

# THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

**Centre de Recherche** : Géophysique, Patrimoine Naturel et Chimie Verte (GEOPAC)

**Structure de Recherche** : Équipe de Chimie des Plantes et Synthèse Organique et Bio-organique (ECPSOB)

**Discipline** : Chimie Organique et Analytique

**Spécialité** : Phytochimie

Présentée et soutenue le : 16/07/2021 par :

**Ahmed HAJIB**

**Contribution à la valorisation chimique, phytochimique et biologique des espèces : *Ammodaucus leucotrichus* L. (Apiacées), *Cuminum cyminum* L. (Apiacées) et *Punica granatum* L. (Punicacées)**

## JURY

Souad EL HAJJAJI	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat	de Présidente
Said LAZAR	PES	Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, Université Hassan II Mohammedia-Casablanca	Rapporteur/Examineur
Hakima EL HAJJI	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat	de Rapporteuse/Examinatrice
Mohamed TABYAOUI	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat	de Rapporteur/Examineur
Matthias HAMBURGER	PES	Faculté des Sciences, Université de Bâle - Suisse	Examineur
Badr-Eddine KARTAH	PH	Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat	de Examineur
Zoubida CHARROUF	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat	de Invitée
Khalid BOUGRIN	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat	de Directeur de thèse

**Année Universitaire : 2020/2021**

# *Remerciements*

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bio organique de la Faculté des Sciences de Rabat, sous la direction du Professeur **Zoubida CHARROUF** depuis l'année universitaire 2015/2016 jusqu'à 2016/2017, puis sous la direction du Professeur **Khalid BOUGRIN** depuis l'année universitaire 2017/2018 jusqu'à 2020/2021. Il a été mené en collaboration avec le laboratoire de biologie pharmaceutique à la Faculté des Sciences de l'Université de Bâle en Suisse et le laboratoire des lipides à l'Institut fédéral de recherche, Max Rubner Institute (MRI) de Detmold en Allemagne.

Mes sincères remerciements s'adressent à Monsieur **Khalid BOUGRIN**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V de Rabat et directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe ECPSOB qu'il dirige. Sa disponibilité et son intérêt permanent pour mon travail ont été très précieux. Je tiens à profiter de cette occasion pour exprimer ma profonde reconnaissance pour votre dévouement précieux pour les chercheurs comme moi.

La direction de ces travaux de recherches a été assurée par Madame **Zoubida CHARROUF**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V de Rabat, que je tiens à remercier vivement et à lui exprimer toute ma profonde reconnaissance pour sa rigueur scientifique. Elle m'a initiée et formée à la passion de la recherche et m'en a donné le goût, même si tout n'a pas toujours été facile. Ses conseils et ses encouragements m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie chaleureusement Madame **Souad EL HAJJAJI**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V de Rabat, qui a accepté de présider le jury de cette thèse. C'est un honneur pour moi d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime notamment mes vifs remerciements à Monsieur **Saïd LAZAR**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences et Technique de l'Université Hassan II Mohammedia-Casablanca pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur et examinateur.

Ma reconnaissance est adressée également à Madame **Hakima EL HAJJI**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V de Rabat d'avoir accepté de juger ce travail. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi mon jury en tant que rapporteuse et examinatrice.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur **Mohamed TABYAOUI**, Professeur d'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V de Rabat d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis honoré de sa présence parmi les membres de jury de cette thèse en tant que rapporteur et examinateur.

J'aimerais adresser un remerciement particulier à Monsieur **Matthias HAMBURGER**, Professeur d'Enseignement Supérieur et directeur du laboratoire de biologie pharmaceutique à la Faculté des Sciences de l'Université de Bâle en Suisse d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je lui suis également reconnaissant pour son accueil, sa disponibilité, ses qualités humaines, pédagogiques et scientifiques. Je lui adresse toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier Monsieur **Badr-Eddine KARTAH**, Professeur Habilité à la Faculté des Sciences de l'Université Mohammed V de Rabat pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur.

Un grand merci au docteur **Bertrand MATTHAUS**, responsable du laboratoire des lipides et directeur adjoint à l'IMR et à l'ensemble des membres de l'équipe du laboratoire des lipides à l'Institut fédéral de recherche, Max Rubner Institute (MRI), Detmold, Allemagne, pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire.

J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'équipe de laboratoire de biologie pharmaceutique à l'université de Bâle en Suisse, dont j'ai eu le plaisir de faire connaissance plus particulièrement, le Professeur **Olivier POTTERAT**, le technicien **Orlando FERTIG**, **Dr. Mouhssin OUFIR**, **Dr. Ombeline DANTON**, **Dr. Teresa FALESCHINI**, **Dr. Abdelhalim MAHMOUD**, **Dr. Jakob REINHARDT** et **Antoine CHAUVEAU** pour m'avoir offert leur collaboration et pour toutes les méthodes analytiques qu'ils ont partagé avec moi.

J'ai le plaisir aussi de remercier chaleureusement le Professeur **Hanae EL MONFALOUTI**, le Professeur **Hicham HARHAR** et le Professeur **Said GHARBY** pour leurs qualités

humaines et scientifiques pour tous les moments agréables que nous avons partagés durant ma formation de doctorat.

Je présente également mes sincères remerciements, à tous mes professeurs de la Faculté des Sciences de Rabat, et de l'Ecole Normale Supérieure de Rabat, qui ont assuré ma formation, pour les conseils compétents qu'ils m'ont prodigués, durant tout mon cursus universitaire.

Mes remerciements vont également à mes collègues de laboratoire et à mes amis chercheurs, **Hasnae CHOUKRI, Dr. Issmail NOUNAH, Dr. Hamza TACHALLAIT, Dr. Walid BELMAGHRAOUI, Younees AQIL, Aicha TALHA, Fatima zahra THARI, Dr. Hamza EL MOUDDEN, Youssra EL IDRISSE, Dr. Asmae OUBIHI** et **Noura BENTAGHLYA** pour leur soutien, leur accessibilité et leur aide au cours des dernières années.

Je souhaite remercier également la **Fédération Suisse** de m'avoir accordé la bourse d'études « **Swiss Government Excellence Scholarships for Foreign Scholars and Artists** ». C'est vraiment un grand honneur pour moi d'être choisi comme bénéficiaire de ce prix.

Je tiens à remercier l'association **Ibn Albaytar** pour leurs contribution financière et technique dans le terrain.

Je tiens à remercier :

- La coopérative Flora qui nous a fournis les échantillons du grenadier.
- Mhamed EL GASMI qui nous a fournis les échantillons du cumin essoufi.
- Mes amis et collègues de la Faculté des Sciences.
- A tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, je leur adresse mes remerciements les plus chaleureux.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à mes parents (**Larbi** et **Rabia**), ma sœur (**Loubna**), mes cousins (**Wahid, Anas, Narjiss, Houda, Chakir, Adil, Hamza, Ayoub, Yassine** et **Mohamed**) et à toute ma famille pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études et pour la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée. Je suis très fier de les avoir à mes côtés et je ne peux pas oublier l'invocation de mes parents à chaque fois « que Dieu, t'élargisse les chemins les plus étroits ».

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation de la flore endémique de l'Afrique du Nord, une étude phytochimique sur l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. a conduit à la caractérisation de six nouveaux dérivés d'amide d'acide caféique, cinq flavones connues et quatre lignanes connus. Pour la première fois, notre étude a rapporté l'isolement de composés d'acide caféique attachés à une chaîne acétylénique par une liaison amide.

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir des fruits des deux espèces : *Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L. peuvent être considérées comme une bonne source de monoterpénoïdes, en particulier du  $\gamma$ -terpinen-7-al, du cuminaldéhyde et de la perrilla aldéhyde. En plus, les deux huiles ont montré des caractéristiques antioxydantes et antimicrobienne significatives.

Pour évaluer l'influence de l'origine géographique sur la qualité de l'huile fixe du cumin (*Cuminum cyminum* L.), nous avons étudié la variabilité chimique de six huiles produites dans différentes régions du Maroc. Les résultats obtenus ont montré que la teneur en huile et la composition en tocophérol varient significativement en fonction du lieu de récolte, alors que la teneur en acide pétrosélinique n'a montré aucune variation significative.

L'analyse de la fraction lipidique des fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. a montré que cette fraction peut être considérée comme une source importante d'acides gras (acide pétrosélinique), de stérols et de tocophérols.

L'étude de l'huile de grenade (*Punica granatum* L.) a montré que la variété marocaine 'Sefri' contient une forte teneur en huile, avec l'acide punique comme acide gras prédominant. De plus, une teneur considérable en tocophérols et en stérols a été révélée.

**Mots-clés :** Cumin, cumin essoufi, grenade, lipide, huile essentielle, amides de caffeoyloyle.

## Abstract

As part of the enhancement of endemic flora of north Africa, the present phytochemical study on *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits ethyl acetate extract led to the characterization of six new caffeic acid amide derivatives, five known flavones and four known lignans. To our knowledge, this study is the first to report the isolation of caffeic acid compounds attached to an acetylenic chain by an amide band.

Hydrodistilled essential oils obtained from the fruits of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L., could be considered as an interesting source of monoterpenoid. In addition, both oils have shown significant antioxidant and antimicrobial characteristics.

To assess the impact of geographical origin on the fixed oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.), we studied the chemical variability of six oil produced from different regions in Morocco. Outcomes of this study revealed that the oil content and tocopherol composition varied significantly according to the harvest location.

Analysis of lipid fraction of *Ammodaucus leucotrichus* L. specie fruits, showed that the fruits oil might be considered as an important source of fatty acids (petroselinic acid), sterols and tocopherols.

Pomegranate oil (*Punica granatum* L.) study, showed that the Moroccan variety 'Sefri' contained a high oil content, with punic acid as the predominant fatty acid. Moreover, a considerable content of tocopherols and sterols has been also revealed.

**Keywords:** Cumin, cumin essoufi, pomegranate, lipid, essential oil, caffeoyl amides.

## Liste des publications

**Hajib, A.**, Danton, O., Smiesko, M., Potterat, O., Kartah, B., Bougrin, K., Charrouf, Z., and Hamburger, M. Caffeic acid amides derivatives from *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits (Apiaceae). *Phytochemistry*. (**En cours de soumission**).

**Hajib, A.**, Nounah, I., Harhar, H., Gharby, S., Kartah, B., Matthäus, B., Bougrin, K. and Charrouf, Z., *Ammodaucus leucotrichus* L. oil a new source of the petroselinic acid. *OCL*. (**Soumis**).

**Hajib, A.**, Nounah, I., Harhar, H., Gharby, S., Kartah, B., Matthäus, B., Bougrin, K. and Charrouf, Z., 2021. Oil content, lipid profiling and oxidative stability of “Sefri” Moroccan pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *OCL*, 28(5), 1-7.

**Hajib, A.**, Nounah, I., Oubihi, A., Harhar, H., Gharby, S., Kartah, B., Bougrin, K. and Charrouf, Z., 2020. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from the Fruits of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L.(Apiaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(3), 474-483.

**Hajib, A.**, Harhar, H., Gharby, S., Nounah, I., Matthäus, B., Guillaume, D. and Charrouf, Z., 2018. Is geographic origin a good marker for cumin seed oil (*Cuminum cyminum* L.)?. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 95(3), 155-159.

Gharby, S., **Hajib, A.**, Ibourki, M., Nounah, I., Moudden, H.E., Elibrahimi, M. and Harhar, H., 2021. Induced changes in olive oil subjected to various chemical refining steps: A comparative study of quality indices, fatty acids, bioactive minor components, and oxidation stability kinetic parameters. *Chemical Data Collections*,

Gharby, S., Guillaume, D., Nounah, I., Harhar, H., **Hajib, A.**, Matthäus, B. and Charrouf, Z., 2021. Shelf-life of Moroccan prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) and argan (*Argania spinosa*) oils: a comparative study. *Grasas y Aceites*, 72(1), e397-e397

Nounah, I., Chbani, M., Matthäus, B., Charrouf, Z., **Hajib, A.** and Willenberg, I., 2020. Profile of Volatile Aroma-Active Compounds of Cactus Seed Oil (*Opuntia ficus-indica*) from Different Locations in Morocco and Their Fate during Seed Roasting. *Foods*, 9(9), 1280.

Nounah, I., **Hajib, A.**, Oubihi, A., Harhar, H., Gharby, S., Kartah, B., Charrouf, Z., and Bougrin, K., 2019. Phytochemical screening and biological activity of leaves and stems extract of *hammada scoparia*. *Moroccan Journal of Chemistry*, 7(1).

Gharby, S., Jadouali, S.M., **Hajib, A.**, Nounah, I. and Farssi, M., 2018. Chemical profiles and Sensory analysis of four varieties of olive oil cultivated in Morocco. *Moroccan Journal of Chemistry*, 6(2).

Nounah, I., **Hajib, A.**, Harhar, H., El Madani, N., Gharby, S., Guillaume, D. and Charrouf, Z., 2017. Chemical composition and antioxidant activity of *Lawsonia inermis* seed extracts from Morocco. *Natural product communications*, 12(4).

## Liste des communications

**Ahmed Hajib, Issmail Nounah, Hicham Harhar, Said Gharby, Badreddine Kartah, Khalid Bougrin and Zoubida Charrouf (2018)**, "Chemical Composition and biological activities of the essential oils of two species of the Apiaceae family: *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L. ", 1er congrès international de Biotechnologie verte- FPT de Taroudant, 01-03 November 2018.

**Ahmed Hajib, Issmail Nounah, Nadia El Madani, Hicham Harhar, Bertrand Matthäus, and Zoubida Charrouf (2016)**, "Influence de l'origine géographique sur la composition chimique et évaluation de la stabilité oxydative de l'huile végétale du cumin". SNDD international congress 2016 – Rabat, 19-20 Mai 2016.

**Ahmed Hajib, Issmail Nounah, Nadia El Madani, Hicham Harhar, Bertrand Matthäus and Zoubida Charrouf (2016)**, "Étude de la composition chimique et évaluation de l'activité antioxydante de l'huile du cumin". SNDD international congress 2016 – Rabat, 19-20 Mai 2016.

**Ahmed Hajib, Issmail Nounah, Nadia El madani, Hicham Harhar, Bertrand Matthäus, and Zoubida Charrouf (2016)**, "Caractérisation chimique de la fraction lipidique du cumin marocain", 5th Edition of the FSR Doctorial 2016 - Rabat, 9, 10, 11 Mars 2016.



## Liste des tableaux

<b>Table 1.</b> Propriétés physico-chimiques des huiles végétales.....	- 6 -
<b>Table 2.</b> Exigences climatiques et édaphiques de la culture du cumin. ....	- 42 -
<b>Table 3.</b> Composition lipidique du cumin. ....	- 44 -
<b>Table 4.</b> Composition du cumin en acides aminés (les pourcentages ont été exprimés par rapport la masse totale du fruit du cumin).....	- 44 -
<b>Table 5.</b> Composition du cumin en vitamines (les teneurs ont été exprimées pour 100g de fruit). .....	- 45 -
<b>Table 6.</b> Composition minérale du cumin (les pourcentages ont été exprimés par rapport la masse totale du fruit du cumin). ....	- 46 -
<b>Table 7.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ spectroscopic data of <b>1-3</b> (DMSO- $d_6$ ; 500.13 Hz for $^1\text{H}$ and 125.77 for $^{13}\text{C}$ NMR; $\delta$ in ppm).....	- 79 -
<b>Table 8.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopic data of <b>4-6</b> (DMSO- $d_6$ ; 500.13 MHz for $^1\text{H}$ and 125.77 MHz for $^{13}\text{C}$ NMR; $\delta$ in ppm).....	- 81 -
<b>Table 9.</b> Calculated energies E (Hydrated-Dry) of compounds <b>1, 3,</b> and <b>6</b> in Kcal/mol. -	82 -
<b>Table 10.</b> Chemical composition of <i>Cuminum cyminum</i> L. and <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. essential oils.....	- 92 -
<b>Table 11.</b> Antioxidant activity of the essential oil of <i>Cuminum cyminum</i> L. and <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. species.....	- 95 -
<b>Table 12.</b> Antibacterial activity of the essential oil of <i>Cuminum cyminum</i> L. and <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. species.....	- 97 -
<b>Table 13.</b> Oil yield (%) and main fatty acid composition (%) of cumin seeds cultivated in different localities.....	- 104 -
<b>Table 14.</b> Reported average oil yield and fatty acid content (%) in cumin seed oil according to geographic origin. ....	- 105 -
<b>Table 15.</b> Tocopherol content of cumin seeds from different region (mg/100g).....	- 106 -
<b>Table 16.</b> Oxidative stability of cumin seeds from different region measured by Rancimat test at 110 °C.....	- 107 -
<b>Table 17:</b> Fatty acid composition (%) of <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L., fruits oil. ....	- 113 -
<b>Table 18:</b> Sterol composition (%) of <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. fruits oil. ....	- 115 -
<b>Table 19.</b> Tocopherol composition (mg/kg) of <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. fruits oil. -	115 -
<b>Table 20.</b> Oil yield (%) of Moroccan pomegranate seed oil. ....	- 122 -
<b>Table 21.</b> Fatty acid composition (%) of Moroccan pomegranate seeds oil.....	- 124 -
<b>Table 22.</b> Phytosterol composition (mg/100g) of Moroccan pomegranate seeds oil. ....	- 125 -
<b>Table 23.</b> Tocopherol composition (mg/100g) of Moroccan pomegranate seed oil. ....	- 127 -
<b>Table 24.</b> Oxidative stability (hour) of pomegranate seeds oil measured by Rancimat test at 120 °C. ....	- 128 -
<b>Table 25.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopic data of <b>7-9</b> (DMSO- $d_6$ ; 500.13 Hz for $^1\text{H}$ and 125.77 for $^{13}\text{C}$ NMR; $\delta$ in ppm).....	- 175 -
<b>Table 26.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ spectroscopic data of <b>10</b> and <b>11</b> (DMSO- $d_6$ ; 500.13 Hz for $^1\text{H}$ and 125.77 for $^{13}\text{C}$ NMR; $\delta$ in ppm).....	- 175 -
<b>Table 27.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ spectroscopic data of <b>12</b> (methanol- $d_4$ ; 500.13 Hz for $^1\text{H}$ and 125.77 for $^{13}\text{C}$ NMR; $\delta$ in ppm).....	- 176 -
<b>Table 28.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ spectroscopic data of <b>13</b> (methanol- $d_4$ ; 500.13 Hz for $^1\text{H}$ and 125.77 for $^{13}\text{C}$ NMR; $\delta$ in ppm).....	- 177 -
<b>Table 29.</b> $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ spectroscopic data of <b>14</b> (DMSO- $d_6$ ; 500.13 Hz for $^1\text{H}$ and 125.77 for $^{13}\text{C}$ NMR; $\delta$ in ppm).....	- 178 -

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Différents types des fruits des plantes oléagineuses .....	- 7 -
<b>Figure 2.</b> Réaction d'estérification du glycérol par trois acides gras.....	- 8 -
<b>Figure 3.</b> Exemple d'acide gras à chaîne courte, moyenne, et longue.....	- 9 -
<b>Figure 4.</b> Exemple d'acide gras saturé, monoinsaturé, et polyinsaturé.....	- 11 -
<b>Figure 5.</b> Exemple de nomenclature des acides gras.....	- 11 -
<b>Figure 6.</b> Structure chimique de 1,3-distéaryl phosphatidylcholine.....	- 12 -
<b>Figure 7.</b> Structure de base des stérols.....	- 13 -
<b>Figure 8.</b> Structure des tocophérols et des tocotriénols.....	- 14 -
<b>Figure 9.</b> Localisation des huiles essentielles chez les plantes.....	- 18 -
<b>Figure 10.</b> Structure de quelques monoterpènes.....	- 20 -
<b>Figure 11.</b> Structure de quelques sesquiterpènes.....	- 21 -
<b>Figure 12.</b> Structure de quelques composés aromatiques.....	- 21 -
<b>Figure 13.</b> Montage de l'hydrodistillation.....	- 24 -
<b>Figure 14.</b> Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	- 24 -
<b>Figure 15.</b> Montage d'hydrodiffusion.....	- 25 -
<b>Figure 16.</b> Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.....	- 27 -
<b>Figure 17.</b> Structure de quelques acides phénoliques.....	- 33 -
<b>Figure 18.</b> Exemple de structure des lignanes.....	- 33 -
<b>Figure 19.</b> Exemples de structure des coumarines.....	- 34 -
<b>Figure 20.</b> Exemples de structure des xanthones.....	- 34 -
<b>Figure 21.</b> Structure de base des flavonoïdes.....	- 35 -
<b>Figure 22.</b> Structure du penta-O-galloyl-D-glucose.....	- 36 -
<b>Figure 23.</b> Structure du prodelphinidol.....	- 37 -
<b>Figure 24.</b> Description en arabe de l'usage du cumin et de l'aneth date de 1334.....	- 39 -
<b>Figure 25.</b> Aspect morphologique du cumin.....	- 41 -
<b>Figure 26.</b> Aspect morphologique de l'espèce <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L.....	- 52 -
<b>Figure 27.</b> Fiche descriptive de la répartition géographique de l'espèce <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L.....	- 53 -
<b>Figure 28.</b> Structure chimique du D-limonène et du périllaldéhyde.....	- 54 -
<b>Figure 29.</b> Structure de l'Ammolactone-A.....	- 55 -
<b>Figure 30.</b> Description morphologique de l'espèce <i>Punica granatum</i> L.....	- 59 -
<b>Figure 31.</b> Structure des alcaloïdes extraites de l'écorce de la racine de l'espèce <i>Punica granatum</i> L.....	- 64 -
<b>Figure 32.</b> Structure de la tryptamine et de la sérotonine.....	- 65 -
<b>Figure 33.</b> HPLC profile of <i>A. leucotrichus</i> L. ethyl acetate extract. Profile was recorded with PDA (A), ELSD (B), and ESIMS in negative (C)- and positive (D)-ion modes. Peak numbering designates identified compounds <b>1-14</b> .....	- 75 -
<b>Figure 34.</b> Structures of isolated compounds <b>1-14</b> .....	- 76 -
<b>Figure 35.</b> Key 1H-1H COESY (red line) and HMBC (blue line) correlations in compounds <b>1</b> and <b>4</b> .....	- 82 -
<b>Figure 36.</b> Origine géographique du matériel végétal utilisé.....	- 131 -
<b>Figure 37.</b> Montage d'extraction par percolation.....	- 132 -
<b>Figure 38.</b> Montage d'hydrodistillation (Clevenger).....	- 133 -
<b>Figure 39.</b> Montage d'extraction par Soxhlet et Twisselman.....	- 134 -
<b>Figure 40.</b> Spectroscopie Résonance magnétique nucléaire.....	- 136 -
<b>Figure 41.</b> Chromatographe analytique en phase liquide à haute performance.....	- 136 -

<b>Figure 42.</b> Chromatographe en phase liquide à haute performance préparative et semi-préparative. ....	- 137 -
<b>Figure 43.</b> Spectromètre de masse à ionisation par électrospray haute résolution. ....	- 137 -
<b>Figure 44.</b> Séparation sur colonne à moyenne pression. ....	- 138 -
<b>Figure 45.</b> Séparation sur colonne Sephadex LH-20. ....	- 139 -
<b>Figure 46.</b> Experimental ECD Spectrum of Compound <b>12</b> in MeOH. ....	- 179 -
<b>Figure 47.</b> Experimental ECD Spectrum of Compound <b>13</b> in MeOH. ....	- 179 -
<b>Figure 48.</b> Experimental ECD Spectrum of Compound <b>14</b> in MeOH. ....	- 179 -
<b>Figure 49.</b> Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form global minima of compound <b>1</b> ...	- 180 -
<b>Figure 50.</b> Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form global minima of compound <b>3</b> ...	- 181 -
<b>Figure 51.</b> Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form global minima of compound <b>6</b> ...	- 182 -
<b>Figure 52.</b> <sup>1</sup> H-NMR Spectrum of Compound <b>1</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 183 -
<b>Figure 53.</b> <sup>13</sup> C-NMR Spectrum of Compound <b>1</b> (125.77 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 184 -
<b>Figure 54.</b> HSQC-DEPT Spectrum of Compound <b>1</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 185 -
<b>Figure 55.</b> <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY Spectrum of Compound <b>1</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	- 186 -
<b>Figure 56.</b> HMBC Spectrum of Compound <b>1</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	- 187 -
<b>Figure 57.</b> <sup>1</sup> H-NMR Spectrum of Compound <b>2</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 188 -
<b>Figure 58.</b> HSQC-DEPT Spectrum of Compound <b>2</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 189 -
<b>Figure 59.</b> <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY Spectrum of Compound <b>2</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	- 190 -
<b>Figure 60.</b> HMBC Spectrum of Compound <b>2</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 191 -
<b>Figure 61.</b> <sup>1</sup> H-NMR Spectrum of Compound <b>3</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 192 -
<b>Figure 62.</b> HSQC-DEPT Spectrum of Compound <b>3</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 193 -
<b>Figure 63.</b> <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY Spectrum of Compound <b>3</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	- 194 -
<b>Figure 64.</b> HMBC Spectrum of Compound <b>3</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 195 -
<b>Figure 65.</b> <sup>1</sup> H-NMR Spectrum of Compound <b>4</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 196 -
<b>Figure 66.</b> HSQC-DEPT Spectrum of Compound <b>4</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 197 -
<b>Figure 67.</b> <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY Spectrum of Compound <b>4</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	- 198 -
<b>Figure 68.</b> HMBC Spectrum of Compound <b>4</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 199 -
<b>Figure 69.</b> <sup>1</sup> H-NMR Spectrum of Compound <b>5</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 200 -
<b>Figure 70.</b> HSQC-DEPT Spectrum of Compound <b>5</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 201 -
<b>Figure 71.</b> <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY Spectrum of Compound <b>5</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	- 202 -
<b>Figure 72.</b> HMBC Spectrum of Compound <b>5</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 203 -
<b>Figure 73.</b> <sup>1</sup> H-NMR Spectrum of Compound <b>6</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 204 -
<b>Figure 74.</b> HSQC-DEPT Spectrum of Compound <b>6</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 205 -
<b>Figure 75.</b> <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY Spectrum of Compound <b>6</b> (500.13 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ). ....	- 206 -
<b>Figure 76.</b> HMBC Spectrum of Compound <b>6</b> (500.13 MHz for <sup>1</sup> H and 125.77 MHz for <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	- 207 -

## Abréviations

AL	: <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L.
ABTS	: Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).
AFNOR	: Association française de normalisation.
AGM	: Acide gras mono-insaturé.
AGP	: Acide gras polyinsaturé.
AGS	: Acide gras saturé.
BHA	: Hydroxyanisole butylé.
BHT	: Hydroxytoluène butylé.
CC	: <i>Cuminum cyminum</i> L.
CCM	: Chromatographie sur couche mince.
CE	: Cotton effect.
CLnAs	: Conjugated linolenic acids.
CMI	: Concentration minimale inhibitrice.
DF	: Diamètre de film.
DI	: Diamètre interne.
DMH	: 1,2-diméthyl hydrazine.
DMSO	: Diméthylsulfoxyde.
DPPH	: 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle.
ELSD	: Evaporative light scattering detector.
EO	: Essential oil.
ESI	: Ionisation par électronébuliseur
FID	: Détecteur à ionisation de flamme.
FRAP	: Test de réduction des ions ferriques.
GC	: Gas chromatography.

HE	: Huile essentielle.
HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haute performance.
ISO	: Organisation internationale de normalisation.
IUPAC	: Union internationale de chimie pure et appliquée.
CBM	: Concentration bactéricide minimale.
MeCN	: Acétonitrile.
MeOH	: Méthanol.
NMR	: Résonance magnétique nucléaire.
ORMVA	: Office régional de la mise en valeur agricole.
PDA	: Photometric Diode Array.
PE	: Pression d'élution.
PSO	: Pomegranate seed oil.
TE	: Trolox equivalent.
TFA	: Acide trifluoroacétique
TMCS	: Triméthylchlorosilane.
TMS	: Triméthylsilyle.
UV	: Ultra-violet.

