysis of variance (ANOVA) and differences among the means were determined for significance at $p\leq 0.05$ using least significant.

III. Results and Discussion

III.1. Preliminary phytochemical analysis

The preliminary phytochemical investigations show the presence of various secondary metabolites (Table1).

Table 1. Results of preliminary phytochemical analysis of extracts from *H.albus* and *U.rupestris'* leaves

Plants	Extracts	Polyphenols	Flavonoids	Tannins	Terpenoids	Alcaloids
<i>H. albus</i>	EEp	++	+	-	+++	+++
	EChl	++	+	+	+++	+++
	EMeOH	++	++	+	+++	+++
<i>U.rupestris</i>	EEp	+++	++	++	+++	+
	EChl	++	++	+	+++	+
	EMeOH	+++	++	+	+++	+

+++ : high ; ++ : moderate ; + : mild ; - : absent

III.2. Total phenolic compounds, flavonoids content and tannins

Table 2. Total phenolic, flavonoid and condensed tannins in various extracts of *H.albus* and *U.rupestris'* leaves

Plants	Extracts	polyphenols ^(a)	flavonoids ^(b)	tannins ^(c)
<i>H. albus</i>	EEp	55.61 ± 1.32	14.12 ± 0.62	10.37 ± 0.55
	EChl	99.45 ± 2.75	18.23 ± 0.78	20.38 ± 0.69
	EMeOH	111.1 ± 1.82	24.31 ± 0.62	24.87 ± 1.57
<i>U. rupestris</i>	EEp	23.83 ± 0.21	6.77 ± 1.24	13.27 ± 0.69
	EChl	95.98 ± 0.33	20.72 ± 0.37	22.93 ± 0.07
	EMeOH	105.7 ± 0.37	29.56 ± 1.88	25.48 ± 0.70

(a) µg of gallic equivalent of acid gallic by mg of extract (µg EAG/mg of extract).

(b) µg of gallic equivalent of quercetin by mg of extract (µg EAG/mg of extract).

(c) µg of gallic equivalent of catechin by mg of extract (µg EAG/mg of extract)

They proved that the methanol and the ethanol are effective solvents to extract the antioxidant phenolic compounds [19]. The examination of these results makes possible to put a significant linear correlation between the content of flavonoids and the phenolic compounds ($R^2 = 0.9987$, $P \leq 0.05$), and between the content of tannins and phenolic compounds ($R^2 = 0.9898$, $P \leq 0.05$) in *H. albus'* extracts (fig. 1 and 2). And also to put a significant linear correlation between the content of flavonoids and phenolic compounds ($R^2 = 0.9606$, $P \leq 0.05$), and between the content of tannins and phenolic compounds ($R^2 = 0.9584$, $P \leq 0.05$) in *U. rupestris'* extracts (fig. 3 and 4). Several factors can influence the content of phenolic compounds, recent studies showed that

extrinsic factors (such as geographical and climatic factors), genetic factors, but also the degree of maturation of the plant and the storage period have a strong influence on the polyphenol contents .The concentration of flavonoids in the plants' extracts is according to the polarity of solvents used in the preparation of the extracts.

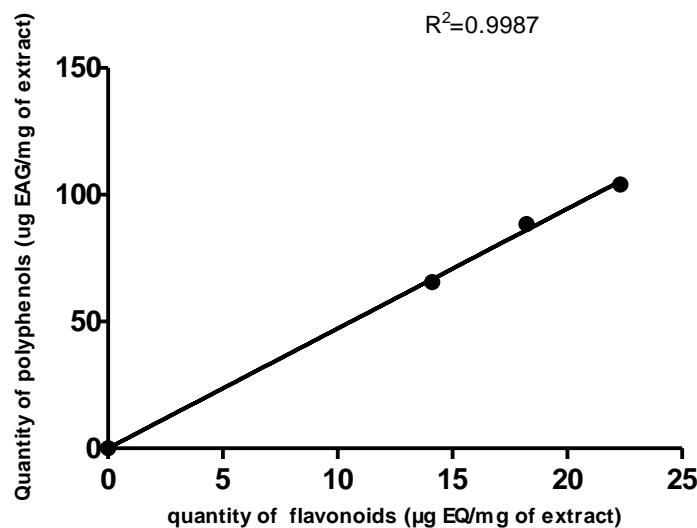


Figure 1. Linear correlation between the amount of the total polyphenols and amount of flavonoids of different extracts of leaves of *Hyoscyamus albus* ($p \leq 0,05$)

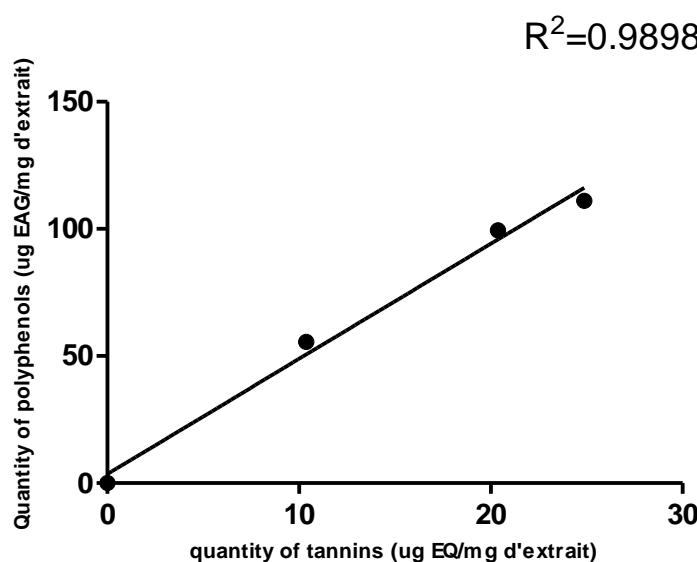


Figure 2. Linear correlation between the amount of total polyphenols and amount of tannins of different extracts of leaves of *Hyoscyamus albus* ($p \leq 0,05$)

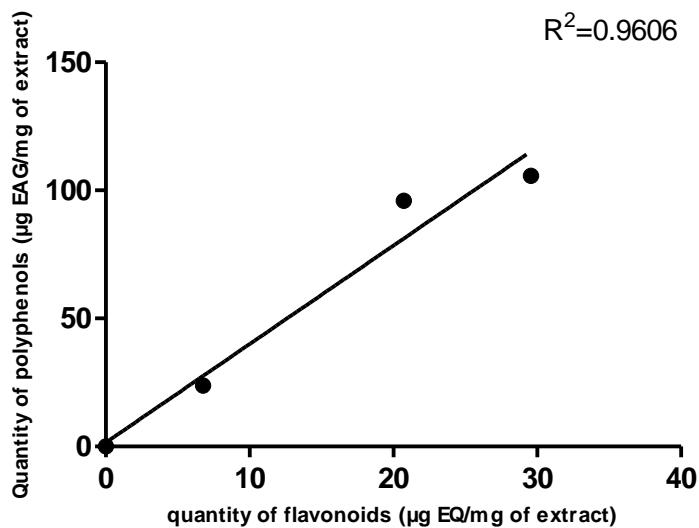


Figure 3. Linear correlation between the amount of total polyphenols and amount of flavonoids of different extracts of leaves of *U.rupestris* ($p \leq 0,05$)

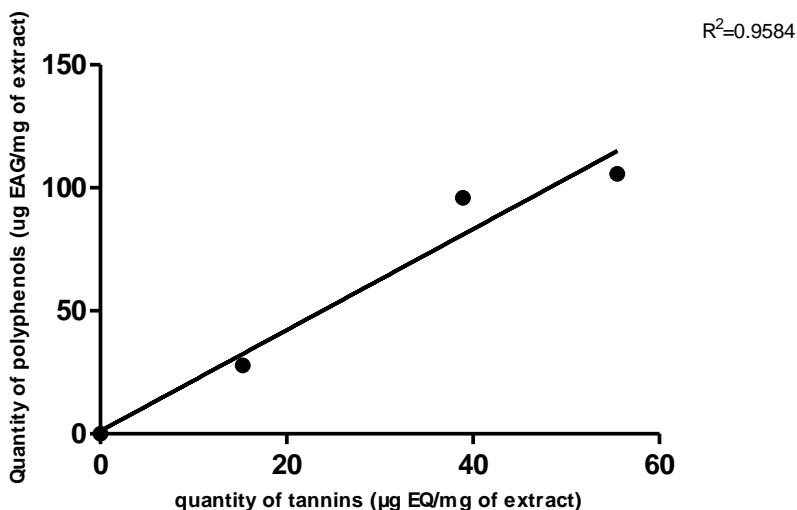


Figure 4. Linear correlation between the amount of the total polyphenols and amount tannins of different extracts of leaves of *U.rupestris* ($p \leq 0,05$)

III.3. Antioxidant activity

III.3.1. Antioxidant activity by beta-carotene bleaching test

In the system β -carotene / linoleic acid undergoes a fast discoloration in absence of an antioxidant. Free radicals of the linoleic acid formed during the production of an hydrogen atom from one of its methylene diallylic group, these free radicals attack highly the unsaturated β -carotene. Consequently, the β -carotene is oxidized and broken up partly; then it loses its characteristic of orange color, which is controlled by a spectrophotometer at 470 nm [20, 21]. In this test, the antioxidant capacity is given by measuring the inhibition of the hydroperoxides combined diene resulting from the linoleic oxidation of the acids. The β -carotene undergoes a fast discoloration in absence of an antioxidant; however the presence of an antioxidant is to minimize its oxidation. This test measures the potential of the plant to inhibit the hydroperoxide diene formation combined during the linoleic oxidation of the linoleic acids [22]. Table 3 brings back the average values of three

measurements of AAR% \pm SD. These values facilitate the comparison of relative activities of the various extracts, the positive control (α -tocopherol) and the negative control.

Table 3. Relative antioxidant activity of the rough extracts of *H.albus* and *U rupestris*' leaves and of the positive control.

Extracts and control	AAR %
EEp (<i>H.albus</i>)	33.78 \pm 1.28
EChl (<i>H.albus</i>)	43.24 \pm 0,92
EMeOH (<i>H.albus</i>)	76.00 \pm 0,92
EEp (<i>U. rupestris</i>)	63.51 \pm 1.28
EChl (<i>U. rupestris</i>)	24.32 \pm 0,92
EMeOH (<i>U. rupestris</i>)	72.97 \pm 0,92
α -tocopherol	100 \pm 0,00
Control (-)	8.10 \pm 1,28

Values are an average of three measurements \pm SD. Comparisons are carried out between the AAR% of the positive control (α - tocopherol) and of the rough extracts.

According to these results, it is clear that all the extracts tested of *H. albus* and *U.rupestris* inhibit in a highly significant manner ($P \leq 0, 0001$) oxidation coupled of linoleic acid and β - carotene compared to the negative control which represents 100 % of the peroxidation. For the extracts of the two plants, highest inhibition was provided by EMeOH of *H. albus* (76.00 %) followed by EMeOH of *U.rupestris* (72.97 %) without significant difference between these two extracts ($P \leq 0.05$). EEp showed an intermediate inhibiting activity (63.51 %) and either for EChl (43.24 %), and in the last, it is EChl which represents the lowest inhibiting value (24.32 %). The activity of *H. albus* and *U.rupestris*' extracts remain significantly lower ($P \leq 0, 05$), compared to the positive control (α - tocopherol).The antioxidant activity of polar extracts (EMeOH) could be explained by their wealth of polyphenolic substances. Many studies showed the antioxidant properties of the flavonoids and tannins [23]. Polar extracts are especially rich in chemical water-soluble substances, their antioxidant activity is shown by this method (BCB), it can be due especially to the presence of phenolic compounds present in these extract, which is confirmed by the notable and the significant observed linear correlation ($R^2=0.9999$, $p<0.05$) between their content of polyphenols and their antioxidant capacity.The antioxidant effect of the extract can also have a biological interest because it can prevent the oxidation of lipidic components in cellular membranes and consequently vegetable extract can appear beneficial for health [21].

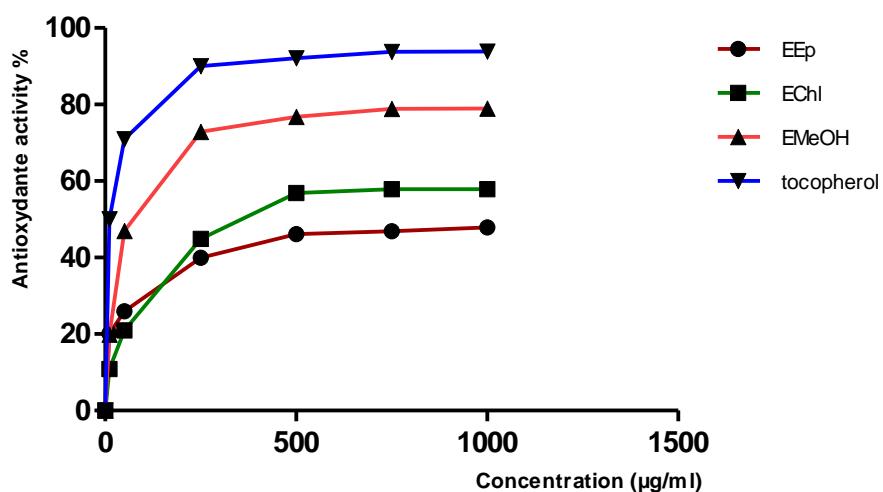
III.3.2. Antioxidant activity by DPPH method

The antioxidant activity of various extracts of *H. albus* and *U. rupestris*' leaves against DPPH radical was evaluated spectrophotometrically while following the reduction of this radical which is accompanied by its passage from the violet color to the yellow one at 515 nm. The IC₅₀ of various extracts of *H. albus* and *U rupestris*' leaves as well as the standard were illustrated in figures 1 and 2 respectively. Results are mentioned in table 4.

Table 4 . Antiradical activity of *H. albus* and *U .rupestris'* extracts

Extracts and standards	IC_{50} (μ g /ml)
EEp (<i>H. albus</i>)	-
EChl (<i>H. albus</i>)	330.19 ± 1.149
EBut (<i>H. albus</i>)	75.19 ± 0.211
EEp (<i>U. rupestris</i>)	610.34 ± 0.153
EChl (<i>U. rupestris</i>)	135.97 ± 0.584
EMeOH (<i>U. rupestris</i>)	35.33 ± 0.136
α -Tocopherol	15.08 ± 0.112

According to figures 5 and 6, we note that the extracts of *H. albus* and *U rupestris'* leaves, having an antiradical activity dependent amount the IC_{50} of each various extract, were determined. According to Kadri et al. [22], a lower value of the IC_{50} (concentration of the substrate which causes an inhibition of 50 % of the activity of DPPH) indicates a higher antioxidant activity. The antiradical activity of EEp of *H. albus*'s leaves could not be really quantified but with the maximum tested concentrations, it does not collect more than 40 % of the DPPH. The comparison of the extracts EMeOH (*Ur*) EMeOH (*Ha*) EEp (*Ur*) EChl (*Ur*) and EChl (*Ha*) reveals that EMeOH (*U.rupestris*) represents the most active extract with an IC_{50} of $35.33 \mu\text{g/ml}$ followed by EMeOH (*H.albus*) with an IC_{50} about $75.19 \mu\text{g/ml}$ while EEp represents the weakest antiradical activity ($IC_{50} = 610 \mu\text{g/ml}$). For comparison, we used α -tocopherol like a standard antioxidant; it showed an interesting antiradical activity with an IC_{50} about $15.08 \mu\text{g/ml}$. In comparison with α -tocopherol, the tested extracts prove less active.

**Figure 5.** Antiradical activity of extracts from *H.albus*'s leaves.

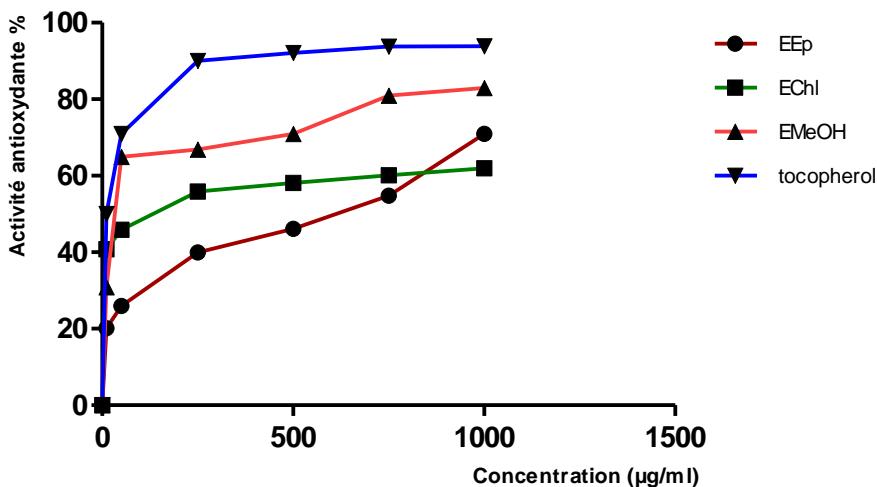


Figure 6. Antiradical activity of extracts from *U.rupestrис*'s leaves

Alghazeer *et al.* [24] showed that the methanolic extract of *H. albus*' leaves gives an IC_{50} of 60.4 ± 1.1 which is higher than what we noted in our study ($IC_{50} = 35.33 \pm 0.136 \mu\text{g/ml}$). Phenolic compounds show the good candidates for their antioxidant activities. It suggested that the polar molecules present in the vegetable extracts contribute to the increase in the antiradical activity [25]. The presence of many hydroxyls, being able to react with the free radicals [26]. The antiradical activity of the extracts EMeOH is probably related to their contents out of polyphenols, flavonoids and tannins.

III.4. Antimicrobial activity

III.4.1. Method of diffusion in solid medium

The polar extracts EMeOH of *H.albus* and *U rupestris* respectively showed an antimicrobial activity with all the microbial strains except the yeast *Candida albicans*.It appears that *S. aureus* Gram + is the most likely bacterium by comparison with the other Gram strains; this can be allotted to the difference of the structure between the bacteria Gram+ and the bacteria Gram - [27]. Our plants is very rich in alkaloids, it is for this reason, this antibacterial activity can be due to the synergistic action of polyphenols and alkaloids.They revealed that certain chemical components like tannins, flavonoids, alkaloids are used as defense's mechanisms of many micro-organisms and the antibacterial activity of the flavonoids is probably due to their capacity to be complexed with extracellular proteins of the bacterial cellular wall [28]. The antimicrobial activity of the phenolic compounds present in the plants vary according to its structure for example flavone, quercetin and naringenine are effective to inhibit the growth of *Aspergillus niger* *E coli* *P. aeruginosa* *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* while the gallic acid can inhibit only *P. aeruginosa* [29] (Fig.7).