# Table de matières

Introduction générale .....	1
Partie I : Etude bibliographique .....	4
Chapitre I : Généralité sur les lipides et les métabolites secondaires étudiés .....	5
I. Généralité sur les lipides .....	6
I.1. Introduction .....	6
I.2. Sources des lipides .....	6
I.3. Classification des lipides .....	7
I.4. Composition chimique des lipides .....	8
I.4.1. Constituants majeurs .....	8
I.4.2. Constituants mineurs .....	11
II. Généralité sur les huiles essentielles .....	16
II.1. Étymologies / Définitions .....	16
II.2. Propriétés physiques des huiles essentielles .....	16
II.3. Origine botanique des huiles essentielles .....	17
II.4. Rôle des huiles essentielles dans la plante .....	19
II.5. Composition chimique des huiles essentielles .....	19
II.5.1. Terpènes .....	19
II.5.2. Composés aromatiques .....	21
II.5.3. Composés d'origines diverses .....	22
II.6. Techniques d'extraction des huiles essentielles .....	22
II.6.1. Techniques d'extraction traditionnelle .....	22
II.6.2. Méthodes innovantes d'extraction des huiles essentielles .....	26
II.7. Méthodes d'analyse chimique des huiles essentielles .....	27
II.8. Conservation et stockage des huiles essentielles .....	28
II.9. Utilisation des huiles essentielles .....	28
II.10. Toxicité des huiles essentielles .....	29
III. Généralités sur les composés phénoliques .....	31
III.1. Rôle et intérêt des composés phénoliques .....	31
III.2. Classification des composés phénoliques .....	32
III.2.1. Acides phénoliques .....	32
III.2.2. Lignanes .....	33
III.2.3. Coumarines .....	34
III.2.4. Xanthones .....	34
III.2.5. Flavonoïdes .....	34
III.2.6. Tanins .....	36
Chapitre II : Généralité sur les plantes étudiées ( <i>Cuminum cyminum</i> L., <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. et <i>Punica granatum</i> L.) .....	38
I. Généralité sur l'espèce <i>Cuminum cyminum</i> L. (Cumin) .....	39
I.1. Introduction .....	39
I.2. Classification systématique .....	40
I.3. Morphologie de la plante .....	40
I.4. Exigences climatiques et édaphiques de la culture du cumin .....	41
I.5. Répartition, production et commercialisation du cumin dans le monde .....	42
I.6. Répartition, production et commercialisation du cumin au Maroc .....	43

I.7. Composition chimique du cumin .....	43
I.8. Propriétés du cumin.....	46
I.9. Utilisation du cumin.....	49
II. Généralité sur l'espèce <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. (Cumin Essoufi) .....	51
II.1. Classification systématique.....	51
II.2. Description morphologique de la plante .....	51
II.3. Répartition géographique .....	52
II.4. Utilisation traditionnelle de la plante .....	53
II.5. Composition chimique .....	53
II.6. Propriétés de l'espèce <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. ....	55
III. Généralité sur l'espèce <i>Punica granatum</i> L. (Grenadier).....	57
III.1. Introduction .....	57
III.2. Classification du grenadier .....	57
III.3. Description botanique .....	58
III.4. Répartition et production du grenadier .....	60
III.5. Usage du grenadier en médecine traditionnelle .....	62
III.6. Composition chimique du grenadier .....	64
III.7. Propriétés thérapeutiques des grenades .....	66
<b>Partie II : Résultats et discussions .....</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre I : Séparation, isolation et élucidation structurale des nouveaux dérivés de l'amide d'acide caféique à partir de l'espèce <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. (Apiaceae) .....</b>	<b>69</b>
1. Introduction .....	73
2. Experimental section (voir partie 3) .....	74
3. Results and Discussion .....	74
4. Conclusion .....	85
<b>Chapitre II : Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle des deux espèces <i>Cuminum cyminum</i> L. et <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. ....</b>	<b>86</b>
1. Introduction .....	90
2. Experimental section (voir partie 3) .....	91
3. Results and Discussion .....	91
3.1. Chemical composition of essential oil .....	91
3.2. Antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP, $\beta$ -carotene bleaching) .....	94
3.3. Antibacterial activity .....	95
4. Conclusion .....	97
<b>Chapitre III : Étude de la composition chimique de la fraction lipidique de l'espèce <i>Cuminum cyminum</i> L. comme marqueur de l'origine géographique .....</b>	<b>98</b>
1. Introduction .....	101
2. Experimental section (voir partie 3) .....	103
3. Results and Discussion .....	103
3.1. Oil content .....	103
3.2. Fatty acids composition .....	104
3.3. Tocopherol composition .....	105

3.4. Oxidative stability .....	106
4. Conclusion .....	107
<b>Chapitre VI : Fraction lipidique de l'espèce <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. comme source naturelle importante de l'acide pétroselinique .....</b>	<b>108</b>
1. Introduction .....	111
2. Experimental section (voir partie 3) .....	112
3. Results and Discussion .....	112
3.1. Extraction yield .....	112
3.2. Fatty acids composition .....	113
3.3. Sterol composition .....	114
3.3 Tocopherol composition .....	115
4. Conclusion .....	116
<b>Chapitre V : Profil lipidique stabilité oxydative de l'huile de grenade marocaine (<i>Punica granatum</i> L.) 'Sefri' .....</b>	<b>117</b>
1. Introduction .....	120
2. Experimental section (voir partie 3) .....	122
3. Results and Discussion .....	122
3.1. Oil content .....	122
3.2. Fatty acids composition .....	122
3.3. Sterol composition .....	124
3.4. Tocopherol composition .....	126
3.5. Oxidative stability .....	127
4. Conclusion .....	128
<b>Partie III : Partie expérimentale .....</b>	<b>129</b>
<b>Chapitre I : Matériel végétal et méthodes d'extraction .....</b>	<b>130</b>
1. Origine du matériel végétal .....	130
1.1. Échantillonnage et période de récolte.....	130
1.2. Identification botanique .....	131
1.3. Stockage des plantes .....	132
2. Protocole d'extraction .....	132
2.1. Préparation des extraits de l'espèces <i>Ammodaucus leucotricus</i> L. par percolation .....	132
2.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation .....	133
2.3. Extraction de la fraction lipidique .....	134
<b>Chapitre II : Isolation et élucidation structurale de nouveaux dérivés phénoliques à partir des fruits de l'espèces <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. ....</b>	<b>135</b>
1. Solvants et réactifs .....	135
2. Spectroscopie Résonance magnétique nucléaire/RMN .....	135
3. Analyse chromatographie en phase liquide à haute performance .....	136



4. Analyse chromatographie en phase liquide à haute performance préparative et semi-préparative .....	137
5. Spectrométrie de masse à ionisation par électrospray haute résolution .....	137
6. Colonnes .....	138
7. Fractionnement sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle .....	138
8. Séparation et purification des dérivés phénoliques .....	139
9. Analyse des sucres .....	141
10. Molecular modeling .....	141
<b>Chapitre III : Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle des deux espèces <i>Cuminum cyminum</i> L. et <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. ....</b>	<b>143</b>
1. Composition chimique des huiles essentielles .....	143
1.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme .....	143
1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse .....	144
2. Activité antioxydante des huiles essentielles .....	144
2.1. Activité de piégeage des radicaux DPPH .....	145
2.2. Test de réduction du cation-radical ABTS .....	145
2.3. Test de réduction des ions ferriques .....	147
2.4. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène .....	147
3. Activité antibactérienne des huiles essentielles .....	149
<b>Chapitre IV : Étude de la fraction lipidique des espèces <i>Cuminum cyminum</i> L., <i>Ammodaucus leucotrichus</i> L. et <i>Punica granatum</i> L. ....</b>	<b>150</b>
1. Analyse de la composition en acide gras.....	150
2. Analyse de la composition en stérols .....	151
3. Analyse de la composition en tocophérols .....	152
4. Évaluation de la stabilité oxydative par Rancimat .....	152
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>154</b>
<b>Références .....</b>	<b>160</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>173</b>

# **Introduction générale**

## Introduction générale

La situation géographique du Maroc et la diversité de son relief lui confèrent une flore riche et diversifiée. Elle compte environ 7000 espèces connues. La flore vasculaire compte environ 4500 espèces, appartenant à 940 genres et 135 familles. Cette situation géographique fait que le taux des plantes endémiques dépasse 900 espèces. En revanche près de la moitié d'espèces sont rares ou menacées. Le présent travail de recherche s'intéresse à la valorisation phytochimique de trois plantes des zones arides et semi-arides du Maroc. Il s'agit d'*Ammodaucus leucotrichus* L. (Apiacées), *Cuminum cyminum* L. (Apiacées) et *Punica granatum* L. (Punicacées).

Les trois plantes choisies pour notre étude (*Ammodaucus leucotrichus*, *Cuminum cyminum* et *Punica granatum*) sont des plantes rustiques des zones arides et semi-arides du Maroc. Elles sont connues par leurs propriétés thérapeutiques, dans la médecine traditionnelle marocaine, notamment pour le traitement des troubles liés au système digestif. Ces trois plantes sont considérées comme des produits de terroir au Maroc grâce aux revenus qu'elles génèrent aux populations locales des zones éloignées.

Le cumin essoufi (*Ammodaucus leucotrichus* L.), appartenant à la famille des Apiacées, est une espèce endémique du Nord d'Afrique. Au Maroc, la plante est classée parmi les espèces rares et menacées. Selon les études ethnobotaniques décrites dans la littérature, la plante est très utilisée en médecine traditionnelle marocaine, notamment pour le traitement de certains troubles, en particulier de l'appareil digestif et le diabète. Cependant, très peu d'études scientifiques se sont intéressées à la mise en évidence de l'intérêt phytochimique et biologique de cette plante. En effet, la plupart des recherches phytochimiques sur *A. leucotrichus* se sont

intéressées à l'identification de la composition chimique de la fraction volatile et leur pouvoir antimicrobien, antitumoral et anticorrosif.

Le cumin (*Cuminum cyminum* L.), appartenant aussi à la famille des Apiacées, est une des herbes les plus anciennes cultivées en Asie, en Afrique et en Europe. C'est un ingrédient très important dans le monde culinaire. Il est considéré comme l'épice la plus populaire. Les fruits de cumin sont très utilisés en médecine traditionnelle depuis l'antiquité, dans des zones géographiques différentes. Les substances actives présentes dans cette épice ont attiré l'attention des chercheurs du monde entier, afin de valider expérimentalement ces utilisations thérapeutiques (stomachique, carminatif, antispasmodique, vermifuge, emménagogue, ...etc).

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est une espèce fruitière pérenne tolérante à la sécheresse et capable de valoriser les sols pauvres et salins. Sur le plan environnemental, il joue un rôle très important dans la protection, la restauration et la fixation des sols. Le grenadier est largement utilisé en médecines traditionnelles pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. La plante est connue également pour le traitement de l'anémie, des courbatures dans les convalescences, de la migraine, des diarrhées chroniques, des frissons fébriles, ...etc.

À l'exception de l'étude publiée par Muckensturm et al. (1997), aucun travail scientifique concernant l'isolement des composés bioactifs des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* L., n'a été publié à ce jour. En plus, aucune étude scientifique publiée n'a décrit la composition lipidique des variétés produites au Maroc des espèces : *Ammodaucus leucotrichus* L., *Cuminum cyminum* L. et *Punica granatum* L.

Dans ce cadre, l'Équipe de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bio-organique (ECPSOB) de la faculté des sciences de Rabat, sous la direction du Professeur

**Zoubida Charrouf** et **Khalid Bougrin**, s'est fixé comme objectif de contribuer à la valorisation des espèces *Ammodaucus leucotrichus* L., *Cuminum cyminum* L. et *Punica granatum* L.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un cadre de collaboration entre le Laboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bio-organique de la faculté des sciences de Rabat avec le laboratoire de biologie pharmaceutique à l'université de Bâle en Suisse et le laboratoire des lipides à l'Institut fédéral de recherche, Max Rubner Institut (MRI).

Ce mémoire de thèse est organisé en trois grandes parties :

- Dans la première partie, nous relatons dans le premier chapitre un aperçu sur les huiles végétales, les huiles essentielles et les composés phénoliques. Ensuite, nous aborderons dans le deuxième chapitre les différentes connaissances bibliographiques sur les trois plantes étudiées.

- La deuxième partie concernera nos résultats expérimentaux et la discussion. Elle est divisée en cinq chapitres qui décrivent successivement :

1. Séparation, isolation et élucidation structurale des nouveaux dérivés de l'amide d'acide caféique à partir des fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L.

2. Étude de la composition chimique et des activités biologiques de l'huile essentielle des deux espèces *Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L.

3. Étude de la composition chimique de la fraction lipidique de l'espèce *Cuminum cyminum* L. comme marqueur de l'origine géographique.

4. Étude de la fraction lipidique de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. comme source naturelle importante de l'acide pétroselinique.

5. Les résultats relatifs à l'étude du profil lipidique et de la stabilité oxydative de l'huile du grenadier.

- La troisième partie sera consacrée aux matériels qui ont été utilisés au cours de cette étude, ainsi que les méthodes suivies pour la réalisation de notre travail.

# **Partie 1 : Étude bibliographique**

# **Chapitre I : Généralité sur les lipides et les métabolites secondaires étudiés**

## **I. Généralité sur les lipides**

### **I. 1. Introduction**

Depuis toujours, les lipides ont été utilisés par l'homme dans son quotidien, pour préparer ses repas, dans certaines préparations thérapeutiques, pour l'éclairage avec les lampes à huile, pour la production du savon, ...etc. Ils se trouvent à l'état naturel, dans le règne animal (les graisses), et végétal (les huiles fixes). Les lipides sont des substances organiques hétérogènes, caractérisés par leur solubilité nulle ou faible dans l'eau. En revanche, elle est élevée dans les solvants organiques apolaires, voire peu polaires, tels que l'hexane, l'éther de pétrole, le chloroforme, ...etc. Les deux termes ; huile et graisse, ne désignent que l'état physique du corps gras à température ambiante. Les huiles sont généralement liquides, par contre les graisses sont pâteuses ou solide (Mead, 1986; Moussard, 2006; Voet and Voet, 2016). Le tableau ci-dessous regroupe les propriétés physico-chimiques des lipides :

**Table 1.** Propriétés physico-chimiques des huiles végétales.

<b>Propriétés</b>	<b>Descriptions</b>
Etat physique	Les huiles végétales « liquides », Les graisses animales « solides ».
Température de fusion	Augmente avec le nombre de carbone, et diminue avec le nombre d'insaturation.
Couleur	Généralement colorées.
Volatilité	Non volatile.
Solubilité	Soluble dans les solvants organiques apolaires, et insoluble dans l'eau.
Densité	Inférieure à un.

### **I. 2. Sources des lipides**

La plupart des espèces végétales peuvent produire de l'huile végétale. Cependant, nous réservons l'appellation de plantes oléagineuses, aux espèces qui ont une forte teneur en matières grasses (olivier, arganier, colza, soja, araches, ...etc). Les lipides végétaux se



localisent essentiellement, au niveau du fruit de ces plantes. On distingue trois types des plantes oléagineuses (Gurr et al., 2016) :

- Oléagineux à mésocarpe riche en huile végétale (avocatier, olivier, palmier, ...etc).
- Oléagineux à coque et aux noix riche en huile végétale (arachide, arganier, cocotier, ...etc).
- Oléagineux à graine riche en huile végétale (cotonnier, colza, sésame, tournesol, cumin, ...etc).



**Figure 1.** Différents types des fruits des plantes oléagineuses

### ***I. 3. Classification des lipides***

La classification des lipides selon la structure chimique, s'appuie principalement sur la nature des groupements atomiques, qui constituent leur squelette. Ceci nous amène à distinguer deux principales familles des lipides, les homolipides et les hétérolipides (Gharby, 2012):

- Lipides simples ou homolipides (C, H, O) ; ce sont des esters d'acides gras et d'un alcool (glycérol, alcool aliphatique, ou stérol). Cette catégorie regroupe les triglycérides, les cérides, et les stérides.
- Lipides complexe ou hétérolipides (C, H, O, N, P, S, ...etc) ; ce sont des esters d'acides gras et d'un alcool, associées à d'autres molécules. Cette catégorie regroupe les phospholipides, les glycérophospholipides, et les sphingolipides.

## ***I. 4. Composition chimique des lipides***

Contrairement aux autres familles de métabolites primaires, comme les protéines ou les sucres, qui sont relativement homogènes ; d'un point de vue chimique. Les lipides, qu'ils soient d'origine animale ou végétale, sont un ensemble hétérogène de composés. Leurs structures chimiques et les propriétés physico-chimiques sont très différentes (Graille, 2003).

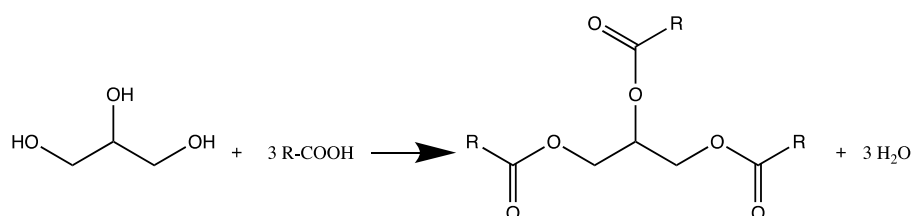
Les composés lipidiques sont principalement composés de triglycérides (95–99 %), eux-mêmes constitués essentiellement d'ester acides gras et de glycérol (90–95 %). Les constituants mineurs naturels (1–5 %) regroupant des composés de structure variées, tels que les stérols, les tocophérols, les caroténoïdes et les phospholipids (Gharby, 2012).

### **I. 4. 1. Constituants majeurs**

La fraction majeure des corps gras est principalement représentée par les triglycérides et les acides gras.

#### ***I. 4. 1. 1. Triglycérides***

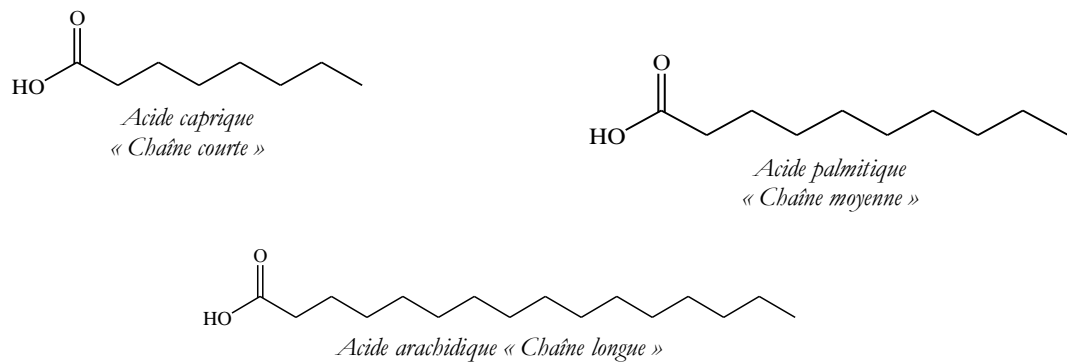
Les triglycérides (ou triacylglycérols) constituent la masse essentielle des corps gras (95 % à 99 %). Ils résultent de l'estérification des trois fonctions alcools du glycérol, par trois acides gras. Ils peuvent être homogènes lorsque les molécules d'acides gras sont identiques, et hétérogènes ou mixtes dans le cas contraire. Selon la combinaison et l'assemblage, des acides gras avec le glycérol, le triglycéride peut avoir des structures différentes : monoacide, symétrique ou asymétrique (Voet and Voet, 2016).



**Figure 2.** Réaction d'estérification du glycérol par trois acides gras.

### I. 4. 1. 2. Acides gras

Les lipides se définissent essentiellement par leur composition en acides gras. En fait, ce sont des acides organiques faibles, qui ne possèdent qu'une seule fonction carboxylique. Ils existent rarement à l'état libre dans la nature et ils se trouvent essentiellement sous la forme estérifiée. Ils représentent environ 90 à 96 % de la masse moléculaire des lipides totaux. Généralement, les acides gras possèdent une chaîne de carbone, aliphatique, hydrophobe et à nombre pair (4 à 24 atomes). Selon le nombre de carbones, on parle de chaîne courte (4 à 8), moyenne (10 à 14) ou longue (16 à 24) (Weil et al., 2001).



**Figure 3.** Exemple d'acide gras à chaîne courte, moyenne, et longue.

Une chaîne d'acide gras peut contenir jusqu'à six doubles liaisons ou insaturations. Ceci permet de distinguer trois classes d'acides gras : les acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGM) et polyinsaturés (AGP) (Gurr et al., 2016; Mead, 1986; Moussard, 2006; Weil et al., 2001).

- Les acides gras saturés (AGS), chaînes hydrocarbonées sans double liaison, de formules chimiques  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ .

Les acides gras saturés les plus répandus dans la nature sont l'acide palmitique (C16:0 - cette abréviation signifie 16 atomes de carbone et aucune double liaison), l'acide stéarique

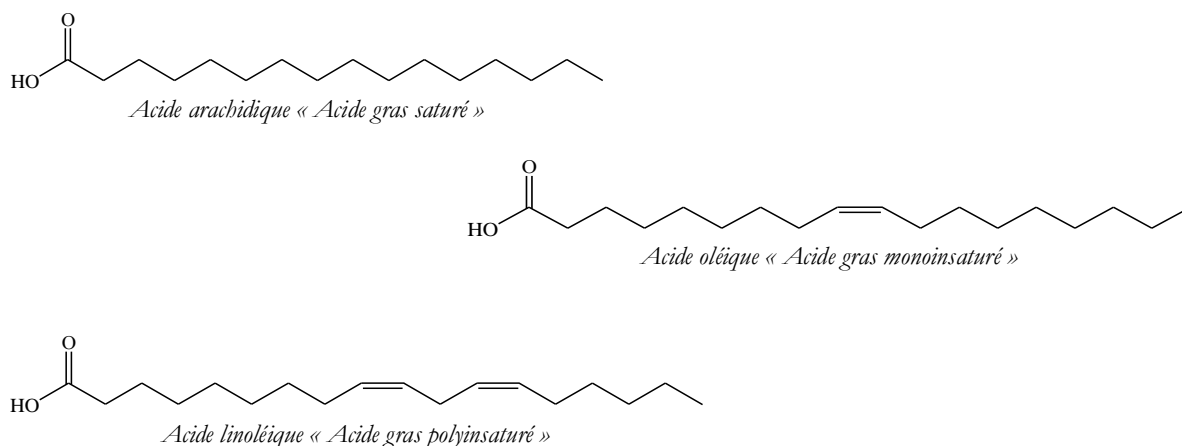
(C18:0) et, en second lieu, l'acide myristique (C14:0) et l'acide laurique (C12:0). Les acides gras saturés proviennent essentiellement des lipides d'origine animale, qui sont également riches en cholestérol.

Les acides gras mono-insaturés (AGMI), chaînes hydrocarbonées comportant une double liaison, d'une formule chimique générale :  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_y - \text{COOH}$ .

Les acides gras mono-insaturés le plus fréquemment rencontrés dans les aliments sont l'acide oléique C18:1,n-9 (cette abréviation signifie 18 atomes de carbone et 1 double liaison numérotée à partir de l'extrémité portant le groupe méthyle) qui représente 30 % des acides gras apportés par l'alimentation, et l'acide palmitoléique (C16:1,n-9) (Sonntag 1979).

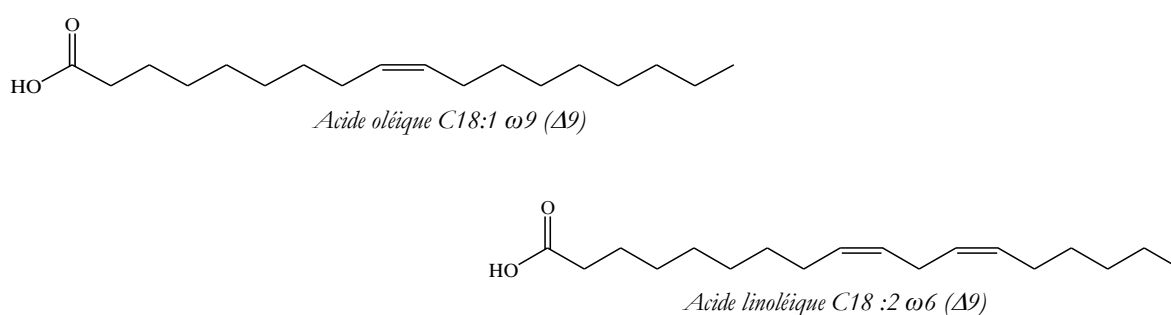
- *Les acides gras polyinsaturés* (AGPI) sont des acides gras dont la chaîne hydrocarbonée comprend au moins 2 doubles liaisons. Il existe 2 familles, les AGPI de la série n-6 (ou oméga 6) et ceux de la série n-3 (ou oméga 3). La différence entre les 2 familles vient de la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle terminal de l'acide gras qui se situe entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> carbone pour les AGPI n-3, et entre le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> carbone pour les AGPI n-6.

Les acides gras polyinsaturés les plus importants et les plus répandus sont l'acide linoléique (C18 : 2 (9,12)) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18 : 3 (9, 12, 15)). Ils appartiennent respectivement à la famille des  $\omega$ -6 et des  $\omega$ -3. L'acide linoléique est l'acide gras polyinsaturé le plus distribué et le plus abondant. Il est également un acide gras essentiel. Présent dans les huiles végétales, sa teneur moyenne varie : 40% dans l'huile de tournesol, 52% dans l'huile de coton, 51% dans l'huile de soja, 58% dans l'huile de maïs, 41% dans l'huile de sésame.



**Figure 4.** Exemple d'acide gras saturé, monoinsaturé, et polyinsaturé.

La commission de la nomenclature biochimique a fixé des règles de la nomenclature des acides gras. En fait, selon l'IUPAC (1968) un acide gras est symbolisé par  $C_x : y \Delta_z$ , où  $x$  est le nombre d'atomes de carbone,  $y$  est le nombre de doubles liaisons, et  $z$  représente la position de la première double liaison par rapport la fonction carboxylique. En 1978, une deuxième nomenclature des acides gras a été mise en évidence, c'est la nomenclature des biochimistes ou la nomenclature  $\omega$ . Selon cette dernière, la détermination de la position de la première double liaison s'effectue par rapport au méthyl terminal.



**Figure 5.** Exemple de nomenclature des acides gras.

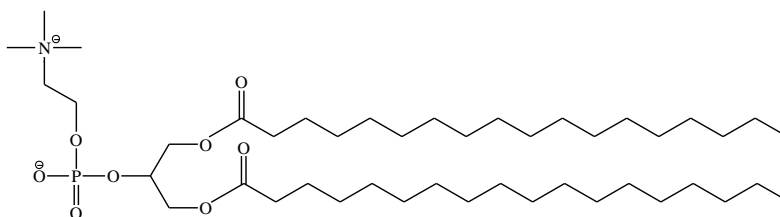
#### I. 4. 2. Constituants mineurs

Comme leur nom l'indique, les constituants mineurs des huiles végétales représentent une fraction, dont le pourcentage est minimal. Cependant, ce sont des composés importants,

par le rôle qu'ils jouent dans le métabolisme et la structure cellulaire. Ils sont représentés principalement par les phospholipides, les cérides et les produits insaponifiables (Gharby, 2012).

#### *1. 4. 2. 1. Phospholipides*

Les phospholipides sont des diesters d'acides gras et de glycérol, dont la troisième fonction alcoolique est liée à un acide phosphorique, qui lui-même peut être associé à un sucre, une base azotée ou un acide aminé. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles (hydrophilie liée à la fonction aminée ou phosphore et hydrophobie liée aux acides gras), ceci leur offre des propriétés émulsifiantes. En raison de leur polarité, les phospholipides jouent un rôle majeur dans la constitution des interfaces membranaires, du transporteur d'acides gras (Gurr et al., 2016).



**Figure 6.** Structure chimique de 1,3-distéaryl phosphatidylcholine.

#### *1. 4. 2. 2. Glycérides partiels*

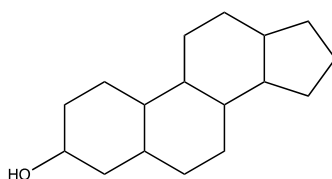
Ces molécules sont des mono ou des diesters de glycérol et d'acides gras provenant de l'hydrolyse partielle des triglycérides ; leur(s) fonction(s) alcool libre(s) leur confère(nt) une certaine hydrophilie et des propriétés émulsifiantes (Gharby, 2012).

#### *1. 4. 2. 3. Insaponifiables*

La fraction insaponifiable des huiles végétales, est obtenue après hydrolyse basique (saponification). Elle est très peu soluble dans l'eau, mais soluble dans des solvants traditionnels des corps gras (cyclohexane, éther éthylique, acétone, ...etc).

### a. Stérols

Les stérols sont des corps gras naturellement présents en petites quantités dans la fraction lipidique des graines oléagineuses. Ce sont des molécules complexes à haut poids moléculaire, comportant une fonction alcool, trouvée à l'état libre ou estérifiée par un acide gras. Ces alcools dérivent du noyau stéroïde constitué de 4 cycles et une chaîne latérale. Cette catégorie de molécule représente environ 30 à 60%, de la fraction insaponifiable (Voet and Voet, 2016).



**Figure 7.** Structure de base des stérols.

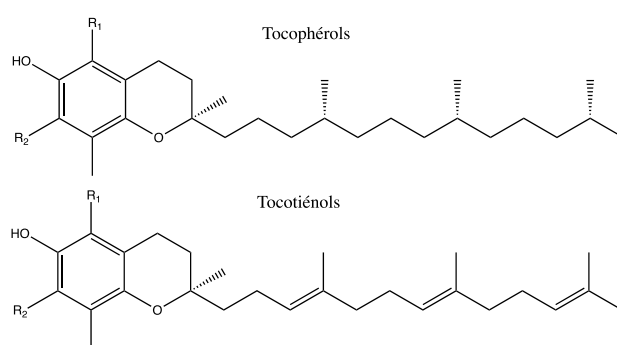
Les stérols d'origine animale sont appelés zoostérols. Parmi eux, le cholestérol est le principal stérol des vertébrés apporté par une alimentation carnée comme la viande, les produits laitiers, les œufs. Les graisses d'origine végétale contiennent des phytostérols tels que le  $\beta$ -sitostérol présent dans toutes les huiles végétales (olive, soja, tournesol, colza. Arachide, ...etc), le  $\Delta^7$ -stigmastérol trouvé en quantité significative dans l'huile de tournesol, le brassicastérol dans les huiles de colza. Quant à l'huile d'argane, elle contient une fraction stérolique originale, car elle est constituée des  $\Delta^7$ -stérols. Elle est composée principalement du spinastérol et du schotténol (Graille, 2003).

La fonction biologique des stérols chez les plantes est identique à celle du cholestérol chez l'homme. Ils jouent le rôle de maintenir la structure et le fonctionnement des membranes cellulaires. Chez l'homme, les stérols d'origine végétale bloquent partiellement l'absorption du cholestérol et contribuent à réduire le mauvais cholestérol (LDL) dans le sang. Parmi les différents phytostérols, le  $\beta$ -sitostérol a été le plus étudié en ce qui concerne ses effets bénéfiques et physiologiques sur la santé humaine. En outre, le  $\beta$ -sitostérol abaisse le taux de

cholestérol, il renforce le système immunitaire et possède également des effets anti-inflammatoires, antipyrétiques et anti-cancérigènes (prostate essentiellement) (Graille, 2003).