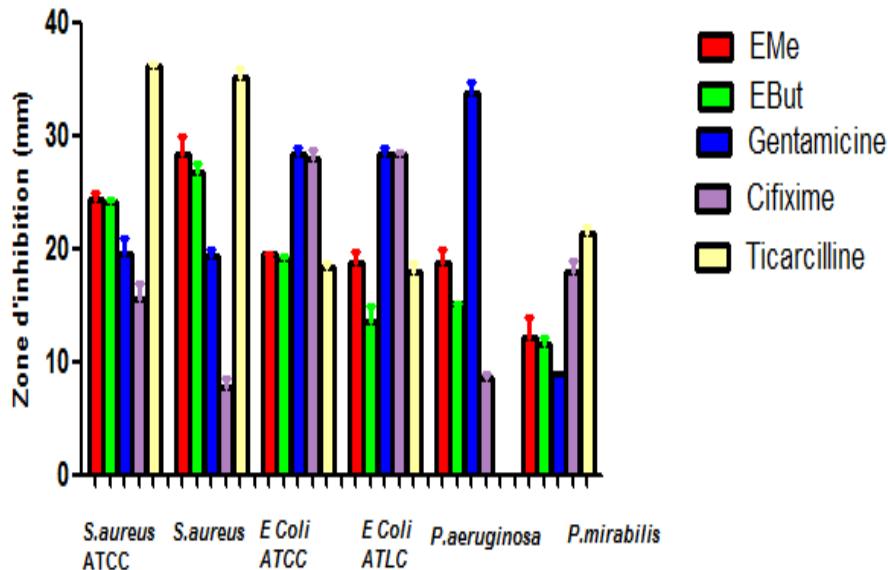


Figure 7. *In vitro* Antimicrobial activity of MeOH extracts from of *H. albus* and *U. rupestris* respectively expressed in diameters of the inhibition's zones (mm).

III.4.2. Method of microdilution in liquid medium

We report in figure 8 the minimum inhibitory concentrations (MIC) of our most active extracts noted at the time of the study in solid medium, whose diameters of inhibition are ≥ 12 mm. The MIC is inversely proportional to the diameter of the zone of inhibition, obtained with the method of the discs in solid medium.

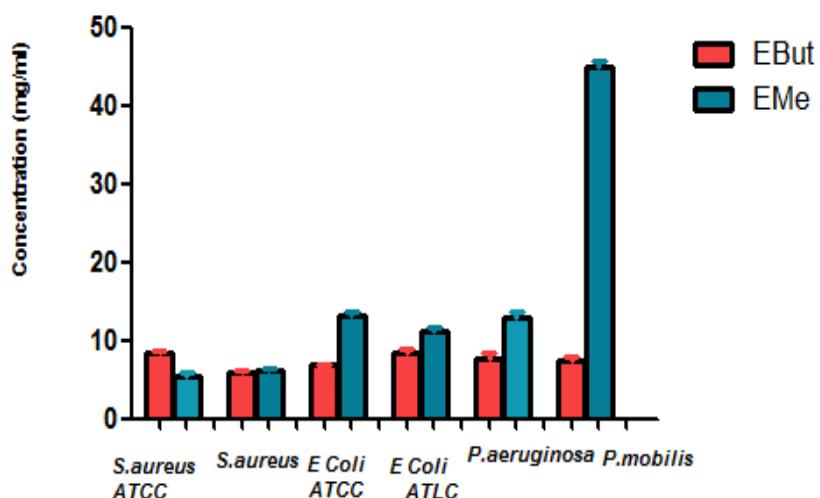


Figure 8. *In vitro* antimicrobial activity of methanolic extracts of *H. albus* and *U. rupestris* respectively, plants tested expressed in minimum inhibitory concentration (MIC) (mg /ml) against the bacteria tested.

These results show that the butanolic extract of *H. albus* has an effect on all the following bacterial strains *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus*, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* with values of MIC respectively: 8.30 mg/ml, 6.00 mg/ml, 6.93 mg/ml, 8.32 mg/ml, 7.63 mg/ml, 7.53 mg/ml with the same effect without significant difference ($P \geq 0.05$). The EMe of *U. rupestris* have an effect on all the following bacterial strains *S. aureus* ATCC 25923 *S. aureus* *E. coli* ATCC 25922 *E. coli* *P. aeruginosa* ATCC 27853 *P. mirabilis* with values of MIC respectively:

5.43 mg/ml, 6.18 mg / ml respectively without significant difference $P \geq 0.05$) while the latter remain significantly lower than the MIC of the bacteria *E. coli* ATCC 5922 , *E. coli*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 *P. mirabilis* (bacteria with Gram -) this returns to the difference between the plasmic membrane. The demonstration of the antibacterial activity against the bacteria Gram + and Gram - can be the sign of the presence of an active ingredient with broad spectrum and that will be an immense advantage in the fight of pathogenic which are so frequent lately [30]. Alghazeer et al. [24] showed that the methanolic extract of *H. albus* has a lower value of MIC (0,156 mg/ml) on the Gram + strains (*B. subtilis* and *S. aureus*, this value is inferior that what we found. They also proved that the alcaloidic extract of *H. albus* showed a remarkable activity on *S. aureus* *E. coli* and *S. typhi* with values of CMI 0,156, 0,313 and 0,313 mg / ml respectively. It is extremely probable that the toxicity of this plants is mainly related to the high concentration of alkaloids in their extracts [24]. They revealed that alcaloidic extracts of *H. albus* are effective against mushrooms in particular of *Trichoderma spp*, *Sclerotium spp*, *Aspergillus niger* and still present an antiviral activity [31]. The method of diffusion starting from the wells of gelose is advantaged to study the activity of the aqueous and organic extracts than the method of diffusion in gelose directly [32].

IV. CONCLUSION

Aptitude of our rough extracts to inhibit *in vitro* the peroxidation of the lipids was evaluated by the test of bleaching of the β -carotene, usually employed to consider the antioxidant activity of the substances in the emulsions. The antioxidant activity expressed like values of AAR% decreased in the order α -tocopherol \geq EMeOH (*H. albus*) \geq EMeOH (*U. rupestris*) \geq EEp (*U. rupestris*) \geq EChl (*H. albus*) \geq EEp (*H. albus*) \geq EChl (*U. rupestris*) and with method of reduction of free radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH),the polar extracts of the two plants EMeOH of *H. albus* and *U. rupestris* respectively have strong capacities of neutralization of free radical DPPH ($IC_{50} = 75.19 \pm 0.211 \mu g / ml$ et $IC_{50} = 35.33 \pm 0.136 \mu g / ml$) respectively. The extracts EMeOH of *H. albus* and *U. rupestris* respectively testified a strong activity with respect to the bacteria tested, but they did not show any activity on the yeast *Candida albicans*. Our preliminary results show that all the polar extracts of the two plants tested have antimicrobial activities *in vitro*.

V. REFERENCES

- [1] Mahmood, U., Yogendra, S., Raghunath, S., Thakur, R., 2, 3-dimethyl onacosane and tropane alkaloids from *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry*; 24:7(2011) 618-619.
- [2] Uchida, K., Kuroyanagi, M., Ueno, A., *Plant Tissue Culture Lett.*, 10(1993) 223-228.
- [3] Kuroyanagi, M., Arakawa, T., Mikami, Y., Yoshida, K., Kawahara, N., Hayashi, T., Ishimaru, H., *Nat. Prod.* 61(1998) 1516-1519.
- [4] Kawauchi, M., Arima, T., Shirota, O., Sekita, S., Nakane, T., Takase, Y., Kuroyanagi, M., Production of Sesquiterpene-Type Phytoalexins by Hairy Roots of *Hyoscyamus albus* Co-treated with Copper Sulfate and Methyl Jasmonate. *Chem. Pharm. Bull.* 58: 7(2010) 934-933.
- [5] Gonzalez-Tejero, R. M., Casares-Porcel, M., Sanchez-Rojas, P. C., Ramiro-Gutierrez, M. J., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, E.M., Censori, E., De Pasquale, C., Della, A., Paraskeva, Hadjichambis, D., Hadjichambis, A., Houmani, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., ElJohrig, S., Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology* 1:1 6 (2008) 341-357.
- [6] Pieroni, A., Quave, L. C., Santoro, F. R., Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, in land southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 95 (2004) 373-384.
- [7] Gonzlez, A.J., Garca-Barriusob, M., Amichb, F., Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*. 131(2010) 343-355.

- [8] Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, À. M., Vallès, J., An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serrade São Mamed " (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 89 (2003) 199-209.
- [9] Bonet, A.M., Valles, J., Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110(2007)130-147.
- [10] Bonet, A. M., Parada, M., Selga A., Valles, J., Studies o n pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Emporda and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 68 (1999)145-168.
- [11] Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M., Total ph en olics and total flav o n oids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40:3 (2005) 255-260.
- [12] Singleton VL., Ortfer R., Lamela RM., Analyse of total phenols and other oxidation substrate and antioxydants by mean of Folin Ciocalteu reagent. *Academic press*, 5 (1999) 152-178.
- [13] Ordoñez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A., Isla, M.I., Antioxidant activities *Sechium dule* (Jacq.) Swart extracts. *Food Chem.* 97 (2006) 452- 458.
- [14] Heimler, D., Vignolini, P., Giulia, Dini, M., Francesco, Vincieri, F., Rmani, A., Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties .*Food Chemistry*, 99(2006)464-469.
- [15] Schofield, P., Mbugua, D-M., Pell A N., Analyses of condensedtannins: a review. *Animal Food and Technology*, 91(2001) 21-4 0.
- [16] Velioglu, Y. S., Mazza, G. and Oomah, B. D.. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 4113-4117.
- [17] Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90 (2005) 333-340.
- [18] Dramane, S., Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire .*European Journal of Scientific Research*, 40 :2 (2010) 307-317.
- [19] Esmaeili, M.A. and Sonboli, A., Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachy antha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2010)846-853.
- [20] Rufino, M.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Jiménez, J.P., Calixto, F.S., Filho, J.M., Bioactive compounds and anti oxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 10 (2010) 996-1002.
- [21] Baghiani, A., Boumerfeg, S., Belkhiri, F., Khennouf, S., Charef, N., Harzallah, D., Arrar, L., Abdel-Wahhab, A., Antioxidant and radical sca v en gin g properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae*, 1:2 (2010) 128-136.
- [22] Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., Gdoura, R., Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10:19 (2011) 3908-3914.
- [23] Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, pp. 575.
- [24] Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A., Hebail F., Antioxidant and anti microbial properties of five medicinal libyan plants extracts. *Natural science*, 4:5 (2012) 325-333.
- [25] Yang C., Chang F., Chang H., Wang M., Chuang M., investigation of the antioxidant activity of *Illiciumve rum* extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6:2 (2012) 314-324.
- [26] Roudsari, M., Chang, P., Pegg, R., Robert, T., Antioxidant capacity of bioactives extracted from canolameal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chemistry*, 114(2009)717- 726.
- [27] Masika, P., Afolayane, A., Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of live stock diseases in Eastern Cape, South Afr. *J. Ethnopharmacology*, 83(2002)129-1 34.
- [28] Doss, A., Vijayasanthi, M., Parivuguna, V., Venkataswamy, R., Antimicrobial effects of the Flavonoid fractions of *Mimosa pudica* L. Leaves. *J Pharmacy Res.*, 4:5(2011)143 8-1439.
- [29] Vijayasanthi, M., Kannan, V., Venkataswamy, R., Doss A., Evaluation of the Antibacterial Potential of various solvent extracts of *Acacia nilotica* linn. Leaves *Hyeia. J. D. Med.*, 4:1 (2012) 91-96.
- [30] Doughari, J., Antimi crobial Activity of *Tamarindu sindica* Linn; *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5:2 (2006) 597-603.