### b. Tocophérols

Les tocophérols désignent un ensemble de molécules composées d'un noyau chromane hydroxylé, lui-même attaché à une chaîne latérale à 16 atomes de carbone, de structure isoprénique. La chaîne carbonée existe sous deux formes : une forme comprenant trois insaturations : ce sont les tocotriénols et la forme totalement saturée qui caractérise les tocophérols (Vance and Vance, 2008).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
α-tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-tocophérol	CH <sub>3</sub>	H
γ-tocophérol	H	CH <sub>3</sub>
δ-tocophérol	H	H
α-tocotriénol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-tocotriénol	CH <sub>3</sub>	H
γ-tocotriénol	H	CH <sub>3</sub>
δ-tocotriénol	H	H

**Figure 8.** Structure des tocophérols et des tocotriénols.

Ces composés sont connus par leur activité antioxydante ; responsable de la conservation des huiles végétales. Ils possèdent également certaines propriétés thérapeutiques et antioxydantes grâce à leur capacité à piéger les radicaux libres. En plus, ces composés peuvent constituer un critère analytique pour le contrôle de la pureté d'une huile (Gurr et al., 2016).



Le pouvoir vitaminique des tocophérols est lié à la teneur en  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E). Ce tocophérol est le plus fréquent dans la nature et le plus actif biologiquement. Le  $\beta$  et  $\gamma$ -tocophérols ont une activité vitaminique réduite (respectivement 30 et 15 % environ de l'activité de la forme alpha), le  $\delta$ -tocophérol est pratiquement inactif. Il est connu que le  $\delta$ -tocophérol à l'activité antioxydante la plus élevée. C'est pourquoi il est convenu d'exprimer la teneur en vitamine E en  $\alpha$ -tocophérol équivalent ( $\alpha$ -Tocophérol). Il existe aussi dans la nature des composés voisins des tocophérols, les tocotriénols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$ ) dont deux ( $\alpha$  et  $\beta$ ) possèdent une certaine activité vitaminique (respectivement 20 et 5 % environ de l'activité de la forme  $\alpha$ -tocophérol). Le terme tocots regroupe tocophérols et tocotriénols (Graille, 2003; Gurr et al., 2016).

Ils se trouvent en quantité notable dans les huiles végétales (tournesol, maïs, soja, colza). Leur teneur varie de 200 à 1200 mg/kg dans les huiles végétales et de 10 à 20 mg/kg dans les graisses animales (Graille, 2003).

#### *c. Pigments*

Les caroténoïdes et les chlorophylles sont des substances à caractère lipophile, contribuant à la couleur des huiles végétales. Ces pigments naturels sont éliminés en grande partie par le raffinage (Christian Ngakegni-Limbili, 2012).

#### *d. Cires*

Les cires sont des esters d'acides gras, et de monoalcools aliphatiques (alcools gras principalement). Chez les végétaux, elles contribuent à la formation de pellicules protectrices des graines et des fruits. Il en existe aussi dans le règne animal (principalement cétacés et poissons). Dans les huiles, surtout le tournesol, leur présence est responsable de l'apparition de trouble, par début de cristallisation à basse température ou à température ambiante (Gurr et al., 2016; Vance and Vance, 2008).

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

### ***II. 1. Étymologies / Définitions***

Le terme huile essentielle est une contraction du nom original huile quintessentielle. Cela provient de l'idée d'Aristote que la matière est composée de quatre éléments qui sont : le feu, l'eau, l'air et la terre. Le cinquième composant qui est la quintessence était considéré l'esprit de la force de la vie. La distillation et l'évaporation étaient révélées comme des processus pour séparer l'esprit de sa plante. De nos jours, nous savons bien que les huiles essentielles, loin d'être un esprit, ont une nature physique et se composent d'un mélange complexe de molécules chimiques (Bray, 2005; Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2012; Lardry and Haberkorn, 2007).

D'après la pharmacopée européenne, une huile essentielle est « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécaniquement approprié sans chauffage ». Cependant, cette définition reste considérée restrictive, la définition qui semble universelle et acceptée est celle donnée par AFNOR. En fait, selon la norme AFNOR NF T 75 - 006 (2000) les huiles essentielles sont « des produits obtenus à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

### ***II. 2. Propriétés physiques des huiles essentielles***

Les huiles essentielles sont généralement présentes à de très faible concentration dans les plantes aromatiques. Elles sont liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, saffras et vétiver), volatiles, rarement colorées. Elles sont peu solubles dans l'eau, mais solubles dans les huiles végétales et les solvants organiques ; leur lipophilie leur confère une

excellente biodisponibilité notamment par voie cutanée (Bray, 2005; Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2012; Lardry and Haberkorn, 2007).

Les huiles essentielles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dérivent la lumière polarisée. Elles ne contiennent pas les corps gras comme les huiles végétales. Le terme « huile » s'explique par leur caractère hydrophobe. En fait, La ressemblance des huiles essentielles, avec les huiles grasses se limite au caractère de solubilité (Bray, 2005; Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2012; Lardry and Haberkorn, 2007).

### ***II. 3. Origine botanique des huiles essentielles***

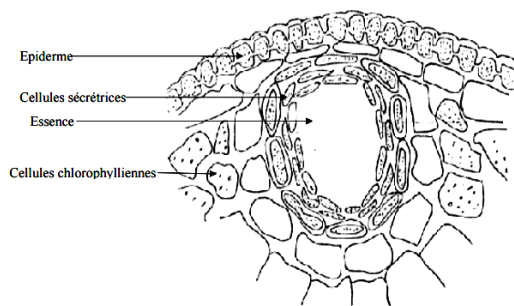
Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal. En effet, selon Bruneton les huiles essentielles n'existent quasiment que dans les plantes supérieures. À peu près 10% des plantes connues contiennent des huiles essentielles, soit environ 17500 espèces. Parmi les familles végétales qui regroupent beaucoup de plantes à HE, on trouve notamment les Lamiaceae (lavandes, marjolaines, thym), les Apiaceae (carvi, carotte), les Asteraceae (absinthe), les Poaceae (citronnelles), les Zingiberaceae (gingembre), les Myrtaceae (eucalyptus), les Rutaceae (citron, orange, bergamot), les Pinaceae (pins), les Cupressaceae (génévrier) ou encore les Lauraceae (cannelles) (El Haib, 2011; Nejia, 2013).

Les HE peuvent être issues de nombreux organes végétaux. Elles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante : les fleurs (tubéreuse), les feuilles (eucalyptus), les écorces (cannelier), les bois (bois de rose), les racines (angélique) et les rhizomes (gingembre). La teneur en huiles essentielles et même la composition de ces dernières varient également selon l'organe de la plante duquel elles sont extraites. Ainsi, les HE issues d'une même plante mais extraites de différents organes sont des entités distinctes. A titre d'exemple : les HE de néroli, de bigaradier et d'oranger amer proviennent toutes les trois de la même plante, *Citrus aurantium* var. *amara*. L'HE de néroli est extraite des fleurs, celle de petit grain bigaradier des

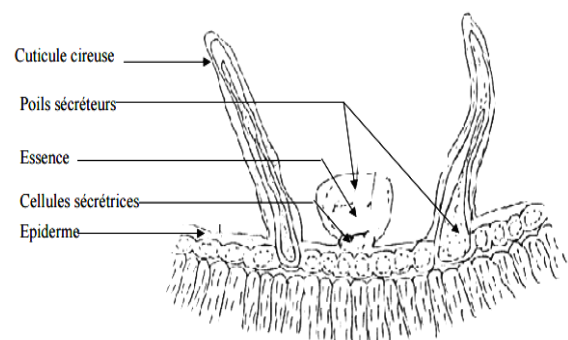
feuilles et celle d'orange amère des zestes. Les propriétés de ces huiles sont différentes (Svoboda et al., 2000).

Les huiles essentielles se synthétisent dans le cytosol des cellules où, soit elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles, soit elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques, ou dans les cellules du mésophile de nombreux pétales (Svoboda et al., 2000).

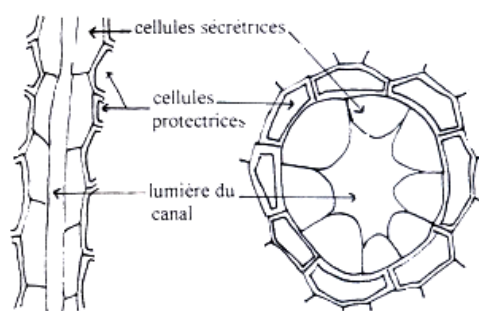
D'autres structures histologiques spécialisées sont impliquées dans l'accumulation des huiles essentielles. Ces structures sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Elles regroupent les poils, les canaux sécréteurs et les poches sécrétrices (Svoboda et al., 2000).



*Poche glandulaire endogène d'une feuille de rue fétide (Rutacées)*



*Poils sécréteurs externe d'une feuilles da la verveine (verbénacées)*



*Coupe transversal et longitudinale d'un canal sécréteur*

**Figure 9.** Localisation des huiles essentielles chez les plantes.

## ***II. 4. Rôle des huiles essentielles dans la plante***

Il y a beaucoup de spéculation au sujet de la fonction biologique des huiles essentielles chez les plantes. En tant que produits du métabolisme secondaire de la plante, les huiles essentielles sont considérés comme des substances n'ayant aucun rôle dans les aspects fondamentaux du développement de la plante. Par contre, le rôle de certains constituants de ces huiles a été expérimentalement établi aussi bien au niveau des interactions végétal-végétal, que dans celui des interactions végétal-animal. A titre d'exemple, la réduction de la compétition des autres espèces (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par le goût désagréable et l'effets défavorables sur le système nerveux (El Haib, 2011).

Certains auteurs pensent que la plante utilise les huiles essentielles pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres les considèrent comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Nejia, 2013).

## ***II. 5. Composition chimique des huiles essentielles***

Une HE ne saurait être considérée comme une entité monolithique ; elles sont composées d'une myriade de molécules de familles chimiques très distinctes qui ont toutes leurs propres propriétés. De point de vue chimique, les huiles essentielles représentent le groupe le plus hétérogène. On y trouve divers composés appartenant de manière quasi-exclusive à deux grandes classes d'origine biogénétique distincte, il s'agit de la classe des terpènes et de la classe des composés aromatiques (Bray, 2005; Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2012).

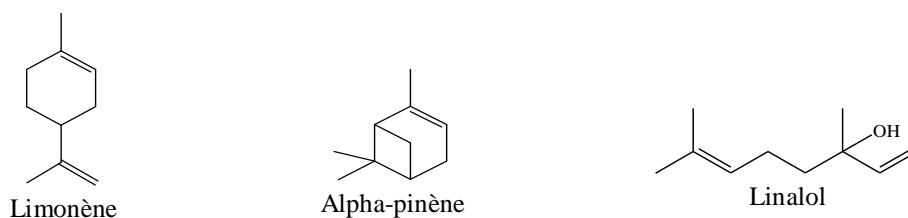
### **II. 5. 1. Terpènes**

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par polymérisation de plusieurs unités isoprènes ( $C_5H_8$ ). Cette classe constitue une grande partie des produits aromatiques des huiles

essentielles. Les terpènes peuvent être classés selon leur nombre de motifs isoprènes ainsi que leurs arrangements (Breitmaier, 2006).

### II. 5. 1. 1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles. Ils représentent parfois plus de 90% du pourcentage total des huiles essentielles. Ils sont constitués de deux unités isoprènes selon le mode de couplage « tête-queue ». Les monoterpènes peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques, ou tricycliques (Degenhardt et al., 2009; Loza-Tavera, 1999).

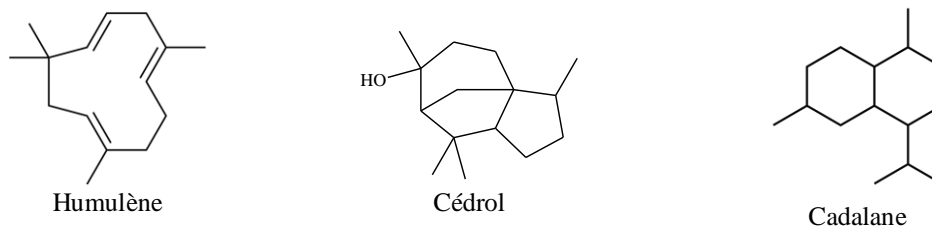


**Figure 10.** Structure de quelques monoterpènes.

Ce sont des molécules qui ont de bonnes propriétés antiinfectieuses à large spectre d'action, neurotoniques et immunomodulantes (en abaissant les immunoglobulines en excès et augmentant les immunoglobulines trop basses). Certains monoterpénols ont cependant des propriétés uniques : le linalol est reconnu pour être un excellent calmant et sédatif. Les monoterpènes ont l'avantage d'avoir une toxicité assez faible (Cox-Georgian et al., 2019).

### II. 5. 1. 2. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes résultent de l'assemblage de trois unités isoprènes  $C_{15}H_{22}$ . Ils peuvent également être acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques ou polycycliques. En fait, c'est la classe la plus diversifiée des terpènes (Perveen and Al-Taweel, 2018).



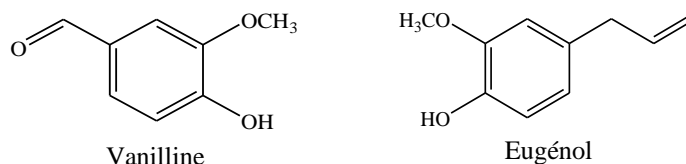
**Figure 11.** Structure de quelques sesquiterpènes.

Les sesquiterpènes sont considérés comme des composés toniques, stimulants généraux, décongestionnants veineux et lymphatiques et souvent œstrogène-like (parmi lesquels le cédrol, par exemple). Les HE riches en ces composés sont donc à proscrire chez les sujets ayant des antécédents de cancers hormono-dépendants ou de mastoses. Hormis cela, leur toxicité est assez faible (Degenhardt et al., 2009).

## II. 5. 2. Composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Ils dérivent généralement des phénylpropanes (C6-C3). Ces composés aromatiques représentent un groupe important ; car ils sont souvent responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. A titre d'exemple, l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (Lardry and Haberkorn, 2007).

Nous pouvons également trouver dans les huiles essentielles des composés en (C6-C1) comme la vanilline, qui est la molécule responsable de l'odeur de la vanille (Bray, 2005).



**Figure 12.** Structure de quelques composés aromatiques.

Ils sont très positifs, ce qui leur confère une action tonifiante vis-à-vis du système nerveux. Ils sont surtout connus pour leurs très fortes propriétés anti-infectieuses. Un des

aromatiques les plus connus pour ses actions anti-infectieuses à large spectre est le cinnamaldéhyde, que l'on trouve dans l'HE de cannelle de Ceylan. Ce sont également des molécules ayant un pouvoir stimulant sur le système immunitaire. Administrés à forte dose, ils sont dermocaustiques et irritants pour les muqueuses, notamment les muqueuses respiratoires. Il ne faut donc pas les utiliser à des dilutions supérieures à 10 % ni par voie aérienne (Bray, 2005; Kaloustian and Hadji-Minaglou, 2012; Lardry and Haberkorn, 2007).

### **II. 5. 3. Composés d'origines diverses**

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles, il s'agit là de composés aliphatiques de faible masse moléculaire, qui sont entraînés lors de l'hydrodistillation (carbures, acides, aldéhydes, esters, ...etc) (Bray, 2005; Lardry and Haberkorn, 2007).

## ***II. 6. Techniques d'extraction des huiles essentielles***

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix du processus d'obtention délicat. En fait, La méthode choisie ne doit pas induire des altérations de la composition chimique ou des pertes de composés volatils. Seules trois méthodes d'extractions sont décrites par la Pharmacopée Européenne : l'entraînement à la vapeur d'eau, la distillation sèche et l'expression à froid. Il existe d'autres méthodes comme l'enfleurage ou l'extraction par micro-ondes, mais elles ne sauraient être utilisées pour l'obtention d'HE à visée pharmaceutiques.

### **II. 6. 1. Techniques d'extraction traditionnelle**

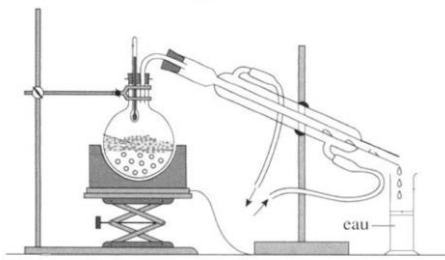
Ces techniques reposent toutes sur le même principe, qui est basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.



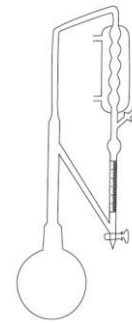
### *II. 6. 1. 1. Hydrodistillation*

C'est la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée. Cette technique consiste à immerger la matière première dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau. L'ensemble (matière végétale + eau) est ensuite porté à l'ébullition (Nejia, 2013). La chaleur permet l'éclatement des structures histologiques, et la libération des composés odorants contenus dans ces dernières. Les composés aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Ce mélange se condense ensuite dans un réfrigèrent. L'huile étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolat (El Haib, 2011).

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenus. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. A l'échelle du laboratoire, le système utilisé pour l'obtention des huiles essentielles avec recyclage est le Clevenger (El Haib, 2011). La durée de l'hydrodistillation est variable selon la matière végétale à traiter, elle peut atteindre plusieurs heures. Généralement, la durée de la distillation peut influencer non seulement le rendement mais également la composition de l'huile essentielle obtenue. Nous pouvons noter que l'hydrolat, qui contient des quantités très faibles des substances aromatiques les plus hydrophiles, est dans certains cas conservé sous le nom d'"eau florale" pour des utilisations cosmétiques, en parfumerie ou même dans le domaine alimentaire (El Haib, 2011; Nejia, 2013).



*Dispositif expérimental d'HD sans cohobage de l'HE*

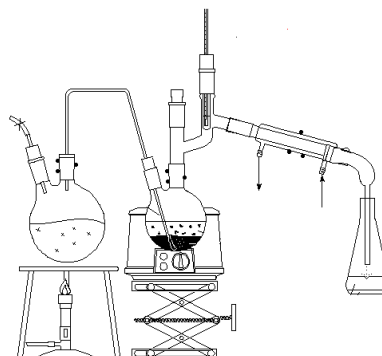


*Dispositif expérimental d'HD avec cohobage de l'HE*

**Figure 13.** Montage de l'hydrodistillation.

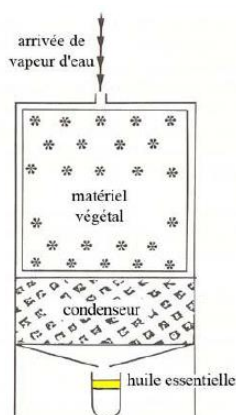
### *II. 6. 1. 2. Entraînement à la vapeur d'eau*

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Cette technique est basée sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînaables par la vapeur d'eau. Sous l'action de la vapeur d'eau, les cellules qui hébergent l'huile essentielle se font éclater et libèrent leur contenu. Le mélange (huile essentielle et eau) est ensuite véhiculé vers le réfrigérant, puis séparé par différence de densité. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale évite certaines réactions d'hydrolyse ou de dégradation pouvant modifier la composition chimique de l'huile essentielle (El Haib, 2011; Nejia, 2013).



**Figure 14.** Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. A l'opposé des autres techniques, l'hydrodiffusion consiste à faire passer la vapeur d'eau à travers la biomasse végétale, du haut vers le bas sous une pression réduite. Cette technique a l'avantage d'être plus rapide, et moins dommageable pour les produits volatils. De plus, l'hydrodiffusion permet, d'économiser l'énergie et la vapeur (El Haib, 2011; Nejia, 2013).



**Figure 15.** Montage d'hydrodiffusion.

### II. 6. 1. 3. Expression à froid

L'expression à froid est un procédé mécanique visant à récupérer l'essence logée dans la peau (ou épicarpe) des agrumes. Elle se fait sans aucune source de chaleur, laissant ainsi à l'essence une qualité très proche de l'originale. Cette technique est surtout utilisée pour l'obtention des HE plantes du genre *Citrus* comme les HE de citron (*Citrus limon* L.), de bergamote (*Citrus bergamia* R.P), d'orange amère (*Citrus aurantium* L.) ou encore de mandarine (*Citrus reticulata* Blanco). Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'huile essentielle. L'huile libérée est ensuite entraînée par l'eau et séparée par decantation (Hadj Salem, 2009; Nait Achou, 2012).

De plus, des études ont indiqué la présence des molécules non volatils et apolaires dans les essences obtenues par expression à froid, qui ne seront retrouvés que très exceptionnellement dans les huiles essentielles obtenues par distillation, notamment les

coumarines, les tri- et tétraterpènes ou encore les flavonoïdes (Hadj Salem, 2009; Nait Achou, 2012).

## **II. 6. 2. Méthodes innovantes d'extraction des huiles essentielles**

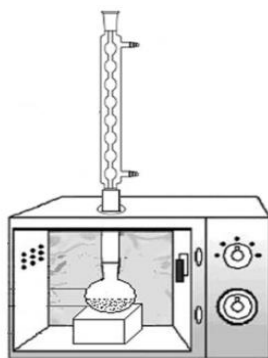
### *II. 6. 2. 1. Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique*

L'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique se rapproche de l'extraction par solvant. Généralement, le principe de cette technique implique l'utilisation et le recyclage du fluide en étapes répétées de compression/décompression. L'état supercritique du CO<sub>2</sub> peut être atteint en comprimant et en chauffant fortement ce fluide. Ensuite, il passe à travers la matière première végétale pour se charger en matière volatile. Le processus est suivi par des étapes de décompression, où le mélange huile essentielle et CO<sub>2</sub> est acheminé à deux séparateurs où le fluide est progressivement décomprimé pour séparer l'huile essentielle du CO<sub>2</sub>. Le CO<sub>2</sub> est libéré du deuxième séparateur et recyclé dans un réservoir de stockage. Aucun résidu de solvant ne reste dans le produit final puisque le CO<sub>2</sub> revient facilement à l'état gazeux sous pression normale et température atmosphériques (Hadj Salem, 2009; Nejia, 2013).

### *II. 6. 2. 1. Extraction assistée par micro-onde*

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée dans une enceinte close, dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Le rayonnement micro-onde permet de chauffer sélectivement l'eau présente naturellement dans le matériel végétal. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les structures histologiques contenant l'huile essentielle, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. L'huile essentielle est entraînée par la vapeur d'eau, et récupérée par la suite à l'aide des procédés classiques : condensation refroidissement et décantation. Cette technique possède plusieurs avantages; notamment, le

gain du temps d'extraction, une dégradation thermique réduite, un rendement élevé et une économie d'énergie (El Haib, 2011; Hadj Salem, 2009; Nejia, 2013).



**Figure 16.** Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.

## ***II. 7. Méthodes d'analyse chimique des huiles essentielles***

Les huiles essentielles se présentent pratiquement toujours sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines – voire d'une centaine et plus – de composés en proportions variables. La valorisation ou la commercialisation des huiles essentielles, quelle que soit leur application, est en général précédée d'une étape de caractérisation et de quantification. Ces dernières consistent à déterminer la composition chimique des HE par différentes méthodes analytiques spectroscopique et/ou chromatographiques. Actuellement, la chromatographie en phase gazeuse CPG est la méthode de dosage et d'identification la plus couramment employée dans l'analyse chimique des arômes et des huiles essentielles. En effet, elle permet de séparer de faibles quantités des différents composants de l'huile essentielle (Casabianca et al., 1995; Jennings and Shibamoto, 2012; Marriott et al., 2001).

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est aussi utilisée dans l'analyse des arômes et des huiles. Néanmoins son application dans ce domaine est limitée par la faible résolution qu'elle autorise en comparaison avec la chromatographie en phase gazeuse capillaire. De plus, la détection en HPLC n'est pas adaptée à l'analyse des huiles essentielles. Dans les laboratoires de recherche on utilise souvent un couplage HPLC-GC. Cette

technique est basée sur une séparation préliminaire des classes fonctionnelles de l'huile par HPLC et ensuite par injection des fractions ainsi obtenues sur GC (Adlard, 2010; Casabianca et al., 1995; Jennings and Shibamoto, 2012; Marriott et al., 2001).

La chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide autorise le couplage de toute une série de détecteurs différents qui permettent d'avoir une vision multiple d'un seul produit. Dans l'analyse des huiles essentielles, les détecteurs les plus utilisés sont le détecteur de masse (MS) et le détecteur à ionisation de flamme (FID).

## ***II. 8. Conservation et stockage des huiles essentielles***

L'instabilité relative des molécules constitutives des huiles essentielles implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses et facilement déterminées par la mesure des indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acidité, indice d'iode, ...etc), par mesure des paramètres physiques (indice de réfraction, densité, pouvoir rotatoire, ...etc), ou même par l'analyse chromatographique (Nait Achou, 2012; Nejia, 2013).

Ces dégradations peuvent modifier les propriétés ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle. Il convient de les éviter par l'utilisation de flacons propres et secs, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche et par stockage à l'abri de la lumière et de la chaleur. Dans certains cas, un antioxydant convenable peut être ajouté à l'huile essentielle, cet additif doit obligatoirement être mentionné sur les emballages (Nait Achou, 2012).

## ***II. 9. Utilisation des huiles essentielles***

Par leurs nombreuses et diverses propriétés, le champ d'application des huiles essentielles est vaste. En effet, les principaux secteurs d'utilisation des huiles essentielles sont :

l'industrie alimentaire, l'industrie des parfums et cosmétiques, l'industrie pharmaceutique et l'industrie chimique (Adlard, 2010).

Dans secteur agro-alimentaires, certaines huiles essentielles (girofle, de gingembre, de vanille, de basilic, ...etc) sont utilisées comme des agents aromatisant. Elles sont également employées comme conservateurs et agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Nejia, 2013).

L'industrie de la parfumerie et de la cosmétologie est le principal débouché des huiles essentielles ou de certains de leurs constituants purs. C'est le cas des essences de rose, d'ylang-ylang, de lavande, de vétiver, de jasmin, de patchouli, ...etc, qui entrent dans la composition des parfums rares (Nait Achou, 2012).

La médecine et l'industrie pharmaceutique utilisent également les huiles essentielles en raison de leurs diverses propriétés : bactériostatiques, bactéricides, vermicides, fongicides, antiseptiques, insecticides, ...etc (Adorjan and Buchbauer, 2010; Perricone et al., 2015).

L'industrie chimique extrait de certaines huiles essentielles des matières premières (isolats) qu'elle transforme en produits chimiques plus élaborés ou directement utilisables pour la synthèse de principes actifs, de vitamines, de substances odorantes, ...etc. C'est le cas par exemple de l'huile essentielle de pin, riche en  $\alpha$ -pinène, qui, en plus de son utilisation comme solvant, entre dans la synthèse du camphre (agent plastifiant) (Adlard, 2010).

## ***II. 10. Toxicité des huiles essentielles***

Certaines substances naturelles peuvent présenter des effets néfastes pour l'homme au même titre que certaines substances de synthèse. Les huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses. De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques (Couderc, 2001).

Selon la sorte et la quantité, l'ingestion accidentelle d'huile essentielle peut générer une toxicité élevée. Il faut préciser que les huiles essentielles très liquides peuvent parvenir dans les voies respiratoires si elles sont malencontreusement avalées ou vomies, cela peut conduire à une inflammation des poumons (Couderc, 2001).



### **III. Généralités sur les composés phénoliques**

Le terme polyphénol date des années 1980 où il a remplacé le terme « tanin végétal ». Actuellement, il est fréquemment utilisé pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. Les polyphénols constituent une classe de molécules qui sont caractérisées par la présence de nombreux groupes phénoliques arrangés en des structures complexes. Le règne végétal constitue une source importante de polyphénols. Ces derniers sont présents dans toutes les parties de la plante, avec une répartition quantitative et qualitative qui varie entre les différents organes et tissus (Macheix, 1996).

#### ***III. 1. Rôle et intérêt des composés phénoliques***

- **Pour la plante**

La plupart des composés phénoliques sont caractéristiques des végétaux. Cependant, certains peuvent être présents chez les animaux, par exemple l'œstradiol, la plus importante des hormones de type œstrogène chez les mammifères. En outre, la tyrosine, acide aminé de nature phénolique, entre dans la composition des protéines chez tous les êtres vivants. Les polyphénols, comme la majorité des métabolites secondaires, sont synthétisés pour accomplir certaines fonctions lors du développement de la plante. En terme de fonction protectrice, ils défendent la plante contre les pathogènes tels que les moisissures, les champignons et les bactéries. Ils assurent également sa protection contre les rayonnements UV. Certains d'entre eux sont des répulsifs qui inhibent la croissance d'autres espèces. Les polyphénols jouent un rôle structural comme la lignine constituant la rigidité du bois. Les composés phénoliques participent à la coloration des fleurs et des fruits à fin d'attirer les insectes pollinisateurs (Cardinali et al., 2006; Kulbat, 2016).

- **Pour l'homme**

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes. Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées : veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/ ou anti-estrogénique. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protèges nos artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères) (Ho, 2021; Macheix, 1996; Tuberoso and Orrù, 2008).

### ***III. 2. Classification des composés phénoliques***

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation, ...etc.), et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, ...etc.).

#### **III. 2. 1. Acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont rares dans la nature. On distingue deux principales classes d'acide : les hydroxybenzoïques et les hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, ...etc.) sont dérivés de l'acide benzoïques et on une structure de base C6-C1. Les acides

hydroxycinnamiques représentent une classe très importante, dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les principaux composés de la série hydroxycinnamique sont l'acide *p*-coumarique (et ses isomères), l'acide caféique, l'acide férulique, et l'acide sinapique (Robbins, 2003; Stalikas, 2007).

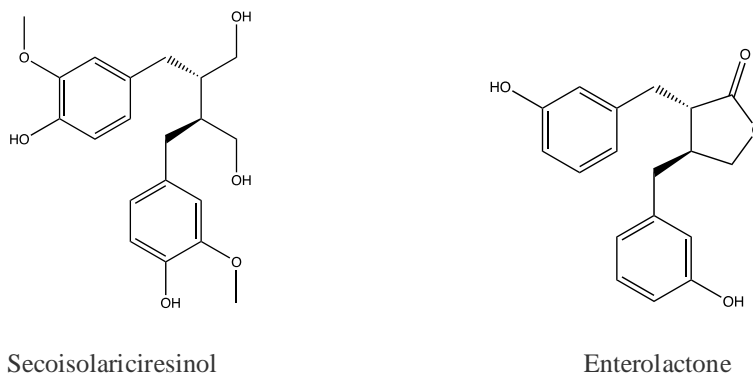


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ac. Salicylique	OH	H	H	H	Ac. <i>p</i> -coumarique	H	OH	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH	Ac. caféique	OH	OH	H
Ac. vanillique	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ac. férulique	OCH <sub>3</sub>	OH	H

**Figure 17.** Structure de quelques acides phénoliques.

### III. 2. 2. Lignanes

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)<sub>2</sub>. Les plantes les élaborent par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Cette dimérisation implique une liaison entre les C-8 des chaînes latérales propényles des deux unités d'alcool coniférique liées, formant la liaison (C8-C8). Le terme néolignane est employé pour définir toutes les autres types de liaison entre les unités (C6-C3).