- [31] Dawidar, A., Abdel-Mogib, M., El-Ghorab, A., and Hussien, K., Chemical composition and effect of photo oxygenation on biological activities of Egyptian commercial spearmint and dill essential oils. *Mansoura Journal of Chemistry*, 36 (2009) 49-60.
- [32] Bousselsela, H., Benhouda, A., Yahia, M., Benbia, S., Ghecham, A., Zidani, A., *In vitro* evaluation of antioxidant and antibacterial activities of extracts of *Hertia cheirifolia*'s leaves. *Natural Science*, 4:11 (2012) 826-831.

Please cite this Article as:

BENHOUDA, A., YAHIA, M., BENHOUDA, D., BOUSNANE, N.E., BENBIA, S., HANNACHI, N.E., GHECHAM, A., Antimicrobial and Antioxidant activities of various extracts of *Hyoscyamus albus* L. and *Umbilicus rupestris* L. leaves, *Algerian J. Nat. Products*, 2:1 (2014) 4-17

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

Editor in chief: Prof. Kamel BELHAMEL

OPEN ACCESS

Online ISSN: 2353-0391

Algerian Journal of Natural Products

www.ajnp.webs.com

Type of the Paper (Original paper)

Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia

Nawel Kheyar¹, Dahia Meridja², Kamel Belhamel²

¹Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Bejaia,

²Laboratoire des Matériaux Organiques, Faculté de Technologie, Université de Bejaia,
e-mail : kamel.belhamel@yahoo.fr

Received: 13-12-2013 / Revised: 18/02/2014/Accepted: 26/02/2014

Résumé : Dans cette étude, l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* a été évaluée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose contre des souches de référence et multirésistante : il s'agit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) et *Listeria innocua* (CLIP 74915). *Pseudomonas aeruginosa* a été l'espèce la plus résistante, cependant, *Staphylococcus aureus* s'est montrée la plus sensible aux huiles testées. Les résultats de l'analyse chimique de la composition de l'huile *Inula viscosa* par chromatographie en phase gazeuse indiquent la richesse de cette dernière en thymol (6,93%) and carvacrol (2,27%), ce qui pourrait être à l'origine des résultats observés.

Mots clés : Huiles essentielles, *Inula viscosa*, *Salvia officinalis*, *Laurus nobilis*, activité antibactérienne, chromatographie en phase gazeuse

I. Introduction

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. En effet, durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. Les bactéries en sont devenues de plus en plus résistantes [1,2].

L'usage généralisé des antibiotiques et la prescription à grande échelle parfois inappropriée de ces agents ont entraîné la forte adaptabilité des souches bactériennes et la sélection des souches multi-résistantes [3]. En effet, les processus de résistance bactérienne aux antibiotiques peuvent être groupés en trois grands mécanismes : modification de l'antibiotique, modification de la cible et de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (défaut d'accumulation) [4].

Face aux limites thérapeutiques, des antibiotiques classiques ont poussé les scientifiques à orienter les recherches vers des nouvelles voies et surtout l'utilisation des principes actifs des plantes (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles...) comme agents antibactériens.

L'activité antibactérienne d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) ou ceux susceptibles d'être actifs. Mais, il est probable

que cette activité dépende aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique [5,6].

Les molécules réputées d'être actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité. Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), des alcools, des aldéhydes et des cétones [7,8].

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartiennent à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques [9]. Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Parmi celles-ci, *Inula viscosa* L., *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L., sujet de cet article, ont été choisies pour leurs vertus thérapeutiques dans le but d'évaluer *in vitro* leur puissance inhibitrice vis-à-vis cinq souches pathogènes et multi-résistances.

II. Matériels et méthodes

II.1. Echantillonnage

Les feuilles des trois plantes ont été récoltées dans plusieurs régions Algérienne. L'échantillonnage a été fait dans une région propre, loin de tout impact de pollution et après la disparition de la rosée du matin, aux dates, altitudes indiquées dans le tableau 1.

Après la récolte, les plantes ont été identifiées au laboratoire de physiologie végétale et d'écologie en utilisant la flore d'Algérie de Quezel et Santa (1963) [26].

Tableau 1: Caractéristiques des conditions de récoltes

Nom scientifique	Altitude (m)	Dates de récolte
<i>Inula viscosa</i> L.	1	Août
<i>Salvia officinalis</i> L.	685	Juillet
<i>Laurus nobilis</i> L.	90	Début de septembre

II.2. Extraction

L'extraction des huiles essentielles est effectuée par hydrodistillation par un appareil de type Clevenger,

Une quantité de 150 g de matière végétale est transvasée dans un ballon de deux litres auquel un volume de 1500 ml d'eau distillée est ajouté et l'hydrodistillation se fait pendant trois heures. L'eau est portée à ébullition, la vapeur d'eau entraîne les molécules volatiles qui se condensent dans un réfrigérant et le mélange eau-huile est recueilli dans un ballon de 250 ml. La décantation se fait dans une ampoule à décanter d'un litre dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles par la différence de leur densité. Une phase aqueuse (inférieure) et une phase huileuse (supérieure). Les huiles essentielles ainsi récupérées sont traitées avec quelques cristaux de sulfates de magnésium anhydre afin d'éliminer l'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique. Elles sont conservées au réfrigérateur à 4°C dans des flacons sombres à l'abri de la lumière et de la chaleur. Trois distillations sont réalisées pour chaque échantillon.

II.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les composants des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Laurus nobilis* et *Salvia officinalis*, ont été identifiés par GC (*gas chromatograph*) et calculés par rapport aux temps de rétention d'étalons purs d'huiles essentielles (Sigma). (Les résultats de cette partie seront publiés ultérieurement.)

II.3. Les souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes sur lesquelles nous avons testé l'activité des huiles essentielles, sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection), ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène et leur résistance naturelle aux antibiotiques. Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 heures à l'obscurité à 37°C.

Il s'agit d'une souche de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) et *Listeria innocua* (CLIP 74915). Ces souches proviennent du laboratoire de Microbiologie Appliquée (L.M.A) de l'université Algérienne.

II.4. Test du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle. Cette méthode a l'avantage d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, et de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes [27].

La méthode utilisée dans cette étude pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, est celle faite par plusieurs auteurs (De Billerbek, 2007 ; Nedorostova et al., 2008; Matyar et al., 2008 ; Thi Dung et al., 2008).

Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures est préparée dans l'eau physiologique stérile et ajustée jusqu'à l'obtention d'un inoculum de 10^7 UFC/ml. Une série de dilutions (1/1, 1/2, 1/4 et 1/8) de l'huile dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée. 1 ml de l'inoculum préparé à partir de chaque souche est uniformément bien étalé à la surface de la gélose de Mueller-Hinton (MH). Des disques de papier Waltman n°1 stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur la gélose et chaque disque est imprégné d'une quantité de 5 µl de l'huile essentielle à différentes concentrations. Les disques imprégnés de 5 µl de DMSO sont utilisés comme témoins. Chaque test est répété trois fois et une boîte témoin est ensemencée dans les mêmes conditions de l'expérience mais sans disques, qui renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien. La lecture se fait après 18 à 24 h d'incubation à 37°C [14,19,2,28].

II.5 Antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme des germes utilisés et le comparer avec l'effet des huiles essentielles. Les disques d'antibiotiques utilisés sont répertoriés dans le tableau 3.

La méthode de diffusion ou antibiogramme standard sont les plus utilisés en bactériologie médicale, appelée encore méthode des disques. Cette technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des antibiotiques à tester, déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencés avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires qui correspondent à une absence de culture [29].

III. Résultats et discussion

La méthode d'extraction est une opération importante qu'il faut mener avec soin. Par ailleurs, la collecte, le séchage, et le stockage -tributaires à l'extraction- influencent largement sur le rendement ainsi que la qualité organoleptique des huiles essentielles [10]. Le rendement en huile essentielle varie beaucoup ($P<0.05$) avec la plante utilisée. Le

rendement le plus élevé est obtenu chez *S. officinalis* (1,12%) suivi par *L.nobilis* (0,88%), un faible rendement a été obtenu pour l'*I. viscosa* (0,22%). Il est à retenir que la variation du rendement d'extraction pourrait être attribuée à l'origine géographique de la plante, à la technique d'extraction, aux facteurs climatiques, mais également à la période de cueillette de la matière végétale et la partie de la plante étudiée [11].

Les composés rencontrés dans les plantes médicinales sont nombreux et différent par leurs structures et leurs propriétés. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, peuvent comporter plus de soixante composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 85% de l'huile, tandis que d'autres composants sont présents seulement comme trace [5,12].

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les monoterpènes oxygénés sont les constituants principaux de l'huile essentielle d'*I.viscosa*, et les composés majoritaires sont le thymol (6,93%) l'iso-Dihydrocarveol (5,04%) et carvacrol (2,27%). En revanche, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* sont deux espèces très riches aussi en monoterpènes, notamment le 1,8 cinéole, α-pinéne, *p*-cimene. Le carvacrol et thymol sont deux composés phénoliques, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. En effet, les huiles essentielles possèdent ces composés phénoliques, sont hautement actifs contre les bactéries en débit de leur hydrophobicité [7,13,14,15]. Dorman et Deans (2000) ont testé un grand nombre de composés purs sur 25 genres de bactéries et ils ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne, suivi du carvacrol et de l'α-terpinéol [7].

III.1. Antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de six antibiotiques par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats de l'antibiogramme (diamètre de la zone d'inhibition en mm Le diamètre des disques est pris en considération, -/- : Non testé, R: Bactérie est résistante).

ATB Souches \	OFX (5 µg)	E (10 UI)	PG (6 µg)	AMP (10 µg)	C (30 µg)	G (15 µg)
<i>E. coli</i>	-/-	6±00 ^R	-/-	7±1,24 ^R	23±0,8	-/-
<i>K. pneumoniae</i>	29±0,98	19±0,4 ^R	6±0,2 ^R	-/-	25±0,25	-/-
<i>L. innocua</i>	31±0,57	11±1,69 ^R	6±00 ^R	-/-	-/-	29±0,86
<i>S. aureus</i>	22,5±0,67	-/-	8±1,8 ^R	6±00 ^R	18±0,9 ^R	-/-
<i>P. aeruginosa</i>	21,5±0,14 ^R	-/-	6±0,25 ^R	-/-	-/-	12±2,23 ^R

Le tableau 2 montre que les différents antibiotiques possèdent un effet presque similaire sur les bactéries. Cet effet est bien inférieur à celui de l'huile essentielle. Il est évident de conclure que la plupart des souches bactériennes utilisées dans cette étude présentent des phénomènes de résistances aux antibiotiques.

III.2. Pouvoir antibactérien des huiles essentielles

Les résultats des tests d'inhibition de l'activité microbienne sont illustrés dans le tableau 3. Les valeurs indiquées sont la moyenne de trois essais. L'analyse statistiques des résultats est effectuées avec l'application « ANOVA » à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5,5 et le seuil de significativité est fixé à $P < 0,05$. Nous avons comparé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de trois plantes à différentes concentration. EN effet, la variation de l'activité antibactérienne en termes de diamètres d'inhibition est en fonction de type et de la concentration des huiles essentielles étudiées et en fonction de la souche bactérienne.

III.3. Activité des huiles essentielles sur *Escherichia coli*

Les résultats obtenus indiquent que toutes les huiles ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis d'*E. coli*. Des zones d'inhibition allant de 06 mm à 31,5 mm sont observées. Le meilleur résultat obtenu vis-à-vis de cette souche est celui de l'huile brute de *I.viscosa* avec un diamètre d'environ 32mm qui ne présente aucune différence ($P<0,05$) par rapport à *L.nobilis*, ce qui pourrait indiquer une activité bactéricide de ces huiles vis-à-vis de cette souche. Plus les huiles sont concentrés, meilleure est l'activité, donc l'activité est proportionnelle à la concentration des huiles essentielles.

III.4. Activité des huiles essentielles sur *Klebsiella pneumoniae*

Les huiles brutes ont inhibé la croissance de l'espèce *K.pneumoniae*. Des diamètres d'inhibitions supérieures ou égales à 22 mm sont observés. Du point de vue statistique, il n'existe pas une différence entre les trois espèces vis-à-vis de *K.pneumoniae*. Les dilutions 1/2 ,1/4 et 1/8 ont donné des zones d'inhibition inférieures à 15mm ce qui voudrait dire qu'en diluant nos huiles leur effet diminue, l'activité est proportionnelle à la concentration.

III.5. Activité des huiles essentielles sur *Listeria innocua*

Les diamètres d'inhibition calculés contre la souche *L.innocua* est de 06 à 28,5 mm. Des zones d'inhibition de 28,5, 26,5, 25,5 mm obtenues pour les huiles brutes d'*I.viscosa*, *S.officinalis* et *L.nobilis*, respectivement et qui ne présentent pas une différence significative ($P<0,05$). Une augmentation de l'activité (en termes de diamètre d'inhibition) suite à l'élévation de la concentration est observée.

III.6. Activité des huiles essentielles sur *Staphylococcus aureus*

L'activité bactéricide des huiles essentielles est aussi importante que celle des cas précédents. Des diamètres d'inhibition allant de 29,5 à 43,5 mm ont été enregistrés. Ce qui indique la sensibilité et l'effet bactéricide des huiles utilisées vis-à-vis de cette souche. Une meilleure inhibition est observée pour l'essence d'*I.viscosa* suivi de celles de *S.officinalis* et *L.nobilis* qui ne présentent aucune différence significative ($P<0,05$) entre elles.

Nous constatons également que l'activité est proportionnelle à la concentration des huiles essentielles, plus les extraits sont concentrés meilleure leur activité antibactérienne.

La plus grande susceptibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des huiles essentielles par rapport aux autres espèces bactériennes testés s'expliquerait par une meilleure perméabilité d'un ou des composé(s) actif (s).

III.7. Activité des huiles essentielles sur *P.aeruginosa*

Parmi les huiles essentielles testées, seule l'essence d'*Inula viscosa* présente une activité antibactérienne modérée vis-à-vis des souches *P.aeruginosa*. En effet des diamètres d'inhibition de 6 à 15,5 mm sont enregistrés pour l'huile d'*I.viscosa*. Quant aux huiles essentielles de *S.officinalis* et *L.nobilis* les zones d'inhibition ne dépassent pas 06 à 10,5 mm, respectivement qui ne présentent pas une différence significative entre elles ($P<0,05$).

Ce comportement n'est pas surprenant car les souches de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière a une capacité de synthétiser et secréter des agrégats structurés appelés biofilms ou matrice composés de polysaccharides. Ces biofilms forment une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens et elle secrète aussi un complexe enzymatique extracellulaire qui peuvent dégrader les huiles essentielles [16].

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis des huiles testées, nous constatons que l'efficacité de ces huiles diffère d'une bactérie à une autre. *Pseudomonas aeruginosa* est la plus résistante, cependant, *Staphylococcus aureus* est la plus sensible aux huiles testées. Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif montrent la plus grande sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles [17, 5, 8, 18, 12,19].

Il est probable que ce résultat soit dû à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans les huiles essentielles. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes [20]. Les bactéries à Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50KD [21].

L'ensemble des résultats montre que les huiles essentielles étudiées sont douées d'une activité antibactérienne contre les souches utilisées dans cette étude. Cette importante bioactivité des huiles essentielles étudiées est en relation avec leur composition chimique. En effet, Oussalah et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que l'effet antibactérien des huiles essentielles est attribué aux monoterpènes particulièrement aux phénols [22].

D'autre part, nous avons constaté que l'essence d'*I. viscosa* présente une efficacité plus que les autres espèces. Cette divergence peut être attribuée à leur teneur en carvacrol et thymol. Ces deux composés phénoliques sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Les composés phénoliques causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires [23, 5,12].

Il est également probable que cette activité antibactérienne n'est pas due à la présence des substances particulières seulement mais, sont le résultat de l'interaction entre divers structures aromatiques [7,24, 25]. D'après Oussou et al. [30], ces molécules agiraient le plus souvent par une action synergique, soit seule au sein de l'huile essentielle. En plus de ces composés majoritaires, les composés mineurs peuvent contribuer significativement à l'activité des huiles essentielles [6].

Tableau 3 : Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*I. viscosa*, *S. officinalis* et *L .nobilis*

Plante Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)											
	<i>Inula viscosa</i>				<i>Salvia officinalis</i>				<i>Laurus nobilis</i>			
	1/1	1/2	¼	1/8	1/1	½	1/4	1/8	1/1	1/2	1/4	1/8
<i>Escherichia coli</i>	31,5 ^a ± 0,8	21,5 ^b ± 0,8	10,5 ^d ± 0,16	9,5 ^d ± 0,12	24,5 ^b ± 0,12	9,5 ^d ± 0,9	7,5 ^d ± 0,4	06 ^d ± 00	29,5 ^a ± 0,23	16,5 ^c ± 0,24	8,5 ^d ± 0,04	06 ^d ± 00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29,5 ^a ± 0,02	15,5 ^b ± 0,12	8,5 ^c ± 0,11	06 ^c ± 00	22,5 ^a ± 0,37	12,5 ^b ± 1,5	8,5 ^c ± 1,1	06 ^c ± 00	26,6 ^a ± 1,5	13,5 ^b ± 0,17	8,33 ^c ± 0,56	06 ^c ± 00
<i>Listeria innocua</i>	28,5 ^a ± 0,4	19,00 ^b ± 0,1	9,5 ^c ± 0,7	7,5 ^c ± 00	26,5 ^a ± 0,11	9,5 ^c ± 0,40	8,5 ^c ± 1,07	06 ^c ± 1,15	25,5 ^a ± 0,11	14,5 ^b ± 0,40	8,5 ^c ± 0,7	06 ^c ± 1,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	43,5 ^a ± 0,1	21,5 ^b ± 0,3	14,5 ^c ± 0,14	06 ^d ± 00	21,5 ^b ± 0,2	18,5 ^c ± 0,05	8,5 ^d ± 0,02	7,5 ^d ± 0,05	29,5 ^b ± 0,2	14,5 ^c ± 0,5	9,5 ^d ± 0,09	06 ^d ± 00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,5 ^a ± 1,23	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	10,12 ^b ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	7,5 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

*Dans la même ligne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d.