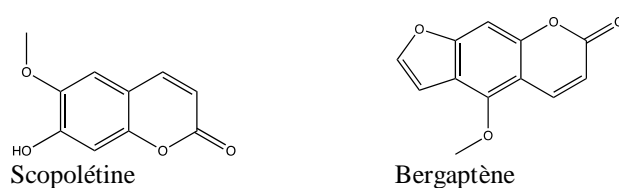
Secoisolariciresinol

Enterolactone

**Figure 18.** Exemple de structure des lignanes.

### III. 2. 3. Coumarines

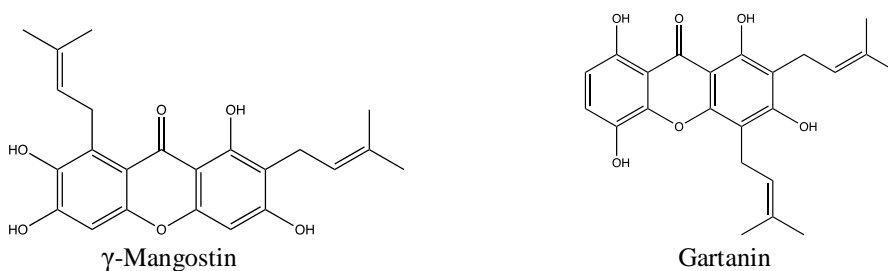
Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. Dans les plantes, on les rencontre chez les Apiacées, les Astéracées, les Fabacées, les Rosacées, les Rubiacées, les Rutacées et les Solanacées.



**Figure 19.** Exemples de structure des coumarines.

### III. 2. 4. Xanthones

C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes répondant à une structure de base (C6-C1-C6). Quelques exemples de ces composés sont représentés ci-dessous :

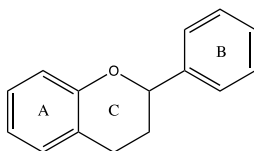


**Figure 20.** Exemples de structure des xanthones.

### III. 2. 5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques. A présent plus de 4000 composés ont été identifiés. Ces composés ont une structure de base formé de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique. Selon le

degré d'oxydation du noyau pyranique central, on distingue plusieurs classes des flavonoïdes (Harborne et al., 2013; Mabry et al., 2012; Panche et al., 2021; Pietta, 2000) :



**Figure 21.** Structure de base des flavonoïdes.

Flavones : ce sont des flavonoïdes caractérisés par une structure C6-C3-C6 avec une liaison C2-C3 est insaturé et une fonction cétone tels que l'apigénine et la vitexine.

Flavanes : ce sont des composés dont l'hétérocycle central C est saturé et qui n'ont pas de fonction cétone. Les flavanes sont réponsus dans les écorces des végétaux

Flavonols : ce sont des flavones qui se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central C (kaempférol, quercétine, rutine, ...etc.). Ce sont des pigments végétaux de couleur jaune plus ou moins clair.

Flavanones : contrairement aux flavonols et flavones, avec le groupe carbonyle en position C4, les flavanones ont un hétérocyclique saturé sans groupe hydroxyle en position C3. La substitution en position C7 par un disaccharide est la forme courante des flavanones glycosylées. Ils se trouvent principalement en concentrations élevées dans les agrumes tels que les oranges (hespéridine) et les citrons (ériodictyol).

Flavanols : (flavan-3-ols) contiennent un cycle hétérocyclique saturé et un groupe hydroxyle en position C3. Ils se trouvent généralement sous forme d'aglycones uniquement.

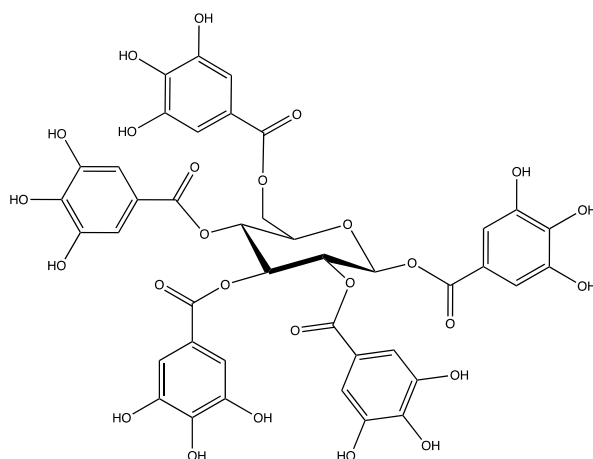
Anthocyanes : ce sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C. Ce sont des composés capables d'absorber la lumière visible. Ils sont responsables de la plus grande partie des couleurs rouge, violet et bleu observées dans la nature.

### III. 2. 6. Tanins

Ce sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, qui possèdent la propriété de tanner la peau (transformée les propriétés de la peau fraîche en un matériau imputrescible). On distingue de type des tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Harborne, 1973; Khanbabaee and Van Ree, 2001).

#### III. 2. 6. 1. Tanins hydrolysables

Ce sont des esters d'un sucre et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique. Ces tanins sont de deux types : les gallotanins qui dérivent de l'acide gallique et les ellagitanins qui dérivent de l'acide ellagique. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide ou basique. Ils s'hydrolysent également sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (Khanbabaee and Van Ree, 2001).

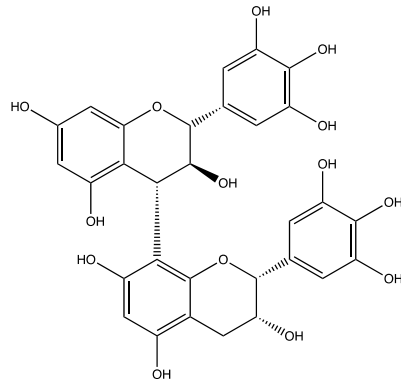


**Figure 22.** Structure du penta-O-galloyl-D-glucose.

#### III. 2. 6. 2. Tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevées. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison

d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A (Khanbabaee and Van Ree, 2001; Schofield et al., 2001).



**Figure 23.** Structure du prodelfinidol.

**Chapitre II : Généralité sur les  
espèces étudiées (*Cuminum cyminum*  
L., *Ammodaucus leucotrichus* L.,  
*Punica granatum* L.)**



# I. Généralité sur l'espèce *Cuminum cyminum* L. (Cumin)

## **I. 1. Introduction**

L'histoire du cumin date de plus de 5000 ans, dans la civilisation égyptienne antique, où il a été utilisé à la fois comme une épice, et un conservateur dans la momification (Sofowora, 2010). Son habitat d'origine se situe vraisemblablement dans le bassin oriental de la méditerranée et dans l'Asie centrale, notamment en Turkestan (Maghraoui, 1986). Au Moyen Age, le cumin a été transmis en Europe, notamment en Espagne et en Portugal (Athamena, 2008). Ensuite, Il a été introduit en Amérique par les colons espagnols et portugais. Au Maroc, l'époque de son introduction n'est pas connue, il était cultivé depuis le XI<sup>ème</sup> siècle dans la région de Drâa (Maghraoui, 1986).

À ce jour, le cumin est largement cultivé en Ouzbékistan, en Tadjikistan, en Turquie, au Maroc, en Egypte, en Inde, en Syrie, au Mexique, au Chili et en Chine (Athamena, 2008).

Le mot cumin désigne à la fois l'espèce *Cuminum cyminum* L. et ces fruits. Il tire son origine du Kerman, une ville en Iran, autour de laquelle il a été largement cultivé (Athamena et al., 2010).



**Figure 24.** Description en arabe de l'usage du cumin et de l'aneth date de 1334.

## ***I. 2. Classification systématique***

Le cumin (*Cuminum cyminum* L.) appartient à la famille des Apiacées, anciennement appelées Ombellifères, c'est une famille très homogène, et ses espèces sont assez difficiles à différencier les unes des autres. Elle comprend environ 3000 espèces, se répartissant dans toutes les régions tempérées, mais surtout dans l'hémisphère Nord (Filliat, 2012). La classification des Apiacées est basée sur les caractères tirés de l'organisation des ombelles et du fruit. la position systématique du cumin est représentée ci-dessous (Athamena, 2008):

- **Règne** : Plantes
- **Embranchement** : Spermatophytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Ordre** : Apiales
- **Famille** : Apiacées (ou Ombellifères)
- **Genre** : *Cuminum*
- **Espèce** : *Cuminum cyminum* L.

## ***I. 3. Morphologie de la plante***

Le cumin (*Cuminum cyminum* L.) est une petite plante herbacée, annuelle, pouvant atteindre 0,5 m de hauteur. La plante est entièrement glabre, à l'exception des fruits, qui sont hérissés de poils rudes (Filliat, 2012).

Le cumin est une plante, à tige dressée, rameuse, striée et portant des rameaux étalés qui portent les feuilles et peut atteindre 0,8 m de hauteur. Les feuilles sont de couleur verte foncée, alternes, généralement disposées en croix et très finement découpées en lanières linéaires. Le système racinaire est grêle, peu divisé, fibreux et de couleur blanchâtre. L'inflorescence est formée d'ombelles composées, pourvues de trois à cinq rayons. L'involucre

et l'involucelle sont allongés, généralement plus longs que les rayons formés par les ombelles et les ombellules (Filliat, 2012; Maghraoui, 1986).

Les fleurs sont de petites tailles, radiales et régulières. Elles sont formées de cinq sépales dépourvus de limbe, de cinq pétales blancs ou rosés, de cinq étamines et d'un ovaire infère et bicarpellaire. Le fruit est un diakène étroit et fusiforme, composé de deux méricarpes qui se détachent à maturité (Athamena, 2008; Filliat, 2012).



**Figure 25.** Aspect morphologique du cumin.

#### ***I. 4. Exigences climatiques et édaphiques de la culture du cumin***

Le cumin est une culture d'altitude. En général, il végète à des altitudes variantes entre 800 et 2000 m. C'est une plante rustique, à cause de sa morphologie et sa physiologie, pouvant supporter des conditions climatiques sévères. Il est cultivé en climat sec, dans les régions semi-arides. C'est une plante de climat chaud, mais elle peut se développer à des températures basses (jusqu'à -7 °C). La meilleure température de germination est de 25 à 30 °C. Le cumin est peu exigeant au point de vue de la qualité du sol, mais il préfère les sols limoneux, légers, bien drainés, profonds et riche en matière organique, avec une gamme de pH de 6,8 à 8,3. L'irrigation doit être assurée tout au long du cycle végétatif (Maghraoui, 1986). Le tableau ci-dessous regroupe les conditions climatiques et édaphiques de la culture du cumin :

**Table 2.** Exigences climatiques et édaphiques de la culture du cumin.

Altitude	800-2000 m
Température de germination	25-30 °C
Type du sol	Préférentiellement limoneux
pH du sol	Vers les pH neutres

Selon l'ORMVA (Office Régional de la Mise en Valeur Agricole) de Ouarzazate, les meilleurs précédents culturaux, pour la culture du cumin, sont le tabac, le coton, et le maïs.

### ***I. 5. Répartition, production et commercialisation du cumin dans le monde***

Le cumin est cultivé dans de nombreux pays, à différentes échelles. Actuellement, il est largement cultivé en Ouzbékistan, en Tadjikistan, en Turquie, au Maroc, en Egypte en Inde, en Syrie, au Mexique, au Chili et en Chine. La production mondiale est estimée d'environ 300 000 tonnes par an. Elle est principalement concentrée en Asie du centre, et du Sud (Athamena, 2008; Athamena et al., 2010).

Aujourd'hui, l'Inde est considéré comme le plus grand producteur mondial du cumin (70% de la production mondiale). En 2006-2007, il a été cultivé sur 409033 ha, avec une production de 176511 tonnes, principalement concentrés dans Gujarat et du Rajasthan. Le deuxième grand producteur mondial est la Syrie (7% de la production mondiale), avec une production annuelle de 10000 et 20000 tonnes. 95% de cette production est concentrée dans la région d'Alep, Idlib, Hama, Al-Rakka et Homs. La Turquie et l'Iran partagent la troisième place, avec une production de 6 % du cumin mondial. La Turquie produit entre 7000 et 15000 tonnes par an, alors que l'Iran entre 5000 et 10000 tonnes par an. La province de Khorasan de l'Iran est un important producteur de cumin, avec une contribution d'environ 88% de la production nationale. La Chine est un important producteur, mais elle n'a pas de statistiques disponibles. Les chercheurs estiment que la production chinoise du cumin, tour autour de 8000 tonnes par an (Athamena, 2008; Athamena et al., 2010; Sowbhagya, 2013).

## ***I. 6. Répartition, production et commercialisation du cumin au Maroc***

Selon le catalogue national des produits du terroir du Maroc, la culture du cumin est localisée principalement dans deux régions : la région de Marrakech Tensit Al Haouz et de Doukala Abda.

La production du cumin dans la région de Marrakech Tensit Al Haouz, s'étend sur la province de Chichaoua, Rehamna, Kalâa El Sraghna, et Haouz, où la superficie cultivée annuellement est de l'ordre de 3000 ha, avec plus de 1000 producteurs. Ce terroir offre annuellement 900 tonnes du fruit de cumin.

Concernant, la région de Doukala Abda, l'air géographique dans laquelle le cumin se cultive, comprend quatre communes rurales Jnane Bouih, Ras El Aïn, Ighoubn, et Sidi Chiker. Dans cette région, la superficie occupée par le cumin se situe entre 500 et 1000ha, avec un rendement moyen de 2 q/ha, et une production annuelle qui varie entre 100 et 200 tonnes.

D'après notre enquête, le cumin est également cultivé dans d'autres provinces. Dont nous citons : Alnif, Tazzarine, Echemaia et Bouârfa.

## ***I. 7. Composition chimique du cumin***

Le cumin est considéré comme l'une des épices, les plus utilisées dans le monde. Les analyses de la composition chimique du fruit du cumin ont révélé la présence, d'environ 5% d'humidité, 10% à 20% de matières grasses, 17% de protéines, 7% de fibres, et 4% de cendres (Saiedirad et al., 2007; Shahnaz et al., 2004). En outre, certaines études ont signalé la présence des composés glucidique (Behera et al., 2004).

Deux types de composés lipidiques, ont été identifiés dans les fruits de cumin, les lipides neutres qui sont constitués par, des hydrocarbures, des cires d'esters, des esters de stérol, des triglycérides, des acides gras libres, des 1,3 diglycerides, des 1,2 diglycerides, et des

monoglycerides. Et les lipides polaires, qui sont composés par, du phosphatidylethanolamine, des phosphatidycholines, du lysophosphatidylethanolamine, et des phosphatidylanositols (Shahnaz et al., 2004).

Le tableau suivant regroupe les différentes familles des composés lipidiques, avec les pourcentages :

**Table 3.** Composition lipidique du cumin.

	<b>Lipides</b>	<b>Pourcentages (%)</b>
<b>Lipides neutres</b>	Triglycérides	55
	Esters de stérol	25
	Acides gras libres	10
	Hydrocarbures et cires d'esters	2
	1,2 diglycerides	2
	1,3 diglycerides	1
	Monoglycerides	1
<b>Lipides polaires</b>	Phosphatidylethanolamine	2
	Phosphatidycholines	1,2
	Lysophosphatidylethanolamine	0,6
	Phosphatidylanositols	0,2

L'analyse de la fraction protéique a montré la présence, de 18 acides aminés avec les pourcentages suivants (Badr and Georgiev, 1990):

**Table 4.** Composition du cumin en acides aminés (les pourcentages ont été exprimés par rapport la masse totale du fruit du cumin).

Acides aminés	Teneur (%)
Acide glutamique	2.99
Acide aspartique	1.41
Arginine	0.74
Lysine	0.58
Leucine	0.67
Isoleucine	0.46
Thréonine	0.38
Valine	0.52
Cystéine	0.05
Méthionine	0.04
Sérine	0.50
Glycine	0.91
Alanine	0.53

Tyrosine	0.26
Phénylalanine	0.54
Histidine	0.28
Tryptophane	0.01
Proline	0.65

Le cumin contient également, environ 2.5% d'huile essentielle, constituée principalement de, 56.54 % de monoterpènes, 0.1 % de sesquiterpènes, 43.2 % d'aldéhydes, et 0.3 % d'alcools (Behera et al., 2004; Janahmadi et al., 2006; Singh et al., 2002).

L'huile essentielle du fruit de cumin est composée majoritairement, de cuminaldéhyde qui constitue de 30 à 50 % de la fraction volatile. Les principaux composés volatils dans le cumin sont le cuminaldéhyde, le  $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le  $\gamma$ -terpinène, le phellandrene et l'alcool cuminique. Mais, plus de 20 constituants volatils supplémentaires ont été identifiés (Shivakumar et al., 2010).

La présence des acides phénoliques, des flavonoïdes, des coumarines et des caroténoïdes, a été également citée dans la littérature. Selon les études de Wojdyło et al., (2010), toutes les plantes de la famille Apiacées présentent une teneur très basse en polyphénols. Athamena et al., (2010) ont également signalé la présence de ces composés, dans l'extrait hydro-méthanolique du fruit du cumin.

Des études ont rapporté la présence de certaines vitamines dans les fruits du cumin. Le tableau suivant représente les différentes vitamines détectées dans les fruits du cumin (Sowbhagya, 2013):

**Table 5.** Composition du cumin en vitamines (les teneurs ont été exprimées pour 100g de fruit).

Vitamines	Teneur en mg
Vitamine A	64
Vitamine B2 (Riboflavine)	0,327
Vitamine B3 (Niacine)	4,579
Vitamine B6	0,435
Vitamine B9 (Folate)	0.01

Vitamine C	7,7
Vitamine E	3,33
Vitamine K	0.0054

Les études d'Al-Bataina et al., (2003) ont montré la présence de 12 minéraux, dans le fruit du cumin, regroupés avec ses pourcentages dans le tableau suivant :

**Table 6.** Composition minérale du cumin (les pourcentages ont été exprimés par rapport la masse totale du fruit du cumin).

Éléments	Pourcentages %
Al	0.0105
Si	0.0396
P	0.0384
S	0.0700
Mn	0.0015
Fe	0.0210
Cu	0.0056
Zn	0.0034
Sr	0.0007
Cl	0.1400
K	0.6600
Ca	0.3700

## ***I. 8. Propriétés du cumin***

- ***Activité antibactérienne***

Plusieurs études ont examiné l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du fruit du cumin. Gachkar et al., (2007) ont signalé un effet antibactérien de l'huile essentielle du cumin, plus fort que celui du romarin, contre tous les microorganismes testés (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*). L'étude a également montré que les composés monoterpéniques sont les substances les plus actives.

En 2007, l'étude d'Iacobellis et al., (2005) a rapporté une activité antibactérienne de l'huile essentielle du cumin, contre les espèces bactériennes Gram-positives et Gram-négatives. Également, Singh et al., (2002) ont signalé, dans leurs études, l'efficacité de l'huile essentielle du cumin par rapport aux antibiotiques standard.



- *Activité antifongique*

L'étude *in vitro* a montré une activité antifongique remarquable des hydrosols du cumin contre quelques mycètes de microbes pathogènes de plantes (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. Tulipae*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria citri*) Boyraz et al., (2005).

Également, O'Riordan et al., (2008) ont constaté l'absence de la contamination par l'aflatoxine, dans les échantillons commerciaux du cumin.

- *Activité ovicide*

En 2000, des chercheurs ont examinés l'activité des vapeurs d'huiles essentielles du cumin, contre les œufs d'un insecte des produits stockés (*Ephestia kuehniella*). Les vapeurs ont montré une toxicité remarquable, avec un taux de mortalité de 100 % (Tunc et al., 2000).

- *Activité antioxydante*

Gachkar et al., (2007) ont montré dans leurs études, une activité anti-radicalaire et antioxydante remarquable, de l'huile essentielle du cumin. En outre, l'étude a considéré que les huiles essentielles, dépourvues des composés monoterpéniques, sont presque inefficaces. Cette activité antioxydante rend le cumin un puissant agent de conservation des aliments.

Milan et al., (2008) ont constaté que l'extrait salin du cumin a montré la plus forte activité antioxydante, suivie par l'extrait de l'eau chaude et de l'huile essentielle.

- *Effet hypolipémiant*

L'administration orale, de l'extrait aqueux du cumin, pendant 6 semaines aux rats diabétiques d'alloxane, a eu comme conséquence, une réduction considérable du glucose, de l'hémoglobine glycosylée, et l'empêchement de la diminution du poids corporel. Le traitement a provoqué aussi, une réduction du cholestérol, des phospholipides, des acides gras libres et des triglycérides dans le plasma et les tissus (Dhandapani et al., 2002).

- *Effet anti-carcinogène*

En présence d'un carcinogène du colon le 1,2-diméthyl hydrazine (DMH), l'activité des mucinases et des  $\beta$ -glucuronidases est sensiblement augmentée. Cette augmentation a comme conséquence une hydrolyse des mucines protectrices du côlon et des glucuronides conjugués. L'hydrolyse des glucuronides libère des toxines, ce qui peut engendrer le risque d'un cancer du côlon. Des travaux sur des rats, ont montré que le cumin peut protéger le côlon en diminuant l'activité des mucinases et des  $\beta$ -glucuronidases en présence ou en absence du DMH (Nalini et al., 1998).

- *Effet anti-hyperglycémiant*

Roman-Ramos et al., (1995) ont étudié l'effet anti-hyperglycémiant, de 12 plantes comestibles, incluant le cumin. Dans ce but, une solution de dextrose a été infusée en sous-cutanée, aux 27 lapins sains. Le cumin a montré des diminutions significatives pour chaque point de tolérance du glucose.

Une autre étude, élaborée par Willatgamuwa et al., (1998) sur des rats diabétiques induits par la streptozotocine, a montré une diminution du taux de glucose et de la glucosurie, après un régime diététique, contenant 1.25% de la poudre de cumin. Cette influence était évidente, autour de la troisième semaine de l'alimentation, et l'effet était de plus en plus prononcé, vers la fin de la 8<sup>ème</sup> semaine. Ceci a été également accompagné par une amélioration des poids corporels, des changements métaboliques, comme la diminution de l'urée sanguine, ainsi que les excréments de l'urée, et de la créatinine chez les animaux diabétiques.

- *Autres effets*

Selon Ho et al., (2008) l'extrait méthanolique du cumin exerce un certain degré de protection, contre les formes de dommage biomoléculaire qui touchent les protéines, les lipides et l'ADN causés par la peroxy-nitrite.

Platel et Srinivasan Platel and Srinivasan, (2000) ont étudié l'influence du cumin sur le taux de la sécrétion de la bile, ainsi que sa teneur en acides biliaires, chez des rats sains. L'épice est administrée soit par le biais d'une ingestion diététique, soit sous forme d'une dose orale simple. L'ingestion diététique a influencé significativement la sécrétion de la bile et sa teneur en acides biliaires, tandis que l'ingestion par dose simple a influencé seulement la teneur en acides biliaires.

Les résultats de Janahmadi et al., (2006), ont démontré que l'application extracellulaire d'huile essentielle du cumin (1 % et 3 %) chez les mollusques, a nettement diminué la fréquence de l'activité épileptiforme induite par le pentylentetrazol, d'une façon dépendante de la concentration et du temps.

## ***I. 9. Utilisation du cumin***

- *Usage médicinal*

En médecine traditionnelle, les fruits du cumin connaissent plusieurs usages. Au Maroc, les graines de cumin, en poudre ou en décoction dans l'eau, sont largement utilisées dans le traitement des troubles gastro-intestinaux. Il est en effet recommandé comme stomachique, carminatif, antispasmodique et vermifuge. On emploie également sa décoction, comme emménagogue. En usage externe, le cumin est utilisé en cataplasmes sur la nuque contre les oreillons (Athamena, 2008; Maghraoui, 1986).

Les phytothérapeutes indiens prescrivent le cumin contre les insomnies, les coups de froid et pour abaisser la fièvre. Mélangé au jus d'oignon, il forme une pâte que l'on applique sur les piqûres de scorpion (Athamena, 2008).

Dans la médecine iranienne ancienne, les fruits de la plante ont été utilisés pour le traitement du mal de dents et l'épilepsie (Janahmadi et al., 2006).

Le cumin est utilisé largement dans la médecine Ayurvédique (l'ancienne médecine Indienne), pour le traitement de la dyspepsie, la diarrhée et de l'ictère. En outre, il est connu pour avoir des propriétés anti-oxydantes, diurétiques, astringentes et hypoglycémiantes (Dhandapani et al., 2002).

Les fruits toniques et stimulants, facilitent la digestion et soulagent la flatulence colique ou diarrhées. Il est supposé augmenter la lactation, réduire les nausées pendant la grossesse et soulager le gonflement du sein et des testicules (Athamena, 2008; Jalali-Heravi et al., 2007).

- *Usage culinaire*

Le cumin (*Cuminum cyminum* L.) est utilisé essentiellement, en cuisine, comme agent aromatisant des aliments. C'est un ingrédient de la plupart des poudres de curry, et de nombreux mélanges d'épices salées. Il est utilisé principalement dans les ragoûts, les grillades, les plats de poulet, les plats de poisson, et les plats d'haricot (Jalali-Heravi et al., 2007).

Également, le cumin est employé pour aromatiser les fromages et le pain, et pour préparer les sauces (Maghraoui, 1986). En outre son rôle assaisonnant, le cumin est également utilisé, comme agent conservateur des aliments (El-ghorab et al., 2010). Au Maroc, les fruits du cumin sont utilisés pour aromatiser les dattes tendres (Maghraoui, 1986).

## II. Généralité sur l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. (Cumin Essoufi)

### II. 1. Classification systématique

*Ammodaucus leucotrichus* L., appartenant à la famille des Apiacées, est la seule espèce du genre *Ammodaucus*. On distingue deux sous-espèces, qui se localisent à des endroits différents : *Ammodaucus leucotrichus* Cosson & Durieu subsp. *Leucotrichus*, qui pousse au Sahara et Sub-Sahara de l'Afrique du nord et *Ammodaucus leucotrichus* Cosson & Durieu subsp. *nanocarpus* E. Beltran qui pousse dans l'archipel macaronésien (Abu Zarga et al., 2013a; Idm'hand et al., 2020; Velasco-Negueruela et al., 2006). La position systématique de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. est représentée ci-dessous :

- **Règne** : Plantes
- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicots
- **Sous classe** : Astéridées
- **Ordre** : Apiales
- **Famille** : Apiacées
- **Genre** : *Ammodaucus*
- **Espèce** : *Ammodaucus leucotrichus* L.

### II. 2. Description morphologique de la plante

*Ammodaucus leucotrichus* L. est une plante annuelle de hauteur de 10-20 cm, très ramifiée, glabre, sauf dans l'inflorescence, à port touffu. Les tiges sont dressées, rameuses, finement striées. Les feuilles sont très divisées, à lanières étroites, et un peu charnues. Les ombelles ont 3-5 rayons, de 10-30 mm à 2-3 bractées. L'ombellules est de diamètre de 5-10

mm, à pédoncule côtelé. L'involucelle est à 3-8 bractéoles entières ou multifides à marges plus ou moins scarieuses et scabres, ainsi que les rayons de 3-10 mm. Les fleurs sont petites de diamètre de 1.5-2.5 mm, homomorphes, à pétales blanc-rosé, calice devenant rapidement très pubescent à 5 dents courtes (< 0.5 mm) plus ou moins persistantes sur le fruit. Les méricarpes sont fusiformes de 7-9 x 2-2.5 mm à styles dressés, à côtes commisurales subaillées (0.4-0.6 mm) abondamment couvertes de longs poils (4-7 mm), denticulés-scabres ainsi que les deux côtes dorsales, avec une forte odeur et de couleur jaune à la base, puis blanches (Bellakhdar, 1997; Idm'hand et al., 2020).



**Figure 26.** Aspect morphologique de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L.

### ***II. 3. Répartition géographique***

L'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L., est une plante comestible, distribuée dans toute l'Afrique du Nord : Maroc, Algérie, Tunisie, s'étendant jusqu'en Egypte et en Afrique tropical). Elle également assez commune dans tout le pâturage désertique, notamment, le secteur du Sahara septentrional et occidental. Elle est rare dans le secteur Sahara central (Dahmane et al., 2016; Idm'hand et al., 2020; Yassir et al., 2015).

**Ammodaucus** Coss. & Durieu, *Bull. Soc. Bot. France* 6: 393 (1859)

**Ammodaucus leucotrichus** Coss. & Durieu, *Bull. Soc. Bot. France* 6: 393 (1859)

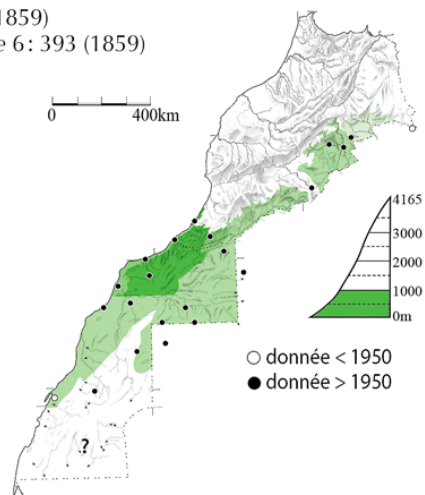
Plante annuelle, h. (5)10-20 cm, très ramifiée, glabre, sauf dans l'inflorescence, à port touffu. Feuilles bi-tripennatiséquées, à segments étroits-allongés, filiformes (L. 4-10x0,7 mm). Ombelles à 3-5 rayons, de 10-30 mm à (0)2-3 bractées bi-tricuspidées, scabieuses-scabres sur les marges; ombellules de Ø 5-10 mm; involucre à 3-5 bractéoles tricuspidées, à marges scabieuses et scabres, ainsi que les 5-12 rayons de 3-10 mm. Fleurs petites Ø 1,5-2,5 mm, homomorphes, à pétales blanc-rosé, calice devenant rapidement très pubescent à 5 dents courtes (< 0,5 mm) ± persistantes sur le fruit. Méricarpes fusiformes de 7-9(12) x 2-2,5 mm (hors pilosité) à styles dressés, à côtes commissurales subailées (0,4-0,6 mm) abondamment couvertes de longs poils roux (4-7 mm), dressés (var. *leucotrichus*), scabres, ainsi que sur les 2 côtes dorsales.

**Écologie:** pâtures, steppes et lit d'oueds sablonneux désertiques.

**Floraison:** février - avril, après les pluies au Sahara.

**Distribution générale:** Maghreb, Libye, Égypte, Sahara, Mauritanie, Mali, Niger.

Mad Can Mau Mar Alg Tun Lib Egy Lu Hs Ga It



**Figure 27.** Fiche descriptive de la répartition géographique de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L.

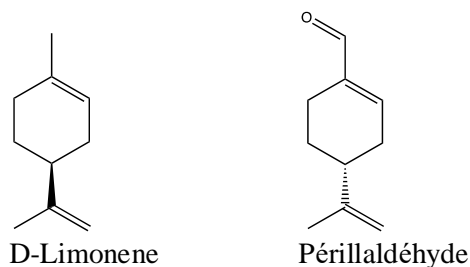
## II. 4. Utilisation traditionnelle de la plante

Selon des études ethnobotaniques, en médecine traditionnelle, la plante est principalement utilisée pour ses fruits, pour le traitement de certains troubles, notamment du système digestif et du diabète (Halla et al., 2018; Velasco-Negueruela et al., 2006). Au Maroc, les fruits de la plante sont utilisés par la population locale, soit sous forme de poudre soit en décoction pour traiter les douleurs gastriques-intestinales, la gastralgie et l'indigestion (Essaghouani et al., 2016). Elle est également fréquemment utilisée en infusion pour diverses maladies infantiles du tube digestif : dysenterie, nausées, vomissements et régurgitations. De plus, l'infusion de ces fruits a des propriétés toniques pour les bébés. Les feuilles sont utilisées comme épice pour aromatiser le thé (Fatiha et al., 2017; Idm'hand et al., 2020; Telli et al., 2016).

## II. 5. Composition chimique

Malgré l'importance de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. en médecine traditionnelle, très peu d'études phytochimiques ont été rapportées sur cette espèce. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle extraites des fruits d'*Ammodaucus*

*leucotrichus* L., a montré la présence de deux composés majoritaires, il s'agit du D-limonène et du périllaldéhyde (Abu Zarga et al., 2013a; Halla et al., 2018; Idm'hand et al., 2020; Telli et al., 2016).



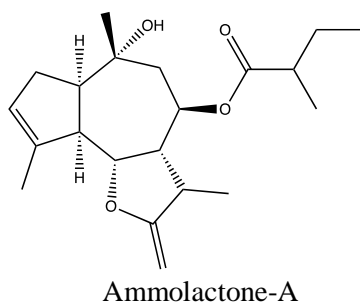
**Figure 28.** Structure chimique du D-limonène et du périllaldéhyde.

La plupart des recherches phytochimiques sur *A. leucotrichus* concernent les huiles essentielles. Peu d'études scientifiques ont été menées sur les composés non volatils. Récemment, Ziani et al., (2018) ont décrit par HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, les composés phénoliques des décoctions et des extraits de fruits hydroéthanoliques d'*A. Leucotrichus* L. Les sucres solubles, les acides gras, les acides organiques et les tocophérols ont été également caractérisés. Les résultats de cette étude ont montré que l'acide malique était le principal acide organique. L'analyse de la composition en tocophérols a montré une dominance de l' $\alpha$ -tocophérol. L'étude a révélé également la présence de 7 composés phénoliques ; 2 dérivés d'acide phénolique et 5 flavones qui dérivés de l'apigénine et de la lutéoline. Il s'agit de l'apigénine-6,8-C-diglucoside, la lutéoline-7-O-glucoside, l'acide di-O-caféoyl-malonylquinique, deux isomères de la lutéoline-O-(malonyl-hexoside), l'acide di-O-caféoyl-dimalonylquinique et l'apigénine-O-(acétyl-hexoside).

Muckensturm et al., (1997) ont rapporté l'isolement de l'ammolactone-A en tant que nouvelle guaianolide lactone à partir de l'extrait étheré de fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. Ceci en plus de certains monoterpénoïdes courants ((+)-limonène, (+)-



périllaldéhyde, (+)-3-hydroxypérillaldéhyde), (-)-périllate de méthyle, (+)-angélate de bornéol et (+)-7-décalactone).



**Figure 29.** Structure de l'Ammolactone-A.

## ***II. 6. Propriétés de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L.***

- ***Activité antioxydante***

Louail et al., (2016) ont évalué l'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* L. en mesurant l'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène, résultant de l'oxydation de l'acide linoléique. L'huile essentielle a démontré une activité antioxydante plus intéressante que celle montrée par l'acide ascorbique.

Dans une autre étude, Dahmane et al., (2017) ont évalué le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* L. en utilisant le test de 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Les résultats obtenus ont indiqué une faible capacité antioxydantes pour réduire les radicaux DPPH.

- ***Activité antibactérienne***

L'huile essentielle des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* L. a été testé pour son activité antimicrobienne contre différents microorganismes, y compris les bactéries Gram-positives et

Gram-négatives. L'huile a montré une forte action inhibitrice contre la plupart des organismes testés avec des concentrations minimales inhibitrices variaient de 0,37 à 0,92 mg/ml (Louail et al., 2016).

Selon Dahmane et al., (2017) l'huile essentielle d'*Ammodaucus leucotrichus* L. a exercé un large spectre antibactérien avec un diamètre des zones d'inhibition allant de 9,66 à 52,66 mm, alors qu'il était de 10.66 à 39.00 mm pour le contrôle positif.

- *Activité antidiabétique*

Yassir et al., (2016) ont évalué l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux des fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* L. chez des rats diabétiques. La glycémie était significativement réduite après 15 jours d'administration orale d'extrait de plante à une dose de 10 mg/kg. De plus, l'extrait aqueux de fruit d'*Ammodaucus leucotrichus* L. a pu présenter un effet bénéfique sur la structure histologique du foie et une influence remarquable sur la tolérance au glucose.

- *Activité cytotoxique*

Ziani et al., (2018) ont testé la cytotoxicité de l'extrait aqueux et hydroéthanoliques de la partie aérienne de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. L'activité inhibitrice de croissance de quatre cellules tumorales humaines (NCI-H460 (cancer du poumon), HeLa (carcinome du col de l'utérus), HepG2 (carcinome hépatocellulaire) et MCF-7 (carcinome du sein)) a été déterminée par le test colorimétrique à la sulforhodamine B. Les résultats obtenus ont montré une sensibilité plus intéressante des cellules tumorales vis-à-vis l'extrait hydroéthanolique que aqueux.

### **III. Généralité sur l'espèce *Punica granatum* L. (Grenadier)**

#### **III. 1. Introduction**

Le grenadier (*Punica granatum* L.), un gros arbuste assez épineux, au feuillage caduc et de bel aspect, appartient à la famille des Punicaceae. Il est depuis longtemps cultivé à but ornemental et pour ses fruits comestibles. Il est originaire de l'Asie subtropicale et s'est acclimaté à la région méditerranéenne (Ben Abdennebi, 2012; Wald, 2009).

Le grenadier a été disséminé d'abord par les nomades arabes, puis introduit en Chine au début du II<sup>ème</sup> siècle avant JC. Il est importé ensuite à Rome par les Romains de retour des guerres puniques, après leur victoire sur les Carthaginois. Plus tard, le grenadier sera introduit dans la péninsule ibérique, où le nom de son fruit, la grenade, sera donné à l'une des plus grandes villes d'Espagne (Wald, 2009).

Le grenadier est largement utilisé en médecines traditionnelles pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires. Grâce à leurs propriétés biologiques, la plante a fait l'objet, depuis une dizaine d'années, d'un regain d'intérêt, tant sur le plan médical et pharmacologique que sur le plan cosmétologique (Ben Abdennebi, 2012; Singh et al., 2018).

#### **III. 2. Classification du grenadier**

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753 (Puneeth and Chandra, 2020).

- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Ordre** : Myrtales

- **Famille** : Punicaceae
- **Genre** : Punica
- **Espèce** : *Punica granatum* L.

### ***III. 3. Description botanique***

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon subspontanée (Ben Abdennebi, 2012; Hmid, 2014; Wald, 2009).

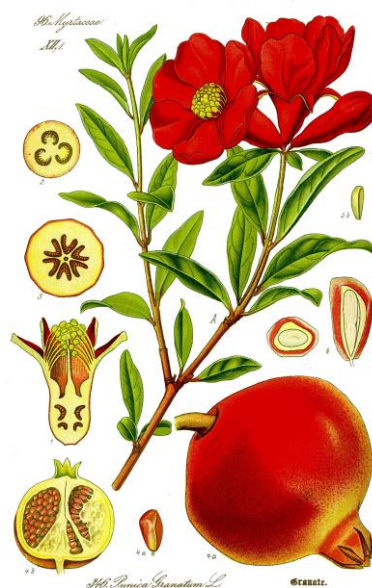
Les feuilles du grenadier sont opposées. Elles peuvent avoir une disposition alterne sur les rejets ou être en touffes sur les pousses courtes. Elles sont glabres sur les deux faces. La face supérieure est vert foncé et à nervure médiane nettement déprimée. La face inférieure, vert clair, montre une nervure médiane très saillante. Ces feuilles entières, lancéolées, assez coriaces, et brillantes, présentent un limbe elliptique allongé, de 3 à 8 cm de long. Leur sommet peut être obtus ou allongé. Elles sont munies d'un court pétiole, de 1 à 5 mm de long, qui est généralement rougeâtre au-dessus. Elles ne possèdent pas de stipule (Ben Abdennebi, 2012; Hmid, 2014; Wald, 2009).

Les fleurs du grenadier portent également le nom de balaustes. Elles sont très ornementales. Les fleurs rouge pourpre ou grenat, d'aspect froissé, portées par un court pédoncule, solitaires à l'aisselle des feuilles ou réunies par groupe de deux ou trois au sommet des branches, s'ouvrent de mai à juillet. Les fleurs du grenadier sont actinomorphes et hermaphrodites. Les fleurs sèches sont sans odeur. Elles ont une saveur âpre et astringente et donnent à la salive une teinte violacée (Ben Abdennebi, 2012; Hmid, 2014).

Le calice est formé de 4 à 8 sépales courts, charnus, épais, d'une belle couleur rouge vif, persistants, d'abord dressés puis étalés après la fécondation. Ces sépales présentent une préfloraison valvaire (Hmid, 2014; Wald, 2009).

La corolle comprend 4 à 8 pétales minces alternant avec les sépales. Ces pétales sont généralement très colorés, souvent d'un rouge orangé vif, mais pouvant prendre de nombreuses autres teintes selon les variétés, tel que blanc, jaune pâle, crème ou saumon. Ils ont un aspect chiffonné. Les pétales, simples chez le grenadier sauvage, sont généralement doublés chez le grenadier cultivé, formant les variétés dites à fleurs doubles, très ornementales. Le gynécée est formé de 8 ou 9 carpelles soudés au tube du calice, disposés sur deux verticilles. L'ovaire, infère, est surmonté d'un style conique terminé par une tête stigmatique. Les étamines, libres et très nombreuses, tapissent la paroi interne du réceptacle floral, à partir de la corolle. Ces étamines ont des anthères biloculaires. Elles sont introrses, versatiles et à déhiscence longitudinale (Ben Abdennebi, 2012; Hmid, 2014; Wald, 2009).

Les graines, au tégument externe pulpeux et très succulent, possèdent un tégument interne dur et coriace. Ces multiples graines, courtement funiculées, deviennent plus ou moins anguleuses par compression réciproque. L'embryon, exalbuminé, est formé d'une courte radicule et de deux larges cotylédons auriculés, enroulés en spirale l'un sur l'autre (Ben Abdennebi, 2012; Hmid, 2014; Wald, 2009).



**Figure 30.** Description morphologique de l'espèce *Punica granatum* L.

### ***III. 4. Répartition et production du grenadier***

Selon le chercheur russe, Vavilov (1951) le grenadier appartient au centre du Moyen-Orient, qui comprend l'intérieur de l'Asie, l'Iran et le Turkmenistan, puis il s'est acclimaté à la région méditerranéenne depuis des temps immémoriaux en raison de la propagation et la germination facile de ses graines, qui sont dispersées par l'homme, les oiseaux ou d'autres animaux (Hmid, 2014; Puneeth and Chandra, 2020).

Dans le monde, les plus importants pays producteurs de grenades sont les pays d'Orient dont l'Iran, la Turquie, la Transcaucasie et l'Inde mais aussi dans la zone méditerranéenne la Tunisie, le Maroc, l'Espagne, l'Italie et la Grèce. Aux Etats-Unis et plus particulièrement en Californie, la culture de la grenade est très développée (Puneeth and Chandra, 2020; Wald, 2009).

Pour la production mondiale, il n'y'a pas des données précises, car cette espèce est probablement considérée comme une culture secondaire. En 2012, la production mondiale a été estimée d'environ 3 086 000 tonnes tout en se basant sur les données élaborées par différents chercheurs et des associations à travers le monde (Ben Abdennebi, 2012).

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 Ha, dont plus de 76 % sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA). Cependant, l'Espagne, et l'Egypte ont une superficie comprise entre 16 000 et 2 400 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés (Quiroz, 2009). D'autres pays pratiquent également cette culture : Afghanistan, Pakistan, Arménie, Géorgie, Tadjikistan, Jordanie, Italie, Tunisie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre et Grèce (Ben Abdennebi, 2012).

Selon le Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts, la culture du grenadier au Maroc, en 2012, s'étend sur une superficie de

8218 ha qui donne une production estimée à 76327 T, soit un rendement moyen de 12 T/ha. Mais cette culture reste moins importante au Maroc par rapport à d'autres cultures telles que : les agrumes et l'abricotier, ayant une superficie respectivement de 44 500 ha et 16 200 ha et qui donnent une production respectivement de 1400 000 et 115 000 Tonnes/An.

Le grenadier est cultivé dans toutes les régions avec une certaine concentration dans la plaine du Tadla (35%) ; du Haouz (20%) ; de Settat (6,6%) ; de Taounate (5,8%) ; de Nador (5,3%) ; de Chafchaouen (4,5%) ; d'Azilal (3,3%) et dans certaines oasis du sud.

Sur la base de la caractérisation pomologique et morphologique, deux groupes de variétés ont été caractérisés et présentés par l'INRA de Béni Mellal, selon leur destination à la consommation en frais ou à la transformation.

- *Grenades à consommation en frais*

***Grenade rouge*** sélectionnée à Marrakech est un arbre à port retombant de moyenne vigueur. Le fruit est de forme ronde. Légèrement aplatie d'un poids moyen de 375 g, à écorce fine, de couleur jaunâtre lavé de rouge du côté ensoleillé. Les graines sont rouge juteux, sucrées, à pépins tendres et s'égrainent facilement. Le rendement moyen est de 68 kg par arbre en pleine production.

***Grenade jaune*** sélectionnée à Marrakech est un arbre à port retombant, légèrement plus vigoureux que le précédent. Le fruit est de forme ronde, légèrement aplatie, d'un poids moyen de 380 g, à écorce fine, de couleur jaunâtre. Les graines sont rouges, juteuses, d'un calibre supérieur à celles de la variété précédente et à pépins très tendres. Le rendement moyen est de 61 kg par arbre.

***Grenade zhéri précoce*** est une variété tunisienne à port retombant de moyenne vigueur. Le fruit est de forme ronde, d'un calibre moyen de 300 g, à écorce épaisse, de couleur jaunâtre

lavé de rouge à maturité. Les graines sont d'un rouge vif, sucré, à pépins légèrement lignifiés. Le rendement moyen est de 71 kg par arbre.

*Grenade zhéri d'automne* est un arbre à port retombant de vigueur moyenne. Le fruit est de forme ronde, légèrement aplatie et de petit calibre (275 g par fruit en moyenne), l'écorce est épaisse, jaune lavé de rouge du côté exposé au soleil. Les graines sont rouge foncé, de calibre moyen, sucré, à pépins tendres. Le rendement moyen est de 71 kg par arbre.

*Grenade kharazi*, (région de Bzou), son écorce fine, ses graines juteuses, colorées et ses pépins tendres.

*Grenade mesri* (région de Meknès) ses fruits gros rouges, avec des graines sucrées parfumées, colorées, juteuses et à pépins tendres.

*Grenade laroussi* (région de Fès) ses fruits ont de très gros calibres, ses graines sont sucrées et ses pépins sont demi-durs.

*Sefri* (région Ouled Abdelah) est une variété à vigueur moyenne avec un port semi dressé et compact donnant des fruits de gros calibres. La grenade Sefri est un fruit arrondi, légèrement aplati, de gros calibre (jusqu'à 900 g) de couleur jaune à rose à maturité, à péricarpe moins épais (2 à 4 mm) lisse et brillant.

- *Grenades à destination industrielle*

Par ordre d'acidité croissante, nous distinguons : "Wonderful", "Negro", "Monstruoso", "Dwarf semi evergreen" (INRA-Béni Mellal, 2009). Ces cultivars sont de plus en plus plantés et destinés pour la production des sirops ou des jus.

### ***III. 5. Usage du grenadier en médecine traditionnelle***

Le grenadier est utilisé depuis des siècles en médecine traditionnelle. De l'Afrique du Nord jusqu'en Inde, le jus de grenade, couramment utilisé dans les médecines indigènes, a la



réputation d'accroître la fécondité et d'être un antidote à la stérilité (Puneeth and Chandra, 2020).

La peau (malicorium) séchée de la grenade, est reconnue pour ses propriétés astringentes pour l'intestin, pour « arrêter le sang » et pour « chasser les parasites ». Le malicorium est ainsi indiqué en cas de diarrhée chronique, dysenterie chronique, présence de sang dans les selles, prolapsus rectal, spermatorrhée, hyperménorrhée, pertes blanches, accumulation de parasites, douleurs abdominales et dermatophytie. L'usage de la racine de grenadier, est également retenu, pour le traitement du ténia, les diarrhées chroniques, les dysenteries chroniques et les pertes blanches ou hémorragiques (Puneeth and Chandra, 2020).

Ainsi, au XIX<sup>ème</sup> siècle, les fleurs du grenadier sont connues pour être toniques et astringentes. On les emploie, en usage interne, pour traiter la diarrhée et la dysenterie quand la période d'irritation est dissipée, ainsi que dans les hémorragies passives, les écoulements muqueux avec atonie, la leucorrhée et la blennorrhée (Puneeth and Chandra, 2020; Singh et al., 2018).

Les feuilles, fraîches ou sèches, donne une tisane tonique agréable, utilisée contre « la débilité de l'estomac », le manque d'appétit, les nausées, la faiblesse générale, la chlorose, l'anémie, les courbatures dans les convalescences, la migraine, les diarrhées chroniques et les frissons fébriles (Arun and Singh, 2012).

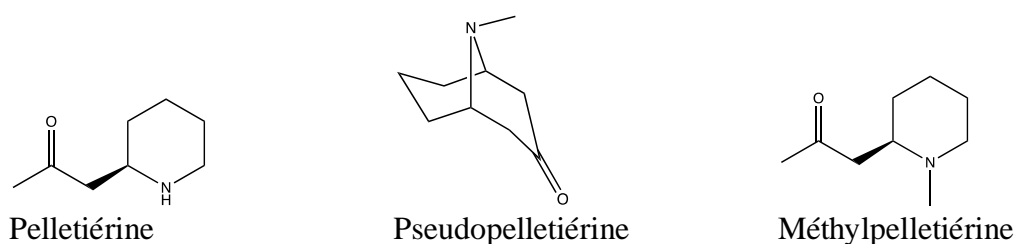
Les graines des fruits, beaucoup moins astringentes, ont été prescrites en poudre dans la leucorrhée et pour soulager les ulcères atoniques (Shaygannia et al., 2016).

Le jus de la grenade, rafraîchissant, diurétique, adoucissant, s'emploie contre les inflammations oculaires et fournit, étendu d'eau, une boisson acidulée de saveur agréable, recommandée dans les maladies inflammatoires et bileuses, ainsi que dans les affections des voies urinaires (Arun and Singh, 2012).

### III. 6. Composition chimique du grenadier

L'écorce de la racine de grenadier a été analysée d'abord par Mitouart, en 1824, qui en a isolé une matière grasse, des tanins, de l'acide gallique, une matière résineuse, de la mannite, du sucre et « du ligneux ». Puis Latour de Trié, en 1831, trouve dans cette écorce de la chlorophylle, de la résine, des tanins, de la matière grasse, et une substance cristalline sucrée qu'il nomme « grenadine ». Il sera montré par la suite que cette substance est simplement de la mannite. En 1878, le pharmacien français, Charles Tanret, découvre des alcaloïdes dans cette écorce, dont le principal qu'il appelle pelletiérine, et 3 autres, qu'il nomme isopelletiérine, pseudopelletiérine et méthylpeltiérine. Ensuite, en 1899, Piccinini ajoute à cette liste un cinquième alcaloïde liquide, isomère de la méthylpeltiérine, l'isométhylpeltiérine. Ces alcaloïdes représentent environ 0,70% de l'écorce de racine du grenadier (Arun and Singh, 2012; Shaygannia et al., 2016).

En plus de ces alcaloïdes, les écorces de racine de grenadier contiennent une quantité importante de matières minérales, de l'ordre de 10 à 12 %, correspondant à la richesse en oxalate de calcium. Également, elles renferment environ 20 à 22 % de tanins. Plus récemment, l'analyse chimique de cette écorce par des techniques modernes, met en évidence la présence d'ellagitanins tels que la punicaline, la punicalagine, les puniacortéines A, B, C et D, et la punigluconine, ainsi que des alcaloïdes pipéridiniques autres que la pelletiérine et ses dérivés (Arun and Singh, 2012; Shaygannia et al., 2016).

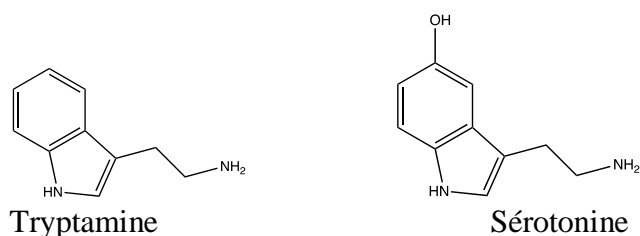


**Figure 31.** Structure des alcaloïdes extraites de l'écorce de la racine de l'espèce *Punica granatum* L.

La peau du fruit contient deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique. Elle renferme également des acides hydroxycinnamiques, des dérivés de flavones, molécules de coloration jaune, et des anthocyanidines, responsables de la couleur rouge des grenades. De nombreux ellagitannins sont aussi présents, tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B. Ces tanins représentent jusqu'à 28 % de la peau du fruit (Shaygannia et al., 2016; Singh et al., 2018).

Le jus de grenade, comme de nombreux autres jus de fruits, se compose de sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose et d'acides organiques tels que l'acide citrique, l'acide malique, l'acide oxalique et l'acide tartrique. Lansky et al. (2007) ont montré que parmi les acides aminés trouvés dans le jus de la grenade, il y a la valine, la proline et la méthionine. D'autres études ont montré que le jus a une composition élevée en vitamines hydrosolubles dont le plus important est la vitamine C avec une concentration qui varie entre 4 et 6 mg/100g. Ce fruit est riche en de nombreuses vitamines du groupe B, particulièrement de la vitamine B6, également connue sous le nom de pyridoxine (Shaygannia et al., 2016; Wald, 2009).

Le jus de la grenade contient aussi des indoles comme la tryptamine et la sérotonine, neuromédiateur qui intervient dans la régulation du sommeil, de l'appétit et de l'humeur. Ainsi que la mélatonine, connue sous le nom « d'hormone du sommeil » qui intervenant dans la régulation des rythmes chronobiologiques (Ben Abdennebi, 2012; Wald, 2009).



**Figure 32.** Structure de la tryptamine et de la sérotonine.

L'huile, obtenue à partir des graines de grenade, se compose principalement de triglycérides d'acides gras insaturés, essentiellement représentée par l'acide punicique.

Également, Il a été mis en évidence la présence d'hormones stéroïdiennes dans les graines de grenade (Shaygannia et al., 2016).

### ***III. 7. Propriétés thérapeutiques des grenades***

- *Propriétés antioxydantes*

La composition des différentes parties du grenadier a montré l'existence de plusieurs types de polyphénols ayant des propriétés antioxydantes très importantes à savoir les tanins que l'on trouve en concentration très élevée dans les tiges et l'écorce du grenadier (Negi and Jayaprakasha, 2003).

- *Action préventive des maladies cardiovasculaires*

L'activité protectrice des polyphénols apportée par l'alimentation contre les maladies cardio-vasculaires est due à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, la formation des macrophages et l'athérosclérose (Aviram et al., 2002).

- *Action sur la dysfonction érectile*

Azadzoi et al., (2005) ont réalisé une étude sur des lapins souffrant de dysfonctionnement érectile d'origine vasculaire avec une diminution de la circulation sanguine dans les corps caverneux, dysfonction érectile, moindre relâchement des muscles lisses, fibrose caverneuse diffuse et augmentation des taux de produits d'oxydation. La consommation de jus de grenade sur une longue durée permet d'augmenter la circulation sanguine dans les corps caverneux, d'améliorer la réponse érectile et le relâchement des muscles lisses aussi bien chez les animaux souffrants de dysfonction érectile que chez les animaux témoins. De plus, la consommation de jus de grenade a permis la prévention de la fibrose des tissus érectiles chez les animaux atteints de dysfonction érectile.

- *Action anticancéreuse*

Les cellules cancéreuses ont la capacité de redevenir des cellules saines par un processus appelé différenciation. Une étude réalisée sur des promyélocytes humains de leucémie (HL-60) montre que des extraits riches en flavonoïdes, obtenus l'un à partir de jus de grenade fermenté et l'autre à partir de péricarpe de grenade, sont fortement promoteurs de différenciation, alors que l'extrait de jus de grenade frais a un effet plutôt faible. Les extraits de grenade ont aussi une action inhibitrice de la prolifération des cellules cancéreuses, les extraits de jus fermenté et de peau de grenade étant plus efficaces (Kawaii and Lansky, 2004).

- *Action antivirale et antimicrobienne*

Les polyphénols de grenade ont des effets antiviraux et antimicrobiens intéressants. Le jus de grenade contient des inhibiteurs d'entrée du HIV-1 qui peuvent être isolés par adsorption sur de l'amidon de maïs. L'étude de ce complexe montre qu'il bloque la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires (Neurath et al., 2004).

Prashanth and Asha, (2001) ont étudié, in vitro, l'action de différents extraits (hydraulique, alcoolique, et de chloroforme) d'écorce de grenade (péricarpe) sur six espèces bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*. Les résultats de cette étude ont montré que tous les extraits testés présentent une activité antibactérienne, quelle que soit l'espèce bactérienne cultivée. Néanmoins, l'extrait alcoolique semble posséder une activité antibactérienne plus importante que les autres extraits, essentiellement sur *S. aureus*, *P. vulgaris* et *B. subtilis*.

## **Partie 2 : Résultats et discussion**

**Chapitre I : Séparation, isolation et  
élucidation structurelle des nouveaux  
dérivés de l'amide d'acide caféique à partir  
de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L.  
Apiacées**

Dans le cadre de valorisation de la flore endémique de l'Afrique du Nord, une étude phytochimique sur l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. a été élaborée. Les fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. ont été extraits successivement par percolation, avec de l'éther de pétrole, de l'acétate d'éthyle et du méthanol. L'extrait d'acétate d'éthyle a été fractionné ensuite par chromatographie sur colonne de gel de silice. Les séparations, en utilisant une combinaison de Sephadex LH-20, HPLC préparative et semi-préparative, ont donné six nouveaux dérivés de l'amide d'acide caféique **1-6**. De plus, cinq flavones connus **7-11** et quatre lignanes connus ont été identifiées **12-14**.

Les composés **7-14** se sont révélés être des composés phénoliques connus. Ils ont été identifiés comme la lutéoline (**7**), l'apigénine (**8**), le chrysoeriol (**9**), l'apigénine 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**10**), chrysoeriol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**11**), (8R, 7'S, 8'R) - Isolariciresinol -9'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**12**), (7S, 8R) -balanophonine 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**13**) et (7R, 8S, 7'S, 8'R) -4,9,4', 7'-tétrahydroxy-3,3'-diméthoxy-7,9'-époxy-lignane (**14**).

Le composé **1** a été obtenu sous forme d'un solide amorphe brun, avec une formule moléculaire  $C_{24}H_{29}NO_5$ , indiquant la présence de 11 insaturations. Les données RMN ont montré, d'une part, la présence d'un groupement amide d'acide caféique. Et d'autre part, la présence d'une longue chaîne acétylénique de 15 carbones. La corrélation COSY de H-1'' avec NH, et la corrélation HMBC de H-1'' avec le carbonyle (C-1), ont suggéré l'attachement de C-1'' au groupe amide. La corrélation COSY de H-1'' avec H-2'' et la corrélation HMBC de H-1'' avec C-2'' suggéraient la présence d'un alcool secondaire en position 2. La structure du composé **1** a été établie en tant que 3-(3,4-dihydroxyphényl)-N-(9,10-époxy-2-hydroxypentadéc-12,14-diynyl)prop-2-énamide.