IV. Conclusion

Dans le but de rechercher de nouveaux agents naturels antibactériens aux intérêts thérapeutiques, les huiles essentielles de trois plantes médicinales de la flore Algérienne, *Inula viscosa* L., *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L. ont fait l'objet d'une étude phytochimique. Différentes analyses sont appliquées à ces plantes : extraction des huiles essentielles, analyse de l'essence *I.viscosa* par la CPG, et détermination de leur pouvoir antibactérien *in vitro* sur des souches pathogènes et multirésistantes : il s'agit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) et *Listeria innocua* (CLIP 74915).

L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation a montré une rentabilité en huile essentielle chez *Salvia officinalis* L (1,12%), alors qu'il s'affaiblit en passant de *L.nobilis* (0,88%) à *I. viscosa* (0,22%). Les propriétés organoleptiques (Aspect, couleur, odeur) de ces essences ont été déterminées.

L'évaluation qualitative de l'effet antibactérien montre que la plupart des souches bactériennes utilisées sont résistantes aux antibiotiques utilisés et que les huiles essentielles sont actives sur ces souches testées. Des zones d'inhibition de diamètres variables sont observées à au moins une des quatre concentrations testées. Néanmoins, l'activité a été le plus souvent observée pour l'extrait brut. En comparant la susceptibilité des pathogènes étudiées, les bactéries Gram positives sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries Gram négatives, ce qui concorde avec beaucoup d'études réalisées dans cette optique. L'huile d'*Inula viscosa* L. présente une meilleure activité antibactérienne que d'autres plantes. L'effet antibactérien est proportionnel à la concentration de l'huile essentielle.

V. Références bibliographiques

- [1] Iserin, P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. Edition VUEF. 8-50.
- [2] Matyar, A., Kaya, A. and Dinçer, S.. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey *Science of The Total Environment*,15: (2008)279-285.
- [3] Hamilton-Miller, J.M.T. and Shah, S. Activity of tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 46 (2004) 847-863
- [4] Pages, J.M. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Medicine Science* 20 (2003) 346-351.
- [5] Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods –a review. *International Journal Food Microbiology* 94 (2004) 223-253.
- [6] Lahou, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 (2004) 435-448.
- [7] Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88 (2000) 308-316.
- [8] Holley, R. A. and Patel, D., Improvement in shelf-life and safety of perishable compounds from leaf essential oil and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22 (2005) 273- 292.
- [9] Gaußen, H., Deuroy, J.F. and Ozenda, P. Précis de botanique II « les végétaux supérieurs ». Ed : Masson ,1982 ; pp 215-408.
- [10] Benjilali, B. Le matériel végétal et l'extraction. In : 'Huiles essentielles, de la plante à l'extraction .Manuel pratique. Edition Université de Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 2005 ; pp 61-78.
- [11] Smith, R.L., Cohen, S.M., Doull, J., Feron, V.J., Goodman, J.I., Marnett, L.J., Portoghesi, P.S., Waddell, W.J., Wagner, B.M., Hall, R.L., Higley, N.A., Lucas-Gavin, C. and Adams T.B. A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food Chemistry Toxicol* 43 (2005) 345–363.
- [12] Bakkali, F., Averbeck, K. and Idaomar, M. Biological effects of essential oils, *Food and Chemical Toxicology*. 46 (2008) 446-475.

- [13] Oussou, K.R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Koukoua, G., Dosso, M., Guessan, Y. T., Figueredo, G. and Chalchat, J-C. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *C. R. Chimie.* 7 (2004) 1081-1086.
- [14] Abderrahim, K., Belhamel, K., Chalchat, JC., Figuéredo, G., (2010). Chemical Composition of the Essential Oil from Artemisia arborescens L. Growing Wild in Algeria., *Records of Natural Products* 4 (1) 87-90.
- [15] Belhamel , K., Abderrahim, A., Ludwig, R. (2008), Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Schinus molle L. grown in Algeria, *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 2 (4), 175-177.
- [16] Maoz, M. and Neeman, I. Effect of Inula viscosa extract on chitin synthesis in dermatophytes and Candida albicans. *Journal of Ethnopharmacology* 71 (2000) 479-482.
- [17] Russel, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* 71 (1991) 191-201.
- [18] De Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N. and Filho, J.M.B. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48 (4) (2005) 1516-8913.
- [19] Nedostrova, L. Kloucek, P., Stolcova, L. and Pulkabek, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria, *Food Control.* 20 (2) (2009) 157-160.
- [20] Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67(4) (2003) 593-656.
- [21] Hogan, D. and Kolter, L. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology.* 5 (2003) 472-477.
- [22] Oussalah, M., Caillet, S. and Lacroix, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes. *J. Food Prot.* 69 (2006) 1046–1055.
- [23] Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91 (2001) 453–462
- [24] Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of food microbiology* 67 (2001) 187-195.
- [25] Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74 (2002) 101–109.
- [26] Quezel, P. and Santa, S., Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique, 1963 Tome II.
- [27] Belaiche, P. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 l'aromatogramme. Ed Maloine. Paris, 1979 ; pp 9 -128.
- [28] Thi Dung, N., Min Kim, J. and Kang, S.C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds *Food and Chemical Toxicology* 46 (12) (2008) 3632-3639.
- [29] Delignette-Muller, M.L. Méthode de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes, Thèse n°118-15, 1992.
- [30] Oussou, K.R., Kanko, C., Guessend, N., Yolou, S., Koukoua, G., Dosso, M., Guessan, Y. T., Figueredo, G. and Chalchat, J-C. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *C. R. Chimie.* 7 (2004) 1081-1086.

Please cite this Article as:

Kheyar, N., Meridja, D., Belhamel, K., Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, *Algerian J. Nat. Products*, 2:1(2014)18-26.

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

OPEN ACCESS

Online ISSN: 2353-0391

Algerian Journal of Natural Products

www.ajnp.webs.com

Type of the Paper: Original paper.

Caractérisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae)

Meriem TOUAIBIA¹, Fatma Zohra CHAOUCH², Cherifa CHAOUIA², Hamida CHERIF¹¹ Département des sciences Biologiques, Université Saad Dahlab de Blida, Algérie.² Département des sciences Agronomiques, Université Saad Dahlab de Blida, Algérie
e-mail: biomeriem@hotmail.com

Received: 11/04/2014

/Accepted: 11/05/2014

Résumé: Cette étude est basée sur la valorisation d'une plante endémique du Sahara Algérien: l'espèce *Myrtus nivellei* Batt & Trab. L'extraction de sa fraction aromatique volatile et de ses composés polaires offre de nouvelles perspectives sur ses éventuelles propriétés pharmacologiques. L'huile essentielle, extraite par entraînement à la vapeur, a donné un rendement de 2,91%. L'analyse de sa composition chimique par CG/SM a révélé la présence d'une forte proportion en sesquiterpènes hydrocarbonés (δ -elemene 15,69% et Azulène 6,18%), en monoterpènes oxygénés (1,8 cinéole 12,06%) et en alcools monoterpéniques (α -terpinéol 13,01%). L'analyse de l'extrait éthanolique a révélé sa richesse en polyphénols totaux (734 μ g eq/mg ES), en flavonoïdes (181,1 μ g eq/mg ES), en flavonols (711,75 μ g eq/mg ES), en anthocyanes (25,5 μ g eq/mg ES) et en sucres totaux (17,26 μ g eq/mg ES), alors que l'extrait méthanolique a présenté des teneurs moindres mais s'est montré remarquablement riche en tanins (155,27 μ g eq/mg ES).

Mots clés: *Myrtus nivellei* Batt & Trab.; huile essentielle; extraits; polyphenols.

I. Introduction

Myrtus nivellei Batt & Trab. est une espèce arbustive saharo-endémique, de 0,5 à 2 mètres de hauteur, qui s'adapte très bien à la sécheresse [1]. Elle restreinte aux montagnes du Tassili n'Ajjer, Tassili n'Immidir, Tefedest et des massifs de l'Ahaggar algérien ainsi que les montagnes du Tibesti tchadien, où elle couvre des zones très réduites [2]. Elle apparaît au delà de 1400 à 2000 mètres d'altitude [3].

Ce travail apporte une première contribution à l'investigation de cette plante en Algérie. Ainsi, deux ordres de préoccupation se rencontrent dans cette étude et lui donnent sa substance. Le premier vise l'extraction de l'huile essentielle et la révélation de sa composition chimique. L'autre objectif assigné à ce travail est l'investigation approfondie de sa fraction polaire via la détermination de sa richesse en composés phénoliques. Cette étude s'intègre également dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes, ainsi que dans le cadre de la préservation des espèces endémiques en voie de disparition du Sahara central.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal:

Les rameaux feuillés de la plante ont été récoltés sur des pieds adultes, à 146 km du chef lieu de la wilaya de Djane, cette station est située à 94,8 km au sud de *Ihrir*, faisant partie du parc national du Tassili (tableau1).

Une partie des rameaux fraîchement récoltés a servi pour l'extraction de l'huile essentielle, le reste a été séché à température ambiante pendant 2 semaines, à l'abri du soleil, puis réduit en poudre fine qui est soigneusement conservée. Des échantillons frais ont fait l'objet d'une étude histologique.

Tableau 1. Coordonnées géographiques du site de récolte.

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Tassili n'Ajjer	2018 m	24°59' Nord	8°07' Ouest	Aride à hiver frais (Sahara central)

II.2. Coupes histologiques

La plante a été soumise à un examen macroscopique complété par un examen microscopique en réalisant des coupes histologiques au niveau des tiges [4], dans le but de localiser les sites sécréteurs des essences végétales.

II.3. Caractérisation physico-chimique

La plante est soumise à de nombreux tests afin d'évaluer le pH [5], la teneur en eau [6], la teneur des substances extractibles [7,8] ainsi que le taux des cendres [9].

II.4. Extraction de l'huile essentielle

Les rameaux feuillés récoltés sont soumis à une extraction par entraînement à la vapeur, l'essence est recueillie par simple décantation du distillat. L'extraction a duré environ trois heures. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement.