Les données RMN du composé **2** ont été superposables à celles du composé **1**. La seule remarquable différence était au niveau du déplacement chimique du C-2'' ( $\delta_{H-2''} 1.44$ ,  $\delta_{C-2''} 29.9$



dans **2** ; vs  $\delta_{H-2''}$  3.51,  $\delta_{C-2''}$  68.9 dans **1**), ce qui suggère que la position C-2'' n'est pas hydroxylée dans **2**. Par conséquent, le composé **2** a été attribué en tant que 3- (3,4-dihydroxyphényl) -N- (9,10-époxy-pentadéc-12,14-diynyl) prop-2-énamide.

La comparaison des données RMN suggère que **3** et **1** ne différaient qu'en position C-9'' et C-10'' ( $\delta_{H-9''}$  4.02,  $\delta_{C-9''}$  66.6;  $\delta_{H-10''}$  3.82,  $\delta_{H-10''}$  70.4 dans **3** vs  $\delta_{H-9''}$  2.92,  $\delta_{C-9''}$  55.8,  $\delta_{H-10''}$  3.09,  $\delta_{C-10''}$  53.4 dans **1**). Ceci indique que **3** a deux groupes hydroxy en position C-9'' et C-10'' au lieu du groupe époxy dans **1**. La structure de **3** a été établie en tant que 3- (3,4-dihydroxyphényl) -N- (2,9,10-trihydroxy-pentadéc-12,14-diynyl) prop-2-énamide.

Les données RMN ont suggéré que **4** et **2** différaient par le nombre de carbones de la longue chaîne acétylénique. Le composé **4** a donc été identifié comme étant le 3- (3,4-dihydroxyphényl) -N- (9,10-époxy-16-hydroxy-octadéc-17-en-12,14-diynyl) prop-2-énamide.

Les spectres RMN 1D et 2D de **5** étaient visuellement superposables à ceux de **4**. La seule différence était la présence d'un groupe oléfinique en position **9** au lieu du groupement époxy en **4**. La structure de **5** a été établie comme 9Z-3- (3,4-dihydroxyphényl) -N- (16-hydroxy-octadéc-9,17-dièn-12,14-diynyl) prop-2-énamide.

La comparaison des données RMN a suggéré que **6** et **4** ne différaient qu'en position C-2'', C-9'' et C-10'', indiquant qu'en **6** les positions C-9'' et C-10'' sont hydroxylées à la place du groupe époxy en **4**, et qu'en **6** la position C-2'' est hydroxylée.

Les spectres de masse obtenus par HRESIMS des deux molécules **3** et **6** indiquait la présence d'une molécule d'eau en plus des carbones et protons identifiés par RMN. Pour démontrer leur stabilité de ces molécules, un calcul des énergies en présence et en absence d'une molécule d'eau a été réalisé. Les énergies calculées ont confirmé que les deux molécules **3** et **6** sont plus stables quand elles incorporent une molécule d'eau en phase gazeuse. La stabilité de cette conformation résulte des interactions intramoléculaires de liaison hydrogène. De plus, la forme hydratée de ces deux molécules a montré une meilleure géométrie des liaisons

hydrogène et moins de déformation intramoléculaire (liaison et angles de torsion). Contrairement au composé **3** et **6**, **1** étaient moins stables en présence d'une molécule d'eau, ce qui explique qu'aucune molécule d'eau n'a été révélée par MS pour le composé **1**.

Notre étude phytochimique sur les fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. a conduit à la caractérisation de six nouveaux dérivés d'amide d'acide caféique, cinq flavones connus (**7-11**) et quatre lignanes connus (**12-14**). Pour la première fois, notre étude a rapporté l'isolement de composés d'acide caféique attachés à une chaîne acétylénique par une liaison amide (**1-6**).

# Caffeic acid amides derivatives from *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits (Apiaceae)

## Abstract

As part of the enhancement of endemic flora of north Africa, an elaborated phytochemical study on *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits ethyl acetate extract led to the characterization of six new caffeic acid amide derivatives, five known flavones and four known lignans. Isolation was achieved by silica and Sephadex LH20 gel column chromatography, preparative, and semipreparative HPLC with PDA detectors. Structural elucidation was performed by extensive 1D and 2D NMR, mass spectrometry, UV, electronic circular dichroism (ECD), and by GC-MS of sugar derivatives. All of the compounds were obtained from the titled plant for the first time.

**Keywords:** *Ammodaucus leucotrichus* L., Apiaceae, caffeic acid amide, LC-PDA-ELSD-MS, NMR.

## 1. Introduction

*Ammodaucus leucotrichus* L., belonging to the Apiaceae family is the only species of the *Ammodaucus* genus. The plant is distributed throughout North Africa, Morocco, Algeria, Tunisia, extending to Egypt, and tropical Africa (Velasco-Negueruela et al., 2006). The plant is used mainly for its fruits. According to ethnobotanical studies, it is widely used in traditional medicine for the treatment of certain disorders, particularly of the digestive system, and diabetes (Jouad et al., 2001; Mustapha et al., 2012; Telli et al., 2016). In Morocco, *A. leucotrichus* L. fruits, locally known as “Kammun essoufi”, “Hairy cumin”, are used by the local population, either in powder form or in a decoction to treat gastric-intestinal pain,

gastralgia, and indigestion (Idm'hand et al., 2020). It is also frequently used as an infusion for various infant diseases of the digestive tract: dysentery, nausea, vomiting, and regurgitation. Moreover, the infusion of these fruits has tonic properties for babies (Abu Zarga et al., 2013a). Most phytochemical, and biological investigations of *A. leucotrichus* L. are related to the essential oils (Dahmane et al., 2017; Hajib et al., 2020; Halla et al., 2018; Sadaoui et al., 2018). However, limited scientific studies have been conducted towards the non-volatile compounds. According to a recent study, Ziani et al., (2018) described by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, the phenolic compounds of decoctions, and hydroethanolic fruits extracts of *A. leucotrichus* L. In addition to some common monoterpenoids ((+)-limonene, (+)-perillaldehyde, (+)-3-hydroxyperillaldehyde (4)), (-)-methyl- perillate, (+)-borneol angelate, and (+)-7-decalactone), Muckensturm et al., (1997) reported the isolation of the ammolactone-A as a new guaianolide lactone from the ethereal extract of *A. leucotrichus* L. fruits.

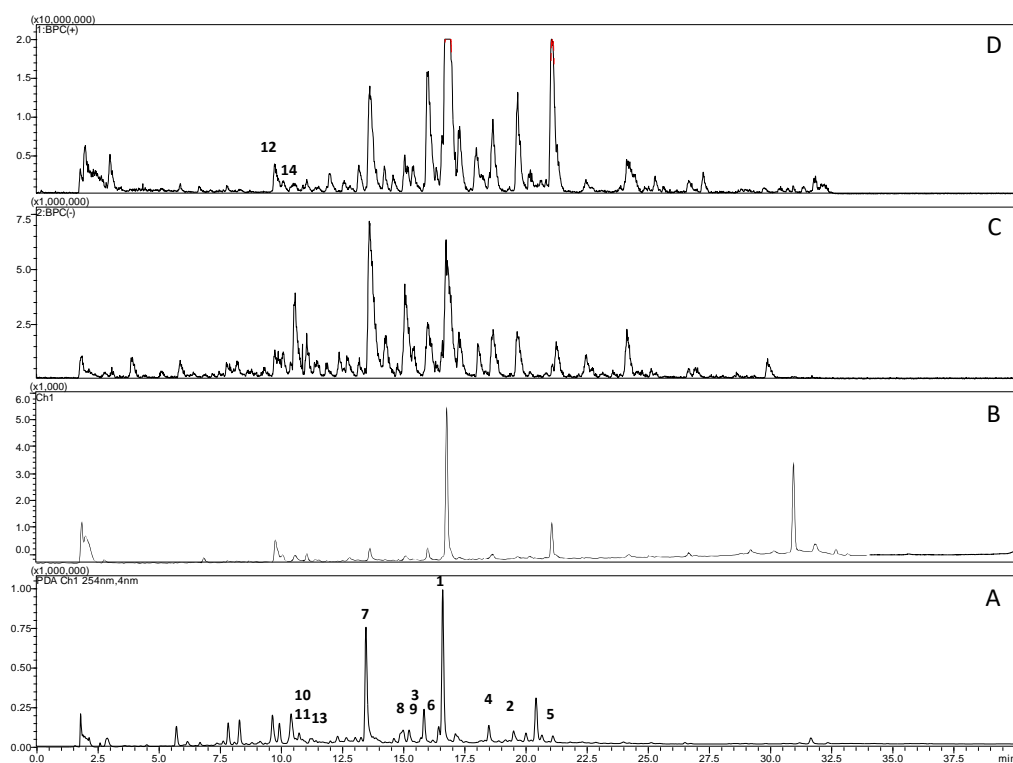
However, to the author's best knowledge, except the study published by Muckensturm et al., (1997) no reports regarding the isolation of compounds from *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits, has been published so far. We here report the isolation, and the structure elucidation of 14 compounds from ethyl acetate extract of *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits (**1-14**), including 6 new caffeic acid derivatives.

## **2. Experimental section (voir partie 3)**

## **3. Results and Discussion**

The air-dried powdered fruits of *A. leucotrichus* L. were extracted successively by percolation, with petroleum ether, ethyl acetate, and methanol. The ethyl acetate extract of *A. leucotrichus* L. was fractionated by silica gel column chromatography. Targeted isolation, using a combination of sephadex LH-20, preparative, and semipreparative HPLC, afforded six new caffeic acid amides derivatives **1-6**. In addition, five known flavones **7-11**, and four known

lignans were identified **12-14**. The HPLC profile of the ethyl acetate extract, and peaks corresponding to compounds **1-14** are illustrated by figure 1.

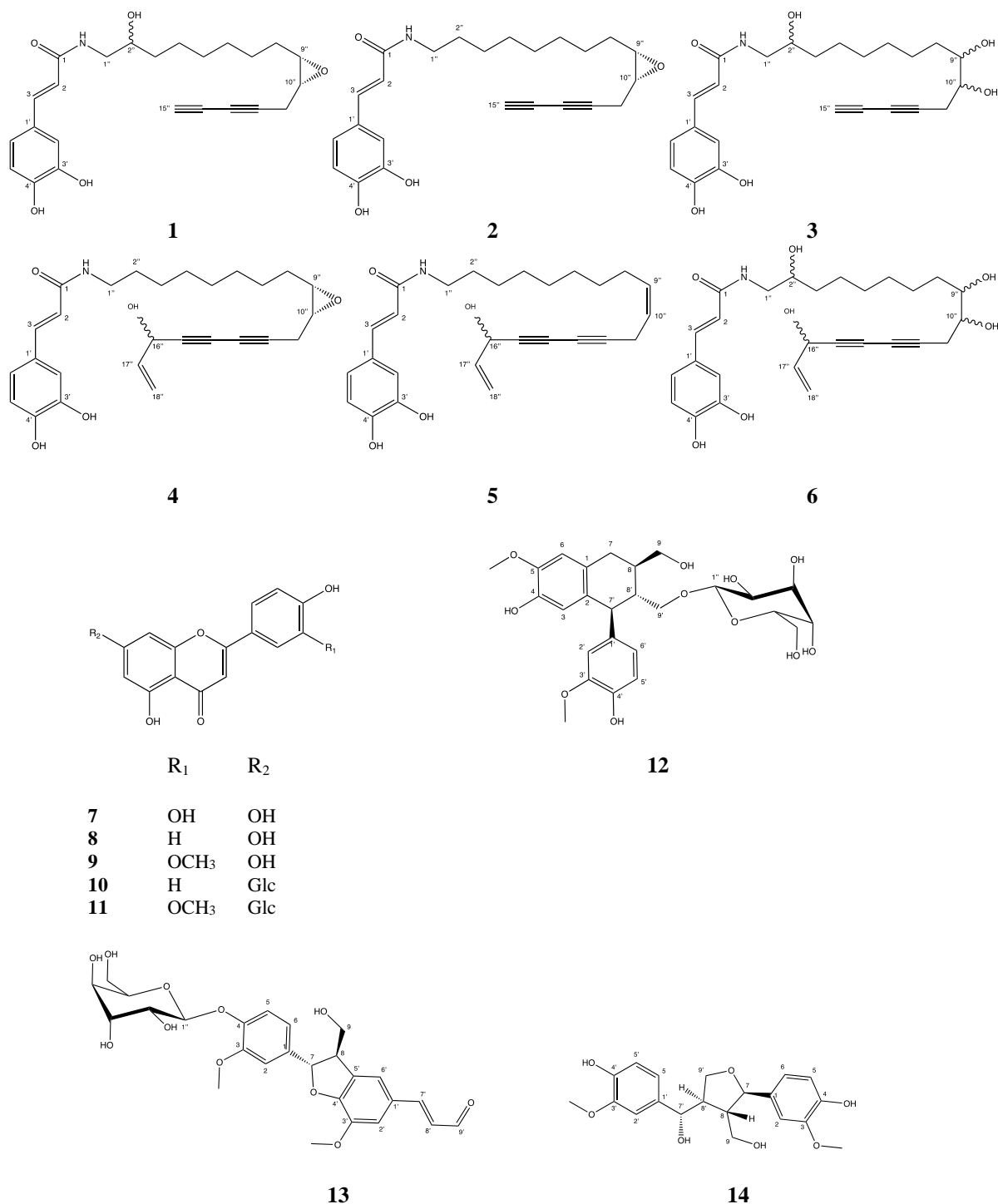


**Figure 33.** HPLC profile of *A. leucotrichus* L. ethyl acetate extract. Profile was recorded with PDA (A), ELSD (B), and ESIMS in negative (C)- and positive (D)-ion modes. Peak numbering designates identified compounds **1-14**.

Structure elucidation was achieved by means of extensive 1D, and 2D NMR analysis, and HRESIMS. Furthermore, sugar moieties in compounds **10-13** were identified by GC-MS after acid hydrolysis followed by derivatization with L-cystein methyl ester, subsequent silylation, and comparison with derivatized reference sugars.

Compounds **7-14** were found to be known phenolic compounds by NMR spectroscopic data analysis (tables 25-29, Supporting Information) and comparison with literature. These compounds were reported for the first time from *A. leucotrichus* L. species. They were identified as luteolin (**7**) (Lin et al., 2015), apigenin (**8**) (Shen et al., 1993), chrysoeriol (**9**) (Bashyal et al., 2019), apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**10**) (Stochmal et al., 2001), chrysoeriol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**11**) (Minh et al., 2015), (8R,7'S,8'R)-Isolariciresinol-9'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**12**) (Zhang et al., 2016), (7S,8R)-balanophonin 4-O- $\beta$ -D-

glucopyranoside (**13**) (Warashina et al., 2004), and (7R,8S,7'S,8'R)-4,9,4',7'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan (**14**) (MacHida et al., 2010).



**Figure 34.** Structures of isolated compounds **1-14**.

Compound **1** was obtained as a brown amorphous solid, with a molecular formula C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>5</sub>, indicating 11 indices of hydrogen deficiency, as determined from its <sup>13</sup>C NMR

data, and an HRESIMS ion  $m/z$  434.1925  $[M + Na]^+$  (calcd for  $C_{24}H_{29}NNaO_5^+$ , 434.1938). The NMR data showed on one hand the presence of two olefinic carbon ( $\delta_{C-2}$  118.4 and  $\delta_{C-3}$  138.7), four aromatic carbons ( $\delta_{C-1'}$  126.1,  $\delta_{C-2'}$  113.5,  $\delta_{C-5'}$  115.4, and  $\delta_{C-6'}$  120.1), two oxygenated aromatic carbons ( $\delta_{C-3'}$  145.3 and  $\delta_{C-4'}$  147.0), and one carbonyl ( $\delta_{C-1}$  165.4) indicating a caffeic acid amide moiety. On the other hand, eight methylenes ( $\delta_{C-1''}$  45.0,  $\delta_{C-3''}$  34.3,  $\delta_{C-4''}$  24.8,  $\delta_{C-5''}$  24.8,  $\delta_{C-6''}$  34.3,  $\delta_{C-7''}$  25.7,  $\delta_{C-8''}$  26.6, and  $\delta_{C-11''}$  18.1), three oxygenated methines ( $\delta_{C-2''}$  68.9,  $\delta_{C-9''}$  55.8, and  $\delta_{C-10''}$  53.4), and three acetylenic carbons; including two quaternary ( $\delta_{C-12''}$  74.3,  $\delta_{C-13''}$  69.2), and one methine ( $\delta_{C-14''}$  65.7) indicating a long acetylenic chain of 15 carbons similar to 9,7-epoxytetradeca-1,3-diyne (Kobayashi et al., 1997). The COSY correlation of H-1'' with NH, and the HMBC correlation of H-1'' with the carbonyl (C-1), suggested the attachment of C-1'' to the amide group of the caffeic acid amide. The COSY correlation of H-1'' with H-2'', and the HMBC correlation of H-1'' with C-2'' suggested the presence of a secondary alcohol in position 2. Key NMR correlations for **1** are illustrated by figure 3. Interestingly, the acetylenic methine group of **1** on DMSO-*d*6 ( $\delta_{H-15''}$  3.36,  $\delta_{C-15''}$  67.1) had a very different chemical shift than in  $CDCl_3$  ( $\delta_{H-1}$  2.02,  $\delta_{C-1}$  65.5) as found in 9,7-epoxytetradeca-1,3-diyne (Kobayashi et al., 1997). A corresponding chemical shift was also obtained for **1** in  $CDCl_3$  ( $\delta_{H-15''}$  3.36,  $\delta_{C-15''}$  67.1). Thus, the structure of **1** was established as 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(9,10-epoxy-2-hydroxypentadec-12,14-diyne)prop-2-enamide. The coupling constants between H-9'', and H-10'' ( $J = 4.4$  Hz) suggested a *cis* configuration of the epoxy group.

A molecular formula of  $C_{24}H_{29}NO$  was assigned to compound **2** on the basis of a molecular ion at  $m/z$  418.1995  $[M + Na]^+$  in the positive ion HRESIMS spectrum (calcd for  $C_{24}H_{29}NNaO_5^+$ , 418.1989). The NMR data of **2** closely resembled those of **1**. The only remarkable difference was a upfield shift of C-2'' in **2** ( $\delta_{H-2''}$  1.44,  $\delta_{C-2''}$  29.9; vs  $\delta_{H-2''}$  3.51,  $\delta_{C-2''}$

2'' 68.9 in **1**), which suggested that the position C-2'' is not hydroxylated. Accordingly, compound **2** was assigned as 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(9,10-epoxypentadec-12,14-diynyl)prop-2-enamide. The relative configuration of the epoxy group was elucidated from the coupling constants between H-9'', and H-10'' ( $J = 4.3$  Hz) indicating a *cis* configuration.

Compound **3** had a molecular formula of  $C_{24}H_{31}NO_6$ , as deduced from the signal at  $m/z$  470.1707  $[M+H_2O+Na]^+$  (calcd for  $C_{24}H_{31}O_6NNa^+$ ,  $H_2O$ , 470.2149) in the positive ion HRESIMS spectrum, which was higher by 36 units from that of **1**. Comparison of NMR data suggested that **3**, and **1** differed only in position C-9'', and C-10''. The difference was a downfield shift of C9'', and C10'' in **3** ( $\delta_{H-9''}$  4.02,  $\delta_{C-9''}$  66.6;  $\delta_{H-10''}$  3.82,  $\delta_{H-10''}$  70.4 vs  $\delta_{H-9''}$  2.92,  $\delta_{C-9''}$  55.8,  $\delta_{H-10''}$  3.09,  $\delta_{C-10''}$  53.4 in **1**), indicating that **3** has two hydroxy group in position C-9, and C-10 instead of the epoxy group, that combines with a molecule of water by hydrogen bond, visible in mass spectrometry. Calculated energies (Table 9) confirmed that all configurations of **3** prefer hydration by one water molecule in the gas phase. This water molecule is snugly incorporated in a continuous path of intramolecular H-bond interactions stabilizing the conformation in the gas phase. In addition, the hydrated form showed a better geometry of H-bonds and less intramolecular strain (bond and torsion angles). Unlike to compound **3**, both configurations of **1** were less stable with a water molecule bound, which agrees well with the fact that no water has been observed by MS experiment with compound **1**. Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form of the global minima of compound **1** and **3** are shown in Figures S4 and S5, Supporting information. Therefore, the structure of **3** was established as 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(2,9,10-trihydroxypentadec-12,14-diynyl)prop-2-enamide.



**Table 7.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectroscopic data of **1-3** (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500.13 Hz for  $^1\text{H}$  and 125.77 for  $^{13}\text{C}$  NMR;  $\delta$  in ppm).

No.	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , type	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)
1	165.4, C		165.0, C		165.5, C	
2	118.4, CH	6.40, d (15.6)	118.3, CH	6.31, d (15.6)	118.3, CH	6.40, d (15.6)
3	138.7, CH	7.23, d (15.6)	138.6, CH	7.21, d (15.6)	138.9, CH	7.23, d (15.6)
1'	126.1, C		126.0, C		126.0, C	
2'	113.5, CH	6.94, d (1.5)	113.6, CH	6.93, br s	113.6, CH	6.94, d (1.5)
3'	145.3, C		145.4, C		145.3, C	
4'	147.0, C		147.3, C		147.4, C	
5'	115.4, CH	6.74, d (8.2)	115.5, CH	6.73, br d (8.2)	115.5, CH	6.72, d (8.2)
6'	120.1, CH	6.82, dd (8.2, 1.5)	119.8, CH	6.81, dd (8.1, 1.4)	120.0, CH	6.82, dd (8.2, 1.5)
1''	45.0, CH <sub>2</sub>	3.07 <sup>b</sup> 3.22, br d (13.4)	38.3, CH <sub>2</sub>	3.14, br t (6.7)	45.1, CH <sub>2</sub>	3.07, br dd (13.3, 6.7) 3.22, br dd (13.3, 4.4)
2''	68.9, CH	3.51, m	28.9, CH <sub>2</sub>	1.44 <sup>b</sup>	69.0, CH	3.51, m
3''	34.3, CH <sub>2</sub>	1.39 <sup>b</sup> 1.29 <sup>b</sup>	26.1, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>b</sup>	34.3, CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>b</sup> 1.38 <sup>b</sup>
4''	24.8, CH <sub>2</sub>	1.40 <sup>b</sup> 1.28 <sup>b</sup>	28.4, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>b</sup>	24.7, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>b</sup> 1.39 <sup>b</sup>
5''	24.8, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>b</sup>	28.4, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>b</sup>	28.6, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>
6''	34.3, CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>b</sup>	28.4, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>b</sup>	28.2, CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>b</sup>
7''	25.7, CH <sub>2</sub>	1.40 <sup>b</sup>	25.6, CH <sub>2</sub>	1.40 <sup>b</sup>	25.9, CH <sub>2</sub>	1.36 <sup>b</sup> 1.46 <sup>b</sup>
8''	26.6, CH <sub>2</sub>	1.47, br t (6.4)	26.5, CH <sub>2</sub>	1.47 <sup>b</sup>	33.5, CH <sub>2</sub>	1.68, m 1.77, m
9''	55.8, CH	2.92, td (6.2, 4.4)	55.7, CH	2.92, td (6.1, 4.2)	66.6, CH	4.02, m
10''	53.4, CH	3.09 <sup>b</sup>	53.2, CH	3.09, td (6.1, 4.2)	70.4, CH	3.82, m
11''	18.1, CH <sub>2</sub>	2.56, dd (18.0, 6.2) 2.63, dd (18.0, 6.2)	18.1, CH <sub>2</sub>	2.64, dd (17.7, 6.1) 2.55, dd (17.7, 6.1)	24.3, CH <sub>2</sub>	2.55, m
12''	74.3, C		74.2, C		75.4, C	
13''	69.2, C		65.7, C		68.1, C	
14''	65.7, C		67.5, C		65.5, C	
15''	67.1, CH	3.36, s	68.3, CH	3.37, s	68.1, CH	3.35, s
NH		7.86, br s		7.86, br s		7.85, s

<sup>a</sup> $^{13}\text{C}$  shifts were extracted from HSQC and HMBC data. <sup>b</sup>Overlapped  $^1\text{H}$ -NMR signals are reported without multiplicities.

Compound **4** had a molecular formula of  $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_5$ , indicating 12 indices of hydrogen deficiency, as determined from its HRESIMS ion  $m/z$  474.2251 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> (calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NNaO}_5^+$ , 474.2251). The NMR suggested that **4**, and **2** differed in carbon number of the long acetylenic chain. In fact, eight methylenes ( $\delta_{\text{C-1}''}$  38.5,  $\delta_{\text{C-2}''}$  29.0,  $\delta_{\text{C-3}''}$  26.3,  $\delta_{\text{C-4}''}$  28.5,  $\delta_{\text{C-5}''}$  28.5,  $\delta_{\text{C-6}''}$  28.5,  $\delta_{\text{C-7}''}$  25.7,  $\delta_{\text{C-8}''}$  26.7, and  $\delta_{\text{C-11}''}$  18.5), three oxygenated methines ( $\delta_{\text{C-9}''}$  55.8,  $\delta_{\text{C-10}''}$  53.4 and  $\delta_{\text{C-11}''}$  61.4), three quaternary acetylenic carbons ( $\delta_{\text{C-12}''}$  77.5,  $\delta_{\text{C-13}''}$  65.6 and  $\delta_{\text{C-14}''}$  68.7), one olefinic methine ( $\delta_{\text{C-17}''}$  137.3), and one olefinic methylene ( $\delta_{\text{C-18}''}$  115.2) indicated a long acetylenic chain of 18 carbons similar to panaxytriol (Kobayashi et al., 1997). The COSY correlation of H-1'' with NH and the HMBC correlation of H-1'' with the carbonyl

(C-1), suggested the attachment of C-1'' to the amide group of the caffeic acid amide. Key NMR correlations for **4** are illustrated by figure 3. Compound **4** was therefore identified as 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(9,10-epoxy-16-hydroxyoctadec-17-en-12,14-diynyl)prop-2-enamide. The relative configuration of the epoxy group was elucidated from the coupling constant between H-9'' and H-10'' ( $J = 4.3$  Hz), suggesting that H-9'' should be *cis* to H-10''.

Compound **5** showed a molecular ion at  $m/z$  458.2295  $[M + Na]^+$  in the positive ion HRESIMS spectrum, corresponding to a molecular formula of  $C_{27}H_{33}NO_4$  (calcd for  $C_{27}H_{33}NNaO_4^+$ , 458.2302). 1D and 2D NMR spectra of **5** were virtually superimposable to those of **4**. The only difference was in the presence of olefinic group in position 9 vs an epoxy group in **4** ( $\delta_{H-9''}$  5.49,  $\delta_{C-9''}$  132.3;  $\delta_{H-10''}$  5.36,  $\delta_{H-10''}$  121.9 vs  $\delta_{H-9''}$  2.91,  $\delta_{C-9''}$  55.8,  $\delta_{H-10''}$  3.08,  $\delta_{C-10''}$  53.5 in **4**). The coupling constant between H-9'' and H-10'' ( $J = 10.5$  Hz) indicated a *Z*-configuration. Therefore, the structure of **5** was established as 9*Z*-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(16-hydroxyoctadec-9,17-dien-12,14-diynyl)prop-2-enamide.

Compound **6** had a molecular formula of  $C_{27}H_{35}NO_7$ , indicating 11 indices of hydrogen deficiency, as determined from its HRESIMS ion  $m/z$  526.1966  $[M+H_2O+Na]^+$  (calcd for  $C_{27}H_{35}NNaO_7^+$ ,  $H_2O$ , 526.2412). Comparison of NMR data suggested that **6**, and **4** differed only in position C-2'', C-9'', and C-10''. The difference was a downfield shift of C-9'', and C-10'' in **6** ( $\delta_{H-9''}$  4.02,  $\delta_{C-9''}$  66.9;  $\delta_{H-10''}$  3.81,  $\delta_{H-10''}$  70.8 vs  $\delta_{H-9''}$  2.91,  $\delta_{C-9''}$  55.8,  $\delta_{H-10''}$  3.08,  $\delta_{C-10''}$  53.5 in **4**), indicating that in **6**, the position C-9'', and C-10'' are hydroxylated instead of the epoxy group in **4**. In addition, a downfield shift of C-2'' in **6** was noticed ( $\delta_{H-2''}$  3.51,  $\delta_{C-2''}$  69.3 vs  $\delta_{H-2''}$  1.45,  $\delta_{C-2''}$  29.0 in **4**), which suggested that, in **6**, the position C-2'' is hydroxylated. Similarly to **3**, calculated energies of **6** (table 9) showed that all configurations were more stable in complex with one water molecule in the gas phase, which confirmed the mass observed in MS. Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form global minima of compound **1** and **3** are shown in Figure S6, Supporting information. Therefore, the structure of **6** was

established as 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(2,9,10,16-tetrahydroxyoctadec-17-en-12,14-diynyl)prop-2-enamide.

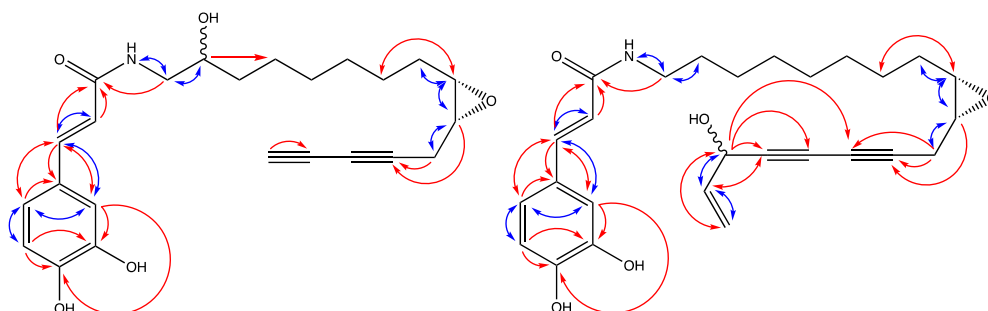
**Table 8.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of **4-6** (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$  NMR;  $\delta$  in ppm).

Position	<b>4</b>		<b>5</b>		<b>6</b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)
1	165.3, C		165.0, C		165.9, C	
2	118.4, CH	6.33, br d (15.6)	118.3, CH	6.32, d (15.6)	118.6, CH	6.41, d (15.6)
3	138.8, CH	7.23, d (15.6)	138.5, CH	7.22, d (15.6)	139.2, CH	7.23, br d (15.6)
1'	126.4, C		126.0, C		<sup>c</sup>	
2'	113.8, CH	6.94, br s	113.6, CH	6.94, br s	114.1, CH	6.94, br s
3'	145.4, C		145.2, C		142.4, C	
4'	147.3, C		147.0, C		147.5, C	
5'	115.6, CH	6.74, d (7.9)	115.4, CH	6.74, d (8.2)	115.9, CH	6.73, br s
6'	120.0, CH	6.82, br d (7.9)	119.8, CH	6.82, dd (8.2, 1.5)	120.3, CH	6.81, br d (7.0)
1''	38.5, CH <sub>2</sub>	3.14, br t (6.3)	38.3, CH <sub>2</sub>	3.14, m	45.4, CH <sub>2</sub>	3.23, br d (12.5) 3.07, m
2''	29.0, CH <sub>2</sub>	1.45 <sup>b</sup>	28.8, CH <sub>2</sub>	1.44, m	69.3, CH	3.51, m
3''	26.3, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	26.1, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	34.6, CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>b</sup> 1.38 <sup>b</sup>
4''	28.5, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	28.3, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	25.0, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup> 1.39 <sup>b</sup>
5''	28.5, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	28.3, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	28.8, CH <sub>2</sub>	1.25 <sup>b</sup>
6''	28.5, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	28.3, CH <sub>2</sub>	1.27 <sup>b</sup>	28.8, CH <sub>2</sub>	1.25 <sup>b</sup>
7''	25.7, CH <sub>2</sub>	1.39 <sup>b</sup>	28.1, CH <sub>2</sub>	1.38 <sup>b</sup> 1.32 <sup>b</sup>	26.2, CH <sub>2</sub>	1.48 <sup>b</sup> 1.36 <sup>b</sup>
8''	26.7, CH <sub>2</sub>	1.47 <sup>b</sup>	26.2, CH <sub>2</sub>	2.01, dt (7.1)	33.9, CH <sub>2</sub>	1.78, m 1.68, m
9''	55.8, CH	2.91, td (6.0, 4.2)	132.3, CH	5.49, dtt (10.5, 7.1, 1.2)	66.9, CH	4.02, m
10''	53.5, CH	3.08, td (6.0, 4.3)	121.9, CH	5.36, m	70.8, CH	3.81, m
11''	18.5, CH <sub>2</sub>	2.56, dd (17.7, 5.8) 2.65, dd (18.0, 6.4)	16.6, CH <sub>2</sub>	3.09, m	24.8, CH <sub>2</sub>	2.55, m
12''	77.5, C		79.7, C		79.0, C	
13''	65.6, C		63.7, C		65.7, C	
14''	68.7, C		68.8, C		69.2, C	
15''	77.2, C		76.6, C		77.0, C	
16''	61.4, CH	4.85, br d (5.4)	61.3, CH	4.84, br d (5.2)	61.7, CH	4.85, br s
17''	137.3, CH	5.86, ddd (16.8, 10.1, 5.4)	137.2, CH	5.85, ddd (16.8, 10.1, 5.2)	137.6, CH	5.86, ddd (16.9, 10.1, 5.2)
18''	115.2, CH <sub>2</sub>	5.33, br d (16.8) 5.13, br d (10.1)	114.9, CH <sub>2</sub>	5.13, d (10.1) 5.31, br d (16.8)	115.4, CH <sub>2</sub>	5.14, br d (10.1) 5.32, br d (16.9)
NH		7.87, s		7.87, br s		8.27, s

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  shifts were extracted from HSQC and HMBC data. <sup>b</sup> Overlapped  $^1\text{H}$ -NMR signals are reported without multiplicities. <sup>c</sup> Signal not found.

**Table 9.** Calculated energies E (Hydrated-Dry) of compounds **1**, **3**, and **6** in Kcal/mol.

Compounds	Configuration	E (Hydrated – Dry) in kcal/mol
<b>1</b>	Cis-2'',9'',10''-SRR	2.63
	Cis-2'',9'',10''-SRS	1.54
<b>3</b>	2'',9'',10''-SSS	-2.03
	2'',9'',10''-RSS	-0.30
<b>6</b>	2'',9'',10'',16''-SRSS	-5.74
	2'',9'',10'',16''-SSSR	-5.43
	2'',9'',10'',16''-SRSR	-4.49



**Figure 35.** Key 1H-1H COESY (red line) and HMBC (blue line) correlations in compounds **1** and **4**.

(8R,7'S,8'R)-Isolariciresinol-9'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**12**) had been previously isolated from *Averrhoa carambola* L. roots (Wen et al., 2012). The S-configuration of C-7' was confirmed by a positive and a negative Cotton effect (CE) at 275 nm and 293 nm, respectively (Wen et al., 2012; Zhang et al., 2016). The coupling constant between H-7', and H-8' ( $J = 10.1$  Hz) revealed an antiperiplanar orientation of H-7', and H-8', indicating that C-8' had a R-configuration. The R-configuration of C-8' was confirmed from the coupling constant between H-8', and H-8 ( $J = 9.8$  Hz), suggesting that H-7' and H-8' are on different sides.

Compound **13** was elucidated as a lignan glucoside. The  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectra were similar to those of balanophonin 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, already isolated by Warashina et al., (2004) from *Tabebuia impetiginosa* bark. The coupling constant between H-7 and H-8 ( $J = 6.3$  Hz) indicated an antiperiplanar orientation of H-7 and H-8. The optical rotation and ECD spectrum of **13** ( $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} + 11$  (c 0.05, MeOH);  $\lambda_{\text{max}}(\Delta\epsilon)$  203 (9.55), 225 (1.82), 239 (-0.3), 250 (1.07), 274 (-0.3), 299 (2.05)), were similar to those of (7S,8R)-balanophonin 4-O- $\beta$ -D-

glucopyranoside ( $[\alpha]_{Na}^{25} + 7.5$  (c 0.94, MeOH);  $\lambda_{max} (\Delta\epsilon)$  233 (-0.3), 258 (0.4), 277 (-1.3), 338 (1.8)) (Warashina et al., 2004), indicating that C-7, and C-8 had S- and R-configurations, respectively.

4,9,4',7'-Tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan (**14**) has been isolated by MacHida et al., (2010) from *Osmanthus fragrans* Lour. var. *aurantiacus* Makino leaves. The ECD spectrum of **14** showed two negative CEs  $\lambda_{max} (\Delta\epsilon)$  204 (-3.4), 233 (-0.59), similar to those of (7R,8S,7'S,8'R)-4,9,4',7'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan ( $\lambda_{max} (\Delta\epsilon)$  205 (-20.3), 235 (-5.2), and opposite to those of (7S,8R,7'R,8'S)-4,9,4',7'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan ( $\lambda_{max} (\Delta\epsilon)$  206 (20.0), 234 (5.8) (MacHida et al., 2010), indicating that C-7, C-8, and C-8' had (R)-, (S)-, and (R)-configurations, respectively. The coupling constant between H-7', and H-8' (J= 8.8 Hz) revealed an antiperiplanar orientation of H-7', and H-8', which indicated that C-7' had a S-configuration. Compound **15** was thus assigned as (7R,8S,7'S,8'R)-4,9,4',7'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan.

- 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(9,10-epoxy-2-hydroxypentadec-12,14-diynyl)prop-2-enamide (**1**)

Amorphous solid;  $[\alpha]_{Na}^{25} - 8.46$  (c 0.47, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max} (\log \epsilon)$  221 (0.66), 240 (0.56), 297 (0.56), 325 (0.64) nm;  $^1H$  NMR, and  $^{13}C$  NMR data, see table 7; (+)-HRESIMS  $m/z$  434.1925  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{24}H_{29}NNaO_5^+$ , 434.1938).

- 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(9,10-epoxypentadec-12,14-diynyl)prop-2-enamide (**2**)

Amorphous solid;  $[\alpha]_{Na}^{25} - 8.25$  (c 0.47, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max} (\log \epsilon)$  218 (0.68), 239 (0.53), 295 (0.44), 323 (0.43) nm;  $^1H$  NMR, and  $^{13}C$  NMR data, see table 7; (+)-HRESIMS  $m/z$  418.1995  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{24}H_{29}NNaO_5^+$ , 418.1989).

- 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(2,9,10-trihydroxypentadec-12,14-diynyl)prop-2-enamide (**3**)

Amorphous brown solid;  $[\alpha]_{Na}^{25} - 3.88$  (c 0.47, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max} (\log \epsilon)$  219 (0.57), 239 (0.46), 297 (0.42), 325 (0.47) nm;  $^1H$  NMR, and  $^{13}C$  NMR data, see table 7; (+)-HRESIMS  $m/z$  470.1707  $[M+H_2O+Na]^+$  (calcd for  $C_{24}H_{31}NNaO_6^+$ ,  $H_2O$ , 470.2149).

- *3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(9,10-epoxy-16-hydroxyoctadec-17-en-12,14-diynyl)prop-2-enamide (4)*  
 Amorphous solid [ $\alpha$ ]<sub>Na</sub><sup>25</sup> - 11 (c 0.47, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 218 (0.55), 242 (0.39), 300 (0.41), 317 (0.40) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 8; (+)-HRESIMS *m/z* 474.2251 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>5</sub><sup>+</sup>, 474.2251).
- *9Z-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(16-hydroxyoctadec-9,17-dien-12,14-diynyl)prop-2-enamide (5)*  
 Amorphous solid; [ $\alpha$ ]<sub>Na</sub><sup>25</sup> - 6.28 (c 0.47, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 218 (0.69), 237 (0.53), 299 (0.51), 317 (0.49) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 8; (+)-HRESIMS *m/z* 458.2295 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>4</sub><sup>+</sup>, 458.2302).
- *3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-N-(2,9,10,16-tetrahydroxyoctadec-17-en-12,14-diynyl)prop-2-enamide (6)*  
 Amorphous solid; [ $\alpha$ ]<sub>Na</sub><sup>25</sup> - 5.82 (c 0.47, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 219 (0.41), 241 (0.30), 297 (0.28), 328 (0.32) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 8; (+)-HRESIMS *m/z* 526.1966 [M+H<sub>2</sub>O+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>NNaO<sub>7</sub>, H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>, 526.2412).
- *Luteolin (7)*  
 Amorphous solid; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 214 (0.45), 318 (0.47) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 25, Supporting information.
- *Apigenin (8)*  
 Amorphous solid; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 230 (0.56), 302 (0.66) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 25, Supporting information.
- *Chrysoeriol (9)*  
 Amorphous solid; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 231 (0.45), 313 (0.66) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 25, Supporting information.
- *Apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (10)*  
 Amorphous solid; [ $\alpha$ ]<sub>Na</sub><sup>25</sup> - 30.8 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 231 (0.63), 296 (0.72) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 26, Supporting information.
- *Chrysoeriol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (11)*  
 Amorphous solid; [ $\alpha$ ]<sub>Na</sub><sup>25</sup> - 29.7 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 231 (0.55), 314 (0.63) nm; <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR data, see table 26, Supporting information.
- *(8R,7'S,8'R)-Isolariciresinol-9'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (12)*  
 Amorphous solid; [ $\alpha$ ]<sub>Na</sub><sup>25</sup> + 28.6 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 228 (0.23), 283 (0.11) nm; ECD (MeOH, c 0.8 mM, 0.1 cm path length):  $\lambda_{\max}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 202 (-8.4), 214 (-6.41), 239

(2.3), 277 (1.88), 298 (-2.98) (shoulder);  $^1\text{H}$  NMR, and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see table 27, Supporting information.

- *(7S,8R)-balanophonin 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (13)*

Oil;  $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} + 11$  (c 0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 226 (0.34), 283 (0.12), 338 (0.18) nm; ECD (MeOH, c 0.8 mM, 0.1 cm path length):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 203 (9.55), 225 (1.82), 239 (-0.3), 250 (1.07), 274 (-0.3), 299 (2.05) (shoulder);  $^1\text{H}$  NMR, and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see table 28, Supporting information.

- *(7R,8S,7'S,8'R)-4,9,4',7'-tetrahydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan (14)*

Amorphous solid;  $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} - 11$  (c 0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 233 (0.75), 283 (0.26) nm; ECD (MeOH, c 0.8 mM, 0.1 cm path length):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ) 204 (-3.4), 233 (-0.59) (shoulder);  $^1\text{H}$  NMR, and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see table 29, Supporting information.

## 4. Conclusion

A phytochemical study of *Ammodaucus leucotrichus* L. led to the characterization of six new caffeic acid amide derivatives, five known flavones (**7-11**) and four known lignans (**12-14**). For the first time, our study reported the isolation of caffeic acid compounds attached to an acetylenic chain by amide bond (**1-6**).

**Chapitre II : Composition chimique et  
activités biologiques de l'huile essentielle  
des deux espèces *Cuminum cyminum* L. et  
*Ammodaucus leucotrichus* L.**



Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation à partir des fruits des deux espèces : *Cuminum cyminum* L. (CC) et *Ammodaucus leucotrichus* L. (AL) Les résultats obtenus ont montré un rendement en huile essentielle de 1.69 % pour le fruit CC et de 2.18 % pour le fruit AL.

Les deux huiles essentielles ont été analysées par GC-FID et GC-MS. Au total, 21 composés ont été identifiés pour le CC, représentant 98.7% de la composition totale de l'huile. Pour AL, 21 composés ont été identifiés (98.4% de la composition totale de l'huile essentielle). Les deux huiles essentielles se composent principalement de monoterpénoïdes (CC : 98.3 % et AL : 97.9 %), représentés par des monoterpènes oxygénés (CC : 71.9 % et AL : 85.5 %) et des hydrocarbures monoterpéniques (CC : 26.4 % et AL : 12.4 %). L'analyse de l'huile essentielle CC a montré que cette dernière contient cinq composés majoritaires :  $\gamma$ -terpinen-7-al (37.2 %) cuminaldéhyde (29.1 %),  $\gamma$ -terpinène (10.0 %),  $\beta$ -pinène (7.1 %) et p -cymène (6.1 %). L'analyse de l'huile essentielle de l'espèce AL a révélé qu'il contient principalement 2 composés majoritaires : le perrila aldéhyde (78.2 %) et le limonène (9.5 %).

L'activité antioxydante des deux huiles essentielles a été évaluée par quatre méthodes, DPPH, ABTS, FRAP et dosage de blanchiment du  $\beta$ -carotène. Les résultats obtenus par les quatre tests se concordent. En fait, l'huile essentielle des fruits de CC est plus puissante que celle obtenue à partir des fruits d'AL. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'huile de CC est plus riche en composés hydroxylés que l'huile de AL. Les tests DPPH, ABTS et FRAP ont révélé un potentiel antioxydant médian pour huile essentielle des deux espèces. Cependant, le test de blanchiment au  $\beta$ -carotène a révélé un pouvoir antioxydant remarquable pour les deux huiles. Ceci peut s'expliquer par l'affinité lipophile des huiles avec le mélange réactionnel.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des deux espèces, CC et AL, a été réalisée contre dix souches bactériennes ; trois Gram-positifs (*Enterococcus faecalis*,

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*) et sept Gram-négatifs (*Salmonella spp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*). Les souches ont été choisies pour leur capacité connue à contaminer les aliments et pour leur pathogénicité. Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles a été évaluée, in vitro, qualitativement et quantitativement par les zones d'inhibition et la détermination de la CMI. Les diamètres des zones d'inhibition variaient de 0.80 à 1.20 cm pour l'huile de *C. cuminum*, et de 0.70 à 0.80 cm pour l'huile d'*A. leucotrichus*, alors qu'il était de 0 à 1.40 cm pour l'amoxicilline et de 0 à 2.60 pour la ciprofloxacine. En revanche aucune inhibition n'ait été observée contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Notre étude a montré que les deux espèces *Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L. peuvent être une bonne source de monoterpénoïdes, en particulier le  $\gamma$ -terpinen-7-al, le cuminaldéhyde et la perrilla aldéhyde. D'autre part, le présent travail a révélé des caractéristiques antioxydantes significatives, en particulier contre l'oxydation des acides gras insaturés, ainsi qu'un pouvoir antimicrobien intéressant contre la plupart des microorganismes testés.

# Chemical composition and biological activities of essential oils from the fruits of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L. (Apiaceae)

## Abstract

Hydrodistilled volatile oils obtained from the fruits of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L., cultivated in Morocco, were analyzed by GC-FID and GC-MS. Twenty-one compounds representing 98.7% of the oil were identified for the *Cuminum cyminum* L. species. The main components of the oil were:  $\gamma$ -terpinen-7-al (37.2 %), cuminaldehyde (29.1 %),  $\gamma$ -terpinene (10.0 %),  $\beta$ -pinene (7.1 %) and p-cymene (6.1 %). For the *Ammodaucus leucotrichus* L. species there were 21 identified compounds, representing 98.4 % of the total oil. The major constituents were perrilla aldehyde (78.2 %) and limonene (9.5 %). Isolated essential oils were tested for radical-scavenging ability using the stable DPPH radical and the ABTS radical, for reducing power ability with a test based on the reduction of ferric cations, and for lipid peroxidation inhibitory ability using  $\beta$ -carotene bleaching assay. The two oils showed a particularly interesting profile with respect to oxidation of the fatty unsaturated substances. The antimicrobial activity of the essential oils was individually evaluated against representatives of Gram-positive and Gram-negative bacteria using the agar diffusion method. The most sensitive microorganisms are: *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermis*, *Citrobacter freundii* and *Escherichia coli*.

**Keywords:** *Ammodaucus leucotrichus* L., Antibacterial, Antioxidant, *Cuminum cyminum* L., Essential oil, GC-FID, GC-MS.

## 1. Introduction

The oxidation processes and microorganism activity are the main cause of spoilage and food poisoning issues. Despite the use of a wide range of synthetic chemical additives and several modern preservation methods, spoilage and food poisoning problems remain a continuing concern for consumer's health and industries (El Abed et al., 2014; Viuda-Martos et al., 2011). In addition, the use of some synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) have already been documented to show serious side effects that can range from severe to life-threatening (El Abed et al., 2014; Tenore et al., 2011). Therefore, it is beyond question that there is an increasing need to develop a new type of nontoxic natural antioxidant and antimicrobial compounds with significant effectiveness in preventing food-borne growth and increasing shelf-life of foods (El Abed et al., 2014; Rawdkuen et al., 2012). In this context, medicinal and aromatic plants emerge as a promising alternative to synthetic products, that can be utilized in a large number of food and pharmaceutical products, to prevent oxidation and microorganisms development (El Abed et al., 2014; Phillipson, 2007).

Cumin (*Cuminum cyminum* L.) belonging to the Apiaceae family, is one of the oldest herbs cultivated in Asia, Africa and Europe (Bettaieb et al., 2010). It is considered as the most popular spice in the world (Hajlaoui et al., 2010). The fruits of cumin have significant use in traditional therapy for centuries, in different geographical locations (Romeilah et al., 2010). There are various scientific studies that confirm the importance of Cumin essential oil, especially as an antioxidant (Bettaieb et al., 2010), antibacterial (Iacobellis et al., 2005) and antiviral (Romeilah et al., 2010). *Ammodaucus leucotrichus* L., is the only species that belongs to the Ammodaucus genus (Yassir et al., 2015). It's mainly distributed in North Africa (Algeria, Morocco, Tunisia, Libya), and extends to Egypt and tropical African countries (Velasco-Negueruela et al., 2006). Ethnobotanical studies reveal wide use in traditional medicine

(especially of the digestive system and diabetes) (Bellakhdar, 1997). Recent research has demonstrated that *Ammodaucus leucotrichus* L. essential oil possesses several biological properties, such as antitumor (Abu Zarga et al., 2013b), and antibacterial (Louail et al., 2016).

This study aims to determine the chemical composition of essential oils of two species, *Ammodaucus leucotrichus* L. and *Cuminum cyminum* L. growing in Morocco. The antioxidant potential using four different techniques (DPPH, ABTS, FRAP,  $\beta$ -carotene), and the antibacterial power on 10 different bacterial strains were also evaluated.

## **2. Experimental section (voir partie 3)**

## **3. Results and discussion**

### ***3. 1. Chemical composition of essential oil***

The obtained results from the different extractions had an EO yield of  $1.69\pm 0.05$  % for the CC (0.85 g) fruit, and  $2.18\pm 0.25$  % for the AL (1.09 g) fruit. For CC fruit our result was higher than those found by Hajlaoui et al., (2010) (1.22 %), however lower than results of Elghorab et al., (2010) (2.52 %). For the AL fruit, yield obtained by the hydrodistillation technique was inferior to those found in the literature. Velasco-Negueruela et al., (2006) found 2.76 % and Abu Zarga *et al.* found 3 %.

The various chemical constituents identified in the EO of CC and AL are shown in table 10. In total, 21 compounds were identified for CC which represented 98.7 % of the EO's total composition. For AL, 21 compounds were identified (98.4 % of the EO's total composition). The oils were mainly composed of monoterpenoids (CC: 98.3 % and AL: 97.9 %), represented by oxygenated monoterpenes (CC: 71.9 % and AL: 85.5 %) and monoterpene hydrocarbons (CC: 26.4 % and AL: 12.4 %). The analysis of the CC EO has shown that this latter contains five major compounds:  $\gamma$ -terpinen-7-al (37.2 %) cuminaldehyde (29.1%),  $\gamma$ -terpinene (10.0 %),

$\beta$ -pinene (7.1 %) and p-cymene (6.1 %). Also 16 other minor compounds were present and they represent 9.2 % of the EO's total composition. The study of AL EO revealed that it contains mainly 2 major compounds: perrilla aldehyde (78.2 %) and limonene (9.5 %). In addition, 19 minor compounds were also identified for this EO; however, they represent less than 11 % of the EO.

Our results were compared to those of CC and AL fruit growing in other countries. The variations in the compounds percentage could be, according to Diao et al., (2014) due to the geographical cultivation location, the extraction technique and the analysis condition.

Hajlaoui et al., (2010) reported that the CC EO contains: cuminaldehyde (39.48%),  $\gamma$ -terpinene (15.21 %),  $\beta$ -myrcene (11.13 %). According to Iacobellis et al., (2005) CC EO is composed of:  $\gamma$ -terpinen-7-al (27.40 %), cuminaldehyde (16.1 %),  $\gamma$ -terpinene (12.80 %),  $\beta$ -pinene (11.80 %). Velasco-Negueruela et al., (2006) revealed that AL EO contains two major compounds: perilla aldehyde (63.60 %), limonene (26.80 %). (Abu Zarga et al., 2013b) also reported in their studies that AL EO extracted by hydrodistillation is composed of two major compounds: perilla aldehyde (84.43 %), limonene (1.71 %).

**Table 10.** Chemical composition of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L. essential oils.

No	RT (mn)	RI (i)	RI (ii)	Compounds	Contribution (%)	
					CC	AL
1	1.4	924	925	$\alpha$ -Thujene (M.H)	0.5	-
2	2.4	932	932	$\alpha$ -Pinene (M.H)	0.1	0.9
3	2.5	946	945	Camphene	-	0.3
4	2.5	969	971	Sabinene (M.H)	0.1	-
5	3.5	974	974	$\beta$ -Pinene (M.H)	7.1	0.3
6	4.1	988	990	$\beta$ -Myrcene (M.H)	0.3	0.1
7	4.6	1002	1001	$\alpha$ -Phellandrene (M.H)	0.2	0.9
8	4.7	1022	1020	o-Cymene (M.H)	1.6	-

9	4.7	1020	1018	p-Cymene (M.H)	6.1	-
10	5.2	1024	1024	Limonene (M.H)	0.2	9.5
11	5.5	1025	1026	$\beta$ -Phellandrene (M.H)	0.2	0.3
12	5.9	1054	1053	$\gamma$ -Terpinene (M.H)	10.0	-
13	6.0	1085	1088	Isoterpinolene (M.H)	-	0.1
14	7.0	1095	1092	Linalool (O.M)	1.1	-
15	7.0	1134	1130	Limonene oxide (O.M)	-	0.4
16	7.2	1135	1136	Pinocarveol (O.M)	0.6	-
17	7.3	1137	1137	cis-Verbenol (O.M)	-	0.2
18	7.5	1174	1174	Terpinen-4-ol (O.M)	0.7	-
19	7.5	1186	1185	$\alpha$ -Terpineol (O.M)	0.3	0.1
20	8.3	1215	1212	trans-Carveol (O.M)	0.7	-
21	11.1	1238	1240	Cuminaldehyde (O.M)	29.1	0.4
22	11.2	1269	1270	Perilla aldehyde (O.M)	-	78.2
23	11.2	1283	1284	$\alpha$ -Terpinen-7-al (O.M)	2.1	1.7
24	11.3	1289	1290	Cumin alcohol (O.M)	0.1	-
25	11.3	1290	1292	$\gamma$ -Terpinen-7-al (O.M)	37.2	1.2
26	11.4	1294	1294	Perilla alcohol (O.M)	-	0.1
27	11.4	1392	1390	Methyl Perillate (O.M)	-	3.0
28	11.5	1398	1400	3-Hydroxyperillaldehyde (O.M)	-	0.2
29	14.7	1405	1405	$\beta$ -Caryophyllene (S.H)	0.4	-
30	15.7	1652	1655	$\alpha$ -Cadinol (O.S)	-	0.1
31	17.0	1493	1491	$\gamma$ -Decalactone (O)	-	0.2
32	17.4	1730	1732	Chamazulene (O)	-	0.2

<b>M.H</b>					26.4	12.4
<b>O.M</b>					71.9	85.5
<b>S.H</b>					0.4	-
<b>O.S</b>					-	0.1
<b>O</b>					-	0.4
<b>Total identified compounds</b>					98.7	98.4

RT : Retention time.  
 RI(i) : Reported retention index.  
 RI(ii) : Calculated retention index.  
 CC : Cuminum cyminum L.  
 AL : Ammodaucus leucotrichus L.  
 M.H : Monoterpene hydrocarbons.  
 O.M : Oxygenated monoterpenes.  
 S.H : Sesquiterpene hydrocarbons.  
 O.S : Oxygenated sesquiterpenes.  
 O : Others.

### **3. 2. Antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP, $\beta$ -carotene bleaching)**

The antioxidant activity of the CC and AL EO has been evaluated by four testing methods, DPPH, ABTS, reducing ferric power, and  $\beta$ -Carotene bleaching assay (table 11). Assessed samples were able to reduce the stable violet DPPH radical to the yellow DPPH-H, with a values of (CC: 0.68mg TE/g of EO, AL: 0.83mg TE/g of EO). Although DPPH and ABTS methods were based on the same principle; data obtained from DPPH assay are lower than those obtained from ABTS assay, reaching the values (CC: 7.47 mg TE/g of EO, AL: 2.49 mg TE/g of EO). This is probably due to the steric factors that are one of the major factors for reducing of stable DPPH radical. We also tested reducing ability of the two EOs using a spectrophotometric method for determination of content of ferric ion which was reduced by tested oils. Assayed samples were able to reduce the ferric ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ) to corresponding ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reaching the values (CC: 8.56 mg TE/g of EO, AL: 3.12 mg TE/g of EO). Lipid peroxidation inhibition activity of the two EOs was evaluated using the  $\beta$ -carotene bleaching assay. This method is based on the Loss of yellow color of  $\beta$ -carotene due to its reaction with formed radicals by the oxidation of Linoleic acid in an emulsion. The results obtained by this test have demonstrated an antioxidant capacity of CC EO (41.41 mg TE/g of EO) and of AL: (8.16 mg TE/g of EO).

The results obtained by the four tests are in accordance. In fact, CC EO is more potent than AL EO. These results can be explained by the fact that CC EO is richer in hydroxyl compounds (linalool: 1.1 %, pinocarveol: 0.6 %, terpinen-4-ol: 0.7 %,  $\alpha$ -terpineol: 0.3 %, *trans*-carveol: 0.7 %, cumin alcohol: 0.1 %) than AL EO (*cis*-verbenol: 0.2 %,  $\alpha$ -terpineol: 0.1 %, perilla alcohol: 0.1%, 3-hydroxyperillaldehyde: 0.2 %,  $\alpha$ -cadinol: 0.1 %). According to Trifan et al., (2015) the antioxidant activity of EO is mainly due to the presence of hydroxyl compounds. The DPPH, ABTS and FRAP tests have revealed a median antioxidant potential for the EO of the two species. However, the  $\beta$ -carotene bleaching test revealed a remarkable



antioxidant power for the two EOs. This can be explained, according to Kulisic et al., (2004) by the lipophilic affinity of the EO with the reaction mixture.

**Table 11.** Antioxidant activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L. species.

Essential oil	DPPH (mg TE/g of EO)	ABTS (mg TE/g of EO)	FRAP (mg TE/g of EO)	$\beta$ -carotene (mg TE/g of EO)
<i>Cuminum cyminum</i> L.	0.68 $\pm$ 0.01	7.47 $\pm$ 0.76	8.56 $\pm$ 0.38	41.41 $\pm$ 2.31
<i>Ammodaucus leucotrichus</i> L.	0.83 $\pm$ 0.05	2.49 $\pm$ 0.19	3.12 $\pm$ 0.24	8.16 $\pm$ 0.22

Values are given as means of three replicates  $\pm$  SD.  
TE: Trolox equivalent.

### 3. 3. Antibacterial activity

The evaluation of the antibacterial activity of the EO of the two species, CC and AL, was performed against ten bacterial strains; three Gram-positive (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*), and seven Gram-negative (*Salmonella* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*). The strains were chosen for their known ability to contaminate food and for their pathogenicity. The results obtained are summarized in table 12.