II.5. Conditions de l'analyse CG/SM

L'analyse chromatographique de l'HE a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse (*Hewlett-Packard 6890*) couplé à un spectromètre de masse (*HP 5973*). La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV, en utilisant une colonne capillaire *HP-5MS* (30mx0,25 mm x 0,25µm). La température de la colonne est programmée de 60 à 250°C à raison de 2°C.min-1. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml.min-1. L'injection est établie en mode split (rapport de fuite:1/50).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse *NIST 2002* et piloté par un logiciel « *HP ChemStation* » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. L'identification des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée (*NIST 2002*).

II.6. Préparation des extraits alcooliques (Fraction polaire)

Des extraits alcooliques sont préparés par épuisements de la poudre végétale à l'aide d'un solvant chimique : à froid par macération dans l'éthanol [8] et à chaud par Soxhlet avec le méthanol [10], afin de libérer les composés non volatils présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion.

II.7. Quantification des composés phénoliques et des sucres totaux

Le taux des polyphénols totaux a été obtenu par dosage spectrophotométrique selon la méthode Folin Ciocalteu [11]. La mesure des flavonoïdes totaux est inspirée de la méthode décrite par Park et al. [12]. La teneur en flavonols est déterminée par la méthode de Yermakov et al. [13]. Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique Folin Denis, décrite par Joslyn [14]. Les anthocyanes sont déterminés par le protocole de décoloration proposé par Jur [15], alors que les sucres solubles sont dosés par la méthode Phénol-Acide sulfurique [16].

III. Resultants et Discussion

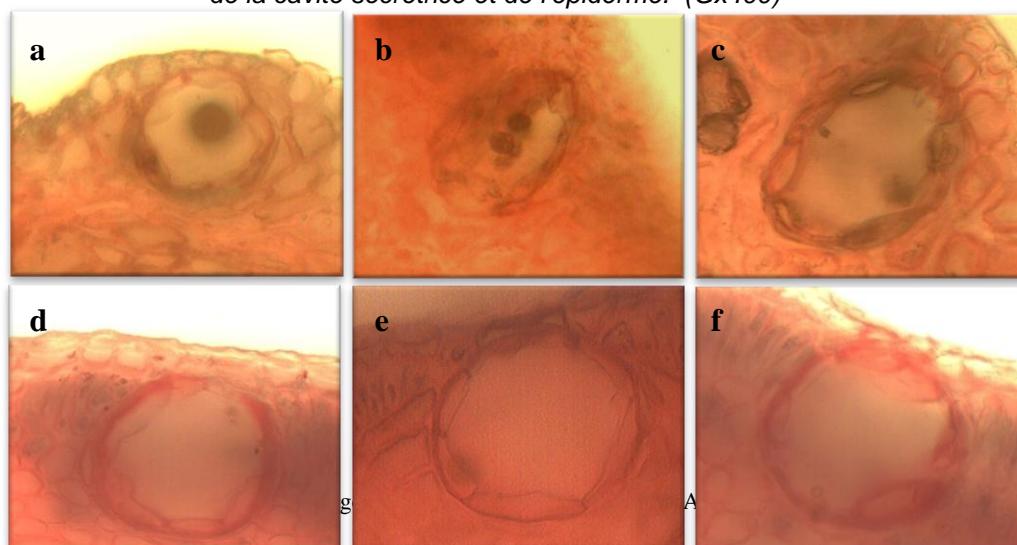
III.1. Nature et localisation des structures sécrétrices

L'observation macroscopique, sous loupe binoculaire, a révélé la présence de poils protecteurs peu nombreux dans la partie caulinaire (tige et rameaux jeunes) de la plante, ayant tendance à disparaître complètement lorsque les tiges commencent à se lignifier.

Les coupes histologiques ont permis de révéler la présence de plusieurs poches sécrétrices qui sont le siège de synthèse de l'huile essentielle, caractéristique commune pour toutes les espèces appartenant à la famille des *Myrtaceae*. Ces structures sécrétrices sont inégalement distribuées sur tous les organes aériens et sont localisées à proximité de l'épiderme (figure 1). Il s'agit de poches sécrétrices sous forme de cavités sub-épidermiques sphériques ou oblongues, délimitées par deux rangées de cellules, la rangée la plus interne est formée par des cellules aplatis à paroi très fine, ces cellules sécrétrices dégénèrent à maturité, la deuxième rangée est formée par des cellules parenchymateuses à parois épaisses.

D'après Cicarelli et al [17], ces structures sécrétrices sont enfoncées dans le parenchyme cortical et étroitement accolées à l'épiderme par deux petites cellules appelées "cap cells". L'ontogénie de ces cavités montre qu'elles semblent suivre un développement schyzolysogène, issu d'une lyse et d'un écartement des cellules parenchymateuses

Figure 1. (a) Observations microscopiques des différentes phases de développement des poches sécrétrices à localisation foliaire: (a) Début de formation de la poche sécrétrice par écartement des cellules parenchymateuses; (b) (c) Elargissement de la lumière de la poche sécrétrice délimitée par une assise de cellules sécrétrices; (d) Mise en place de la deuxième assise de cellules parenchymateuses délimitant les cellules sécrétrices, (e) (f) Formation de deux cellules chapeau ou cap cells correspondant au point de fusion de la cavité sécrétrice et de l'épiderme. (Gx400)



III.2. Résultats de la caractérisation physico-chimique

Les propriétés physico-chimiques des rameaux feuillés de *Myrtus nivellei* Batt & Trab. sont résumés dans le tableau 2. Le fruit est une baie bleue violacée, portée par un long pédoncule légèrement poilu, elle comporte approximativement de 8 graines/baie, ces graines mesurent en moyenne 3 x 2 mm.

Tableau 2. Propriétés physico-chimiques des rameaux feuillés.

Propriétés	Valeurs obtenues
pH	5,66
Teneur en eau (%) [*]	36,91±0,21
Teneur des substances extractibles par l'eau(%) [*]	3,41±0,36
Teneur des substances extractibles par l'éthanol(%) [*]	11,12±0,43
Taux de cendres (%) ^{**}	6,11 ±0,08
Nombre des graines ^{**}	8,34 ±1,2
Taille des graines(mm) ^{**}	3 x 2
Dimensions des baies(mm) ^{**}	4-6 x 5-8

* Ces résultats sont obtenus avec une fréquence de 3 répétitions par test)

** Ces résultats sont obtenus avec un effectif de 1000 baie

III.3. Etude analytique de l'huile essentielle

Les propriétés organoleptiques et physicochimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. A l'issu de l'extraction pratiqué, l'essence obtenue est de couleur jaune claire, avec une odeur prononcée rappelant celle des feuilles. Ses propriétés physico-chimiques sont consignées dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractères physico-chimiques de l'huile essentielle.

Caractères physico-chimiques	Valeurs obtenues
Rendement (%)	0,2911±0,5503
Densité relative	0,8501±0,1471

L'huile essentielle de *M. nivellei* Batt & Trab. présente un rendement égale à 2,91%. Il semblerait que le biotope aride de cette plante influe sur sa richesse en essences. Ce rendement se montre meilleur que celui rapporté par Bouzabata et al [1] estimé entre 1,4% et 2,0%. Dans ce même contexte, Belaïche [18] rapporte que les huiles essentielles conservent l'humidité des plantes poussant dans les climats arides, comme c'est le cas pour notre espèce saharo-endémique. Les mesures de la densité de cette huile essentielle effectuée à 20°C, montrent qu'elle avoisine 0,85. Cette valeur s'intègre parfaitement dans l'intervalle décrit par la pharmacopée européenne qui s'étale de 0,80 à 0,95.

III.3.1. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats de l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) de la composition chimique de l'huile essentielle sont présentés dans le tableau 4. Au total, 48 composés ont été identifiés ce qui correspond a un pourcentage de reconnaissance de l'ordre de 90,5% par rapport à l'ensemble des constituants isolés.

Le profil chromatographique est caractérisé par 6 pics majoritaires, avec une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés, dont on cite: le δ -elemene (15,69%), l' α -terpineol (13,01%), le 1,8 cinéole (12,06%) et le citral (11,66%). On note la présence d'un sesquiterpène hydrocarboné très intéressant: il s'agit de l'azulène avec une teneur de 6,18%. Un autre composé majoritaire appartient à la famille des alcools, il s'agit du 1,2-benzenzediol avec un taux de 5,36%. L' α -patcoulène présente un taux égale à 2,87%. Les autres composés non identifiés représentent un taux inférieur à 10%. D'après ces résultats, on peut déduire que cette huile essentielle appartient au chémotype δ -elemene/ α -Terpineol avec une présence non négligeable du cinéol et du citral.

Cette huile essentielle se montre très riche en monoterpènes et en sesquiterpènes, qui représentent les deux principaux groupes de terpènes. En revanche certains aldéhydes et alcools identifiés occupent une position secondaire. Les esters et les cétones sont minoritaires, dont certains sont sous forme de traces. L'effet combiné de ces composés est responsable de l'odeur caractéristique de l'huile essentielle de chaque plante. L' α -terpinéol est responsable de l'odeur florale sucrée exhalée par le végétal [19]. Néanmoins l'azulène, présent dans cette huile essentielle à un taux non négligeable de l'ordre de 6,18%, est un composé très utilisé en cosmétologie et en pharmacologie en raison de ses propriétés anti-inflammatoires.

Tableau 4. Composés majoritaires de l'huile essentielle étudiée.

N°	Composé identifié	Pourcentage (%)
1	1,8 cinéol	12,06
2	1,6 octadien-3-ol,3,7-dimethyl	2,42
3	α -Terpinéol	13,01
4	δ -elemene	15,69
5	Citral	11,66
6	1,2-benzenediol,3,5-bis	5,36
7	Azulène	6,18
8	α -patcoulène	2,87
Chémotype étudié		δ-elemene/ α-Terpinéol
Classes biochimiques des composés identifiés dans l'huile essentielle		
Monoterpenes		
Esters therpeniques		
Sesquiterpenes		
Cetones		
Oxydes terpeniques		
Alcools terpeniques		
Aldehydes terpeniques		
TOTAL		90.500

3.4. Résultats de l'étude analytique de la fraction polaire et des dosages spectrophotométriques

Les extraits méthanoliques (MeOH) sont quantitativement les plus importants avec un rendement estimé à 59,15%. Il paraît ainsi que le choix du solvant et de la technique d'extraction influent considérablement sur le rendement en extrait sec (tableau 5).

Tableau 5. Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

M nivellei	Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait (%)	Aspect de l'extrait	Couleur de l'extrait
	Extrait MeOH	59,15	Collant pâteux	Marron foncé
	Extrait EtOH	12,45	Friable	Vert claire

Les résultats du dosage des composés phénoliques et des sucres dans les extraits par spectrophotométrie UV-visible est rapportée dans le tableau 6.

Tableau 6. Dosage des composés phénoliques dans les extraits de *M nivellei* Batt & Trab.

Paramètre	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)	Taux ($\mu\text{g eq}/\text{mg ES}$)	
			Extrait MeOH*	Extrait EtOH**
Polyphenols	Acide gallique	760	348	734
Flavonoïdes	Quercetine	415	152,25	181,1
Flavonols	Rutine	440	438,5	711,75
Tanins	Acide tannique	760	155,27	139,24
Anthocyanes	Cyanidine	520	17,2	25,5
Sucres totaux	Glucose	488	2,28	17,26

* extrait méthanolique

** extrait éthanolique

On constate que les extraits obtenus par macération sont plus riches en polyphenols que ceux obtenus par extraction à chaud avec du méthanol, soit 734 $\mu\text{g eq ac gal}/\text{mg ES}$ pour l'extrait EtOH et 348 $\mu\text{g eq ac gal}/\text{mg ES}$ pour l'extrait MeOH. Selon Gardeli et al. [20], la teneur des extraits MeOH en polyphenols chez l'espèce *Myrtus communis L.* varie entre 352 et 373 $\mu\text{g eq ac gal}/\text{mg ES}$ et atteint un maximum durant la période de pleine floraison.

L'analyse quantitative des flavonoïdes chez *M nivellei* Batt et Trab., montre un taux de 181,1 $\mu\text{g eq quer}/\text{mg ES}$ dans l'extrait EtOH, alors l'extrait MeOH présente un taux moindre de l'ordre de 152,25 $\mu\text{g eq quer}/\text{mg ES}$.

Ainsi, on déduit que le taux des flavonoïdes dans les extraits EtOH demeure plus important, que celui des extraits MeOH. Il paraît clairement que l'extraits EtOH fournit le taux le plus élevé en flavonols, qui dépassent 700 $\mu\text{g eq rut}/\text{mg ES}$. La concentration en flavonols dans l'extrait MeOH est moins importante avec 438,5 $\mu\text{g eq}/\text{mg ES}$. Cependant, les extraits MeOH et EtOH de cette espèce saharo-endémique présentent des taux en sucres estimés respectivement à 2,28 et 17,26 $\mu\text{g eq glu}/\text{mg ES}$.

Après extrapolation des résultats de l'absorbance mesurée au spectrophotomètre, sur la courbe d'étalonnage de l'acide tannique, nous avons constaté une forte présence de tanins dans l'extrait MeOH avec une concentration de 135,02 $\mu\text{g eq ac tan}/\text{mg ES}$. Les extraits EtOH renferment des concentrations moins importantes que la précédente, ne dépassant pas le seuil de 110 $\mu\text{g eq ac tan}/\text{mg ES}$. Ceci est probablement dû à la difficulté de l'extraction des tanins par simple macération.

La teneur en anthocyanes dans l'extrait EtOH est estimée à 25,5 μg . L'extrait MeOH a fourni de faibles teneurs, avec un taux de 17,2 $\mu\text{g eq cyan}/\text{mg ES}$. Il est important de signaler que les anthocyanes, sur le plan théorique augmentent avec la maturation des fruits, atteignant un maximum puis diminuent. Par ailleurs, d'après Bakker et al. [21], les différentes réactions qui provoquent la diminution des anthocyanes sont :

- Les réactions de condensation des anthocyanes avec d'autres molécules inférieures (Acide puracique, Acide glycoxylique).
- La combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères, qui possèdent des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes.

IV. Conclusion

Dans cette étude, certaines caractéristiques des extraits et de l'huile essentielle de *Myrtus nivellei* Batt & Trab. ont été recherchées et valorisées pour la première fois. L'utilisation de la technique de CG/SM nous a permis de lui attribuer le chémotype δ -elemene/ α -terpinol à l'huile essentielle de la plante étudiée.

Toutefois, vu la richesse de cette huile essentielle en composés très appréciées en cosmétologie, comme l'azulène ainsi que ces propriétés organoleptiques, cette première contribution ouvre de larges perspectives de recherche pour les années à venir.

Grâce aux dosages spectrophotométriques, nous avons constaté que les extraits éthanoliques sont plus riches en polyphénols que les extraits méthanoliques, ceci nous laisse supposer que l'extraction douce par macération permet de préserver les métabolites ainsi que leur structure, contrairement à l'extraction par Soxhlet où la chaleur est susceptible de dégrader certains composés chimiques thermosensibles, bien que son rendement soit meilleur.

Il est impératif à présent de trouver des alternatives nouvelles basées sur une meilleure utilisation de la biodiversité végétale et capables de promouvoir de nouveaux substrats naturelles via les pratiques de biotechnologies.

V. Références

- [1] Bouzabata A, Bazzali O, Cabral C, Gonçalves M.J, Cruz M.T, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Salgueiro L and Tomi F. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt. & Trab., an endemic species of Central Sahara. *Journal of Ethnopharmacology*. 149 (2013) 613–620
- [2] Ozenda, P. Flore du Sahara. Edition CNRS. Paris. (1977). 623p.
- [3] Maka, M. Fleurs du Sahara, arbres et arbustes au cœur de leurs usages avec les touareg du Tassili. *Phytotherapia*. 12 (2004) 191-197.
- [4] Prat.R. Expérimentation en biologie et physiologie végétale: 300 manipulations. Edition QUAE. Paris. (2007). 56.
- [5] Dowson A et Aten M. Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes. Collection F.A.O. Rome. (1963). 167.
- [6] Zerrad W, Hillali S, Mataoui B.S et Hmeyen A. Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. *Bull. Laboratoire de biochimie d'environnement*. 7 (2006) 10-14.
- [7] Togola A. Etude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de *Alchornea cordifolia* Schmach. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. (2002) 100.
- [8] Diarra M.N. Etude phytochimique d'une plante antipaludique: *Spilanthes oleracea*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. (2003) 78.
- [9] Pharmacopée européenne. 4^{eme} édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg. (2002). 2060.
- [10] William B.J. The original of the soxhlet extractor . *J. chemical education*. 84 (2007) 1913-1915.
- [11] Slinkard K et Singleton V.L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American journal of viticulture*. 28 (1977) 49-55.
- [12] Park Y.K, Koo M.H, Ikegaki M et Contado J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Brazilian archives of biology and technology*. 40 (1997) 97-106.
- [13] Yermakov A.I, Arasimov V.V. et Yarosh N.P. Methods of biochemical analysis of plants. Agropromizdat. Leningrad. (1987). In: Miliauskasa G, Venskutonis P.R et Van Beek T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *J.Food chemistry*. 85 (2004) 231-237.
- [14] Joslyn M.A. A serie of monography. Food. Sci. techn. (1970). In: Bessas A, Benmoussa L et Kerarma M. Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. (2008). 137.
- [15] Jur A. Dosage des pomyphenols. (1967). In: Bessas A, Benmoussa L et Kerarma M. Dosage biochimique des polyphenols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. (2008). 137.
- [16] Duboi M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A et Smith S. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.chem.* 28 (1956) 350-356.
- [17] Ciccarelli D, Garbari F, Pagni A.M. The flower of *M communis*: Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora*. 203 (2008) 85-93.
- [18] Belaïche P. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome I. Edition Maloine. Paris. (1979). 204.
- [19] Lawrence B.M. Progress in essential oils: Myrtle oil. *Perfumer & flavorist*. 18 (1993) 52-55.

- [20] Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T et Komaltis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis*: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. J. Food chemistry. 107 (2008) 1120-1130.
- [21] Bakker J , Bridle P, Honda T, Kuwano H, Saito N, Terahara N et Timberlake C.F. Identification of anthocyanin occurring in some red wines. Phytochemistry, 4 (1997) 145-148.

Please cite this Article as:

Meriem TOUAIBIA, Fatma Zohra CHAOUCH, Cherifa CHAOUIA, Hamida CHERIF, Caracterisation phytochimique de l'espèce saharo-endémique *Myrtus nivellei* Batt & Trab (Myrtaceae), *Algerian J. Nat. Products*, 2 (2014) 27-34.

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved.

Algerian Journal of Natural Products

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Reviewers Guide

PART A: Editorial Office Only

SECTION I

Reviewer's Name:	
E-Mail:	
Manuscript Number:	
Title:	
Date Sent To Reviewer:	
Date Expected From Reviewer:	

PART B: *Reviewer Only*

SECTION II: Comments per Section of Manuscript

General comment:	
Introduction:	
Methodology:	
Results:	
Discussion:	

SECTION II (Cont.)

Bibliography/References:	
Others:	
Decision:	

SECTION III - Please rate the following: (1 = Excellent) (2 = Good) (3 = Fair) (4 = poor)

Originality:	
Contribution To The Field:	
Technical Quality:	
Clarity of Presentation :	
Depth of Research:	

SECTION IV - Recommendation: (Kindly Mark With An X)

Accept As Is:	
Requires Minor Corrections:	
Requires Moderate Revision:	
Requires Major Revision:	
Submit To Another Publication Such As:	
Reject On Grounds Of (Please Be Specific):	