The in-vitro antimicrobial activity of the essential oil from CC and AL against the tested microorganisms was qualitatively and quantitatively assessed by the inhibition zones and the determination of MIC. According to the results shown in table 12, the two essential oils exhibited a potent inhibitory effect against all bacteria strains, with the exception of *Pseudomonas aeruginosa*, that showed resistance to both EO. The diameter of inhibition zones ranging from 0.80 to 1.20 cm for CC EO, and from 0.70 to 0.80 cm for AL EO, while it was 0 to 1.40 cm for Amoxicillin and 0 to 2.60 for Ciprofloxacin.

MIC values of the two EOs against the employed strains are shown in table 12. These results demonstrated that these oils displayed potential antibacterial property. The CC EO

demonstrated a remarkable antibacterial potential, in particular, against the two bacteria strains *Enterococcus faecalis* and *Salmonella sp*, which could not develop even at a concentration of 0.33  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . MIC value of bacteria *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermis*, and *Citrobacter freundii* was of the order of 0.50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . The most resistant bacteria was *Proteus mirabilis* which required a concentration of 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  to inhibit its growth, followed by *Escherichia coli* with a minimum inhibitory concentration of 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Using the bactericidal concentration (MBC) as an evaluation parameter of the antibacterial potential, Iacobellis et al., (2005) reported that the microorganisms the most sensitive to the EO of CC are *Escherichia coli* (MBC: 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), *Staphylococcus aureus* (MBC: 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), *Listeria monocytogenes* (MBC: 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). In 2007, Gachkar et al., (2007) reported that the EO of CC from Iran shows remarkable inhibition to the development of the two strains tested; *Escherichia coli* (MBC: 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) and *Listeria monocytogenes* (MBC: 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) were the two strains most sensitive to this EO. The results obtained by Özcan and Erkmen, (2001) showed that at 1 % concentration the EO of CC from Turkey, inhibits *Escherichia coli* development, at 10 % the development of *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* and at 15 % the development of *Salmonella typhimurium* and *Bacillus cereus* were inhibited respectively.

At 0.50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  concentration, the EO of AL could inhibit the growth of all bacteria *Enterococcus faecalis*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, with the exception of *Proteus mirabilis*, which required a minimum inhibitory concentration of 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . According to the studies carried out by Louail et al., (2016) the EO of the AL species from Algeria can inhibit the development of the two strains: *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* from the concentrations of 3.68 mg/mL and 0.37 mg/mL, respectively.

**Table 12.** Antibacterial activity of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L. species.

Bacterial strains	CC		AL		AML	CIP
	DI (cm)	MIC ( $\mu\text{L/mL}$ )	DI (cm)	MIC ( $\mu\text{L/mL}$ )	DI (cm)	DI (cm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.80 $\pm$ 0.10	0.33	0.70 $\pm$ 0.10	0.50	-	2.60 $\pm$ 0.20
<i>Salmonella sp</i>	1.20 $\pm$ 0.20	0.33	0.80 $\pm$ 0.20	0.50	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.90 $\pm$ 0.20	0.50	0.70 $\pm$ 0.10	0.50	1.20 $\pm$ 0.10	2.50 $\pm$ 0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.90 $\pm$ 0.10	0.50	0.80 $\pm$ 0.10	0.50	1.40 $\pm$ 0.10	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.80 $\pm$ 0.10	0.50	0.80 $\pm$ 0.10	0.50	-	0.70 $\pm$ 0.10
<i>Staphylococcus epidermis</i>	0.80 $\pm$ 0.10	0.50	0.80 $\pm$ 0.20	0.50	0.70 $\pm$ 0.10	2 $\pm$ 0.10
<i>Citrobacter freundii</i>	1 $\pm$ 0.20	0.50	0.80 $\pm$ 0.10	0.50	-	-
<i>Escherichia coli</i>	0.80 $\pm$ 0.10	1	0.80 $\pm$ 0.10	0.50	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	0.80 $\pm$ 0.10	2	0.70 $\pm$ 0.10	1	-	2.10 $\pm$ 0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	2.60 $\pm$ 0.20

Values are given as means of three replicates  $\pm$  SD.

DI : Diameter of inhibition.

MIC : Minimum inhibitory concentration.

AML : Amoxicillin.

CIP : Ciprofloxacin.

## 4. Conclusions

Based on the above observations it can be concluded that *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L. species can be a good source of monoterpenoids particularly  $\gamma$ -terpinen-7-al, cuminaldehyde and perrilla aldehyde. On the other hand, the present work has shown significant antioxidant characteristics, particularly against the oxidation of unsaturated fatty acids, as well as antimicrobial potency, which is of interest in most of the microorganisms tested. These properties might be of vital importance for the food industry in order to find possible alternatives to synthetic preservatives.

**Chapitre III : Étude de la composition chimique de la fraction lipidique de l'espèce *Cuminum cyminum* L. comme marqueur de l'origine géographique.**

Pour évaluer l'influence de l'origine géographique sur la qualité de l'huile fixe du cumin (*Cuminum cyminum* L.), nous avons étudié la variabilité chimique de six huiles produites dans différentes régions du Maroc (Bouârfa, Kelaâ El Sraghna, Tazarine, Alnif, Rhamna et Chemaïa).

Les résultats obtenus ont montré que la teneur en huile variait significativement en fonction du lieu de récolte. Elle variait de 16.3 % (Tazarine) à 25.7 % (Kalaat Sraghna). Les fruits de cumin récoltés à Bouarfa et Tazarine, présentaient le rendement en huile le plus bas suggérant une influence possible de l'altitude sur le rendement en huile de cumin.

Dix acides gras ont été identifiés dans nos échantillons d'huile de cumin. Dans tous les échantillons étudiés, l'acide pétrosélinique était le principal acide gras avec une teneur moyenne de 58.9 %. Cependant, dans les fruits de cumin cultivés à Chemaïa, l'acide pétrosélinique s'est avéré présent avec une teneur relativement faible (54.9 %) par rapport les autres régions. La teneur en acide pétrosélinique des fruits de cumin des autres régions n'a montré aucune variation significative. Par conséquent, l'origine géographique semble influencer modérément la teneur en acide pétrosélinique de l'huile de cumin.

Le  $\alpha$ -tocophérol et le  $\alpha$ -tocotriénol sont respectivement les principaux tocophérol et tocotriénol de l'huile du cumin. D'autres tocophérols et tocotriénols ont été détectés sous forme de traces. De grandes variations ont été observées en termes de teneur en tocophérol et tocotriénol. Les fruits de cumin récoltés aux altitudes les plus basses présentaient les plus faibles teneurs en tocophérol (de 20.9 à 32.8 mg/100 g) tandis que les fruits récoltés à des altitudes plus élevées présentaient des teneurs plus élevées.

La détermination de la stabilité oxydative des échantillons d'huile a été réalisé à 110 °C en utilisant la méthode Rancimat. Les huiles préparées à partir des fruits récoltés à Rhamna et Kalaat Sraghna ont montré des propriétés de conservation plus faible, alors que les autres échantillons ont présenté un comportement résistant relativement plus élevé.

Notre étude a montré que de grandes variations peuvent être observées dans un même pays en termes de rendement en huile de cumin ou de composition chimique. L'altitude, ou d'autres facteurs encore non identifiés, peuvent être responsables de cette variabilité.

# Is geographic origin a good marker for cumin seed oil (*Cuminum cyminum* L.)?

## Abstract

To evaluate if a geographic origin label represents useful information to depict cumin (*Cuminum cyminum*) fixed-oil quality, we evaluated the chemical variability of cumin oil produced in different regions of Morocco. Oil composition, assessed by chromatographic analysis, revealed significant differences among regions for some investigated traits. For example, our results showed that oil content varies between 16.3 % and 25.7 %. Similarly, whereas petroselinic acid was consistently shown to be the main fatty acid, its range went from 54.9% to 60.9%. Combining our results and literature data, we suggest that information on seed quality would be more useful for consumers or industrials than geographic origin.

**Keywords:** *seed-oil quality, geographic origin, fatty acid, petroselinic acid.*

## 1. Introduction

To meet an ongoing consumer demand, new natural sources beneficial to human health are consistently searched for. Alongside, in an attempt to meet an ongoing industrial demand, new economic crops supporting a sustainable and viable farming-model are also consistently searched for.

Cumin (*Cuminum cyminum* L.), belonging to the Apiaceae family, is one of the oldest spices (Panda, 2010). It is a very important ingredient in the culinary world and is highly popular all around the world. Cumin seeds are also used in the folk therapy (Bettaieb et al., 2010). Therefore, cumin seeds present a strong nutraceutical potential (Sowbhagya, 2013). Cumin seeds are essential- and fixed-oil rich (Bettaieb et al., 2010). More specifically,

regarding its fixed-oil content, cumin seeds are rich in petroselinic acid (Hemavathy and Prabhakar, 1998) a relatively rare octadecenoic acid whose unsaturation occurs between C6 and C7. Therefore, petroselinic acid, that is already used in the cosmetics and pharmaceutical industries (Cahoon et al., 1992; Hemavathy and Prabhakar, 1998; Murphy, 1992; Sowbhagya, 2013) could be used as the precursor of a large variety of chemical compounds (Delbeke et al., 2016; Ohlrogge, 1994) prepared following the green chemistry principles (Anastas and Warner., 1998). In animal diet domain, the use of cumin seed meal has also been envisioned as an alternative to wheat bran (Mansoori et al., 2006). For all these reasons, cumin oil has been recently listed in a list of 25 oils presenting implications for industrial applications (Moser, 2016). Cultivation of cumin plant on a large scale, and consequently cumin seed production, could undoubtedly open new opportunities in the human-, animal-food and industrial markets, as well.

The country of origin of cumin seeds is frequently mentioned and commercially used as a tacit quality marker. Such terminology leads to the assumption that cumin oil content produced from seeds originating from the single country would be a homogeneous and well-defined compound. Accordingly, geographic origin has been shown to dramatically impact the chemical composition of cumin seed (Bettaieb et al., 2010). Nevertheless, no official regulation rules cumin oil composition preventing the setting of quality parameters and consequently the ascertainment of quality certification.

In this study, using cumin oil from 6 different origins of Morocco, we demonstrate that a country-based denomination is irrelevant and misleading since variations, in terms of yield and chemical content, can be observed within the borders of a single country.

For this purpose, we selected 6 samples of Moroccan cumin, of different geographic origin (Bouarfa, Kalaat Sraghna, Rhamna, Chamaaia, Alnif and Tazarine) in order to describe



the chemical composition of fatty acids and tocopherols of the lipid fraction of cumin seeds. Additionally, the oxidative stability of each oil sample was also determined.

## **2. Experimental section (voir partie 3)**

## **3. Results and discussion**

### ***3.1. Oil content***

Six cumin seed sites distributed in the Morocco's cumin area of production were evaluated in this study (Figure 1). The oil content of the cumin seeds (table 13) significantly varied as a function of the locality of harvest. Oil content ranged from 16.3 % (Tazarine) to 25.7 % (Kalaat Sraghna). A similar high oil yield has already been reported for cumin seeds from Egypt (Bettaieb et al., 2013). Cumin seeds collected in Bouarfa and Tazarine, the two localities of highest elevation in our study, presented the lowest oil yield suggesting a possible influence of elevation on cumin oil yield.

Fully mature cumin seeds have already been shown to present a better oil yield than immature seeds (Bettaieb et al., 2013). Elevation could influence oil yield by generating a shorter warm season in the uplands areas compared to lowlands resulting in the predominant production of seeds not as mature as those harvested in other places. Implication of elevation on oil in low-yield production could appear in contradiction with a previously published study that indicated that Tunisian and Indian cumin seeds presented oil yield of 17.7 and 15.4 %, respectively (Bettaieb et al., 2010), even though both had been grown at the sea level. However, it must be mentioned that 1) the Indian origin of the cumin seeds used in this previous study is not guaranteed, 2) seed maturity is not considered, and 3) cultivation occurred in a greenhouse with controlled, and quite far from natural moroccan biotope, humidity and temperature conditions.

To further evaluate if growing location could impact cumin seed-oil content, we evaluated the FA content our samples and their oxidative stability. We also examined our results to the light of reported cumin seed-oil content.

### 3. 2. *Fatty acids composition*

Ten fatty acids were identified in our evaluated cumin oil samples. Major ones are listed table 13. In all studied samples, petroselinic acid [(6Z-octadec-6-enoic acid)] was the by far major fatty acid identified with an average content of 58.9 %. Such high level likely confirms the maturity of all cumin seeds without necessarily demonstrating an identical degree of maturity for all samples. However, in cumin seeds grown in Chemaïa, petroselinic acid was found to be present with the relatively low content of 54.9 %, a value significantly different from all other analyses. Petroselinic acid content in cumin seeds grown in other locations showed no significant variations. Therefore, geography seems to moderately influence petroselinic acid content in cumin oil.

Linoleic acid was found to be the second major fatty acid (30.1 to 31.3 %). No significant variations were observed as a function of the location. Palmitic and oleic acid content in cumin seed oil was found to be around 3 and 2 %, respectively. Such contents are very similar to those recently reported for Egyptian cumin oil but quite different from those reported for Tunisian or Indian cumin oil (Bettaieb et al., 2010). Linolenic, arachidic, behenic, lignoceric, palmitoleic, stearic, and hypogonic acids were only identified as traces (less than 1 %).

**Table 13.** Oil yield (%) and main fatty acid composition (%) of cumin seeds cultivated in different localities.

	Bouarfa	Tazarine	Alnif	Rhamna	Kalaat Sraghna	Chemaïa
Oil yield (%)	18.6±0.2 <sup>a</sup>	16.3±0.8 <sup>b</sup>	22.0±1.4 <sup>c</sup>	19.8±0.5 <sup>a</sup>	25.7±1.2 <sup>d</sup>	19.0±1.1 <sup>a</sup>
<b>Acids:</b>						
Palmitic	3.0±0.1 <sup>a</sup>	3.3±0.1 <sup>a</sup>	3.4±0.1 <sup>a</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>	3.3±0.1 <sup>a</sup>	3.0±0.1 <sup>a</sup>
Petroselinic	59.5±1.0 <sup>a</sup>	60.5±1.4 <sup>a</sup>	58.2±0.5 <sup>a</sup>	59.5±0.6 <sup>a</sup>	60.9±1.1 <sup>a</sup>	54.9±1.2 <sup>b</sup>
Oleic	2.3±0.1 <sup>a</sup>	1.7±0.2 <sup>b</sup>	1.3±0.1 <sup>b</sup>	2.3±0.2 <sup>a</sup>	1.4±0.3 <sup>b</sup>	1.4±0.4 <sup>b</sup>
Linoleic	30.7±0.1 <sup>a</sup>	30.7±1.1 <sup>a</sup>	30.3±0.3 <sup>a</sup>	30.8±1.2 <sup>a</sup>	31.3±0.7 <sup>a</sup>	30.1±0.5 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> Similarly indexed values within a same line are not significantly different.

At this stage, we decided to compare our results with those reported for other growing locations of cumin. Data regarding the main fatty acids are presented Table 14. Data reported for Indian cumin oil indicate that large intergeographic variations can be observed but within a country. Possibly, these large variations can result from the seed maturation degree. Comparison also indicates that Moroccan cumin oil is very similar to Egyptian cumin oil. Even more noteworthy linolenic acid was reported to be very minor component of cumin oil from Morocco, Egypt, or India whereas it is an important component of cumin oil from Pakistan. Linoleic acid is also the subject of large content variations possibly as a function the seed origin. Such large range of values could confuse industrials and incite them to consider cumin seed oil as a poorly homogeneous product. It is also a real worry for the food industry that is generally eager to promote the nutritional value of its products.

**Table 14.** Reported average oil yield and fatty acid content (%) in cumin seed oil according to geographic origin.

	Pakistan (Shahnaz et al., 2004)	Tunisia <sup>a</sup> (Bettaieb et al., 2013)	India(Bettaieb et al., 2010)	India (Hemavathy and Prabhakar, 1998)	Egypt (Nguyen et al., 2015)	Morocco <sup>b</sup>
Oil yield (%)	20.4	8.2 to 16.9	15.4	14.5	23	16.3 to 25.7
<b>Acids</b>						
Petroselinic	51.3	10.6 to 55.9	41.4	83.4	61.8	54.9 to 60.9
Palmitic	11.7	52.8 to 23.8	30.3	11.7	4.6	2.9 to 3.4
Oleic	14.6	8.1 to 0.3	0.4	0.2	1.4	1.3 to 2.3
Linoleic	0.8	3.9 to 12.4	19.4	4.7	30.4	30.3 to 31.3
Linolenic	18.7	3.8 to 0.2	0.1	-	0.6	0.4 to 0.6

<sup>a</sup> Variations attributed to maturation

<sup>b</sup> This study.

### 3. 3. Tocopherol composition

Tocopherols and tocotrienols are important components of the unsaponifiable fraction in vegetable oils. They are considered as highly active natural antioxidants (Burton and Ingold, 1981; Kamal-Eldin and Lars-Åke, 1996). Therefore, their presence in cosmetic ingredients is well regarded.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol were found to be the main tocopherol and

tocotrienol, respectively, of cumin seed oil. Other tocopherols and tocotrienols were detected as traces. Large variations were observed in terms of tocopherol and tocotrienol content (Table 15). Cumin seeds harvested at the lowest elevation presented the lowest tocopherol content (from 20.9 to 32.8 mg/100g) whereas seeds collected at a higher elevation presented a higher content. Seeds recolted in Alnif presented a level as high as 50.3 mg/100g of oil.  $\alpha$ -Tocotrienol presented also quite large content variation. However, the Alnif-sample, which presented the highest  $\alpha$ -tocopherol content, presented the lowest  $\alpha$ -tocotrienol content. On the opposite, the Rhamna-sample, which presented the lowest  $\alpha$ -tocopherol content, presented the highest  $\alpha$ -tocotrienol content. The sum of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol contents for each sample was therefore not significantly different.

**Table 15.** Tocopherol content of cumin seeds from different region (mg/100g).

	Bouarfa	Tazarine	Alnif	Rhamna	Kalaat Sraghna	Chemaïa
$\alpha$ -Tocopherol	36.1±2.3 <sup>a</sup>	40.6±0.5 <sup>b</sup>	50.3±1.5 <sup>c</sup>	20.9±0.5 <sup>d</sup>	33.3±0.2 <sup>a</sup>	32.8±0.3 <sup>a</sup>
$\alpha$ -Tocotrienol	52.6±1.5 <sup>a</sup>	53.3±0.2 <sup>a</sup>	37.2±0.5 <sup>b</sup>	72.4±2.0 <sup>d</sup>	56.5±1.2 <sup>e</sup>	53.7±2.2 <sup>a</sup>
$\beta$ - Tocopherol	-	0.4±0.1 <sup>a</sup>	-	0.3±0.1 <sup>a</sup>	0.5±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>b</sup>
$\gamma$ - Tocopherol	2.6±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>b</sup>	6.5±0.2 <sup>c</sup>	1.9±0.1 <sup>d</sup>	2.5±0.2 <sup>a</sup>	3.7±0.1 <sup>e</sup>
$\beta$ -Tocotrienol	-	2.4±0.1 <sup>a</sup>	0.9±0.1 <sup>b</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>	2.3±0.1 <sup>a</sup>	3.6±0.1 <sup>c</sup>
Plastochromanol8	2.5±0.1 <sup>a</sup>	1.8±0.1 <sup>b</sup>	2.0±0.1 <sup>b</sup>	1.5±0.2 <sup>b</sup>	2.4±0.2 <sup>b</sup>	2.6±0.1 <sup>b</sup>
$\gamma$ -Tocotrienol	3.6±0.1 <sup>a</sup>	-	2.8±0.1 <sup>b</sup>	-	-	-
$\delta$ - Tocopherol	-	0.5±0.1 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	-	2.4±0.2 <sup>b</sup>	2.4±0.1 <sup>b</sup>
$\delta$ -Tocotrienol	2.5±0.1	-	-	-	-	-

<sup>a-e</sup> Similarly indexed values within a same line are not significantly different.

### 3. 4. Oxidative stability

Preservation of edible oil is an important economic parameter. Because of the observed variations in antioxidant molecule content, we determined the oxidative stability of the oil samples at 110°C using the Rancimat method (Table 16). Oil prepared from seeds collected in Rhamna and Kalaat Sraghna showed limited preservation properties (short induction time). Other samples presented a similar oxidative behavior.

**Table 16.** Oxidative stability of cumin seeds from different region measured by Rancimat test at 110 °C.

Location	Bouarfa	Tazarine	Alnif	Rhamna	Kalaat Sraghna	Chemaïa
<b>Rancimat (hours)</b>	29±1 <sup>a</sup>	30±2 <sup>a</sup>	34±2 <sup>a</sup>	25±1 <sup>b</sup>	27±1 <sup>b</sup>	32±2 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Similarly indexed values are not significantly different.

## 4. Conclusion

Our study evidenced that large variations can be observed within one single country in terms of cumin oil yield or chemical content. Elevation, or other factors yet unidentified, can be responsible for this variability. Therefore, variations initially attributed to the different seed geographic origin could result from different causes, the most obvious being simply the elevation. Whereas the exact nature of all parameters influencing cumin seed oil content needs to be studied, the use of a nomenclature as Indian or Tunisian or Moroccan seeds, that suggests that a geographic indication exists is not at all informative, not to say misleading. Indications regarding the degree of ripening would be more important to describe the quality of the seeds and their fatty acid content and we recommend their addition as cumin seed quality marker.

**Chapitre IV : Fraction lipidique de l'espèce  
*Ammodaucus leucotrichus* L. comme source  
naturelle importante de l'acide  
pétroselinique.**

Le but de cette étude était de déterminer la composition en acides gras, en stérols et en tocophérol de l'huile fixe des fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L., du Maroc.

La teneur en huile a été déterminée par extraction solide-liquide en utilisant de l'éther de pétrole. Les résultats obtenus ont montré que les fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* L., sont constitués d'environ  $10.8 \pm 2.1$  % d'huile fixe.

La composition en acides gras a été déterminée par GC-FID. Les résultats obtenus ont montré que les acides gras insaturés représentaient plus de 80 % d'acides gras totaux, dont seulement 7.6 % étaient des acides gras polyinsaturés, tandis que 73.2 % étaient des acides gras monoinsaturés. L'acide pétrosélinique était le principal AGI (71.2 %), suivi de l'acide linoléique (7.1 %) et de l'acide oléique (1.8 %). Deux AGIs mineurs ont également été identifiés, à savoir l'acide linoléique (0.5 %) et l'acide palmitoléique (0,2 %). Les acides gras saturés représentent environ 18.7 %. L'AGS majeur était l'acide myristique qui représentait 12.1 %, suivi de l'acide palmitique (6.1 %) et de l'acide stéarique 0.5 %.

La détermination de la composition du stérol a été réalisée après transformation des stérols en stérol silylé puis analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. L'étude réalisée sur les différents échantillons a montré que la fraction stérolique d'*A. Leucotrichus* L., est principalement composée de deux stérols de la famille  $\Delta$ -5, à savoir le  $\beta$ -sitostérol (43.6 %) et  $\Delta$ -5-stigmastérol (32.9 %). Cinq stérols minoritaires sont également détectés dans cette fraction dont le cholestérol, le campestérol, le  $\Delta$ -5-avénastérol, le  $\Delta$ -7-stigmastérol et le  $\Delta$ -7-avénastérol.

L'analyse des tocophérols a révélé la présence de deux composés, il s'agissait du  $\alpha$ -tocophérol (10.7 mg/kg) et du  $\gamma$ -tocophérol (357.5 mg/kg), alors que le  $\beta$  et  $\delta$ -tocophérol n'ont pas été détectés.

Pour la première fois, notre étude a décrit la composition en acides gras, stérols et tocophérols de l'huile fixe des fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. Les résultats

obtenus indiquent que l'huile de fruits *Ammodaucus leucotrichus* L. peut être considérée comme une source importante d'acides gras (particulièrement l'acide pétroselinique), de stérols et de tocophérols. De plus, la présente étude a confirmé l'homogénéité de la composition en acides gras des plantes de la famille des Apiacées, avec l'acide pétrosélinique comme acide gras majeur.



# *Ammodaucus leucotrichus* L. oil a new source of the petroselinic acid

## Abstract

The aim of this study was to determine the fatty acids, sterol composition, and tocopherol content of *Ammodaucus leucotrichus* L., grown in Morocco. The results indicated that *Ammodaucus leucotrichus* L., fruits were rich in oil (10.8 % of dry weight). The major unsaturated fatty acids were petroselinic acid (71.2 %) followed by linoleic acid (7.1 %), while the main saturated fatty acid was myristic acid (12.1 %) followed by palmitic acid (6.1 %). The major sterol was  $\beta$ -Sitosterol with 43.6 % followed by  $\Delta$ -5-Stigmasterol with 32.%. The oil tocopherols content was 368.5 mg/kg. The major tocopherol was  $\gamma$  (357.5 mg/kg) and  $\alpha$ -tocopherol (10.7 mg/kg), while  $\beta$  and  $\delta$  were not detected. The present study indicates that *Ammodaucus leucotrichus* L., fruits are rich in fatty oil, fatty acid (petroselinic acid), tocopherols and sterols, which suggests an interesting cosmetic and medicinal applications.

**Keywords:** *Ammodaucus leucotrichus* L., fatty oil, petroselinic acid.

## 1. Introduction

The Apiaceae, formerly called Umbellifereae represent one of the superior families of the vegetable kingdom. This family consist of about 450 genera and 3700 species (Amiri and Joharchi, 2016), which are widely distributed in temperate climates where they are often used as spices, vegetables or drugs due to the presence of useful metabolites. Some of these genus are recognized by their high content of petroselinic acid (C18:1 cis- $\Delta^6$ ) in seed oils, which is an interesting oleo chemical for the food, cosmetic and pharmaceutical industries (Ngo-Duy et al., 2009).

*Ammodaucus leucotrichus* L., belonging to the Apiaceae family is the only species of the Ammodaucus genus (Yassir et al., 2015). The plant is distributed throughout North Africa (Morocco, Algeria, Tunisia, and Libya) and it extends to Egypt and tropical Africa. It is rare in the central Sahara area (Velasco-Negueruela et al., 2006). The plant is used mainly for its fruits. According to ethnobotanical studies, the fruits are widely used in traditional medicine for the treatment of certain disorders, particularly of the digestive system and diabetes (Bellakhdar, 1997; Telli et al., 2016).

To our knowledge, no report on the chemical composition of *Ammodaucus leucotrichus* L., fruits oil has been published so far. Thus, the aim of the present work was to identify the chemical composition of *Ammodaucus leucotrichus* L., fruits oil.

## **2. Experimental section (voir partie 3)**

### **3. Results and discussion**

#### ***3. 1. Extraction yield***

The oil content was determined by solid-liquid extraction using petroleum ether. The results obtained showed that the fruits of *A. leucotrichus* L., consist of approximately  $10.8 \pm 2.1$  % of fatty oil (FO). For comparison, Gharby et al., (2015) found a yield of vegetable oil of 37 % in the fruits of nigella (*Nigella sativa* L.). Shahnaz et al., (2004) reported the presence of about 20.42 % of FO in the fruits of cumin (*Cuminum cyminum* L.). Msaada et al., (2008) showed that the yield of oil in the fruits of coriander (*Coriandrum sativum* L.) was 26.4 %.

### 3. 2. Fatty acids composition

Fatty acid composition determined by GC are shown in table 17. Unsaturated fatty acids (UFAs) accounted for more than 80 % of total fatty acids, in which only 7.6 % was polyunsaturated fatty acids, while 73.2 % was monounsaturated (MUFA). Petroselinic acid was the major UFA (71.2 %), followed by linoleic acid (7.1 %), and oleic acid (1.8 %). Two minor UFAs were also identified, which are linolenic acid (0.5 %), and palmitoleic acid (0.2 %). Saturated fatty acids (SFAs) represent about 18.7 %. The major SFA was myristic acid which accounted for 12.1 %, followed by palmitic acid (6.1 %), and stearic acid 0.5 %.

Many studies reported the identification of petroselinic acid as an oil marker of Apiaceae plants. However, its percentage varies significantly from one plant to another. Dutta and Appelqvist, (1989) reported the presence of petroselinic acid (about 70 %) in carrot (*Daucus carota* L.) fruits. Msaada et al., (2008) found that coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits may have a rate of about 84.8 % of petroselinic acid, at maturity stage. Similarly, Caprioli et al., (2014) reported the presence of petroselinic acid in fruits of alisanders (*Smyrniolum olusatrum* L.) with a percentage of 67.5 %.

**Table 17:** Fatty acid composition (%) of *Ammodaucus leucotrichus* L., fruits oil.

Fatty acids	(%)
Myristic Acid (C14:0)	12.1 ± 1.4
Palmitic Acid (C16:0)	6.1 ± 1.1
Palmitoleic Acid (C16:1 ω7)	0.2 ± 0.1
Stearic Acid (C18:0)	0.5 ± 0.1
Oleic Acid (C18:1 ω9)	1.8 ± 0.1
Petroselinic Acid (C18:1 ω12)	71.2 ± 3.1
Linoleic Acid (C18:2 ω6)	7.1 ± 1.2
Linolenic Acid (C18:3 ω3)	0.5 ± 0.1
PUFA	7.6 ± 1.1
MUFA	73.2 ± 2.3
SFA	18.7 ± 1.3

PUFA: Polyunsaturated fatty acids.

MUFA: Monosaturated fatty acids.

SFA: Saturated fatty acids.

Values are given as means of three replicates ± SD.

Petroselinic acid (18:1 cis- $\Delta^6$ ) has been the subject of several patents and scientific studies. It is used in the form of tablet as active compound for the treatment of inflammation of human superficial tissues and for the modulation of lipid metabolism (Baur et al., 1999). In cosmetics, petroselinic acid is used as a slimming and moisturizing agent (Gueniche et al., 2014; Laugier and Picard, 1996). When combined with Zinc (II) salts or with taurine, petroselinic acid is used for the prevention and control of hair ageing (Mahe et al., 2016; Mahe and Bru, 2014).

### **3. 3. Sterol composition**

The determination of sterol composition was performed after transformation of sterol to silylated one (TMS) and then analysis by gas chromatography (GC) on a capillary column. The results are summarized in Table 18. The study carried out on different samples showed that the sterol fraction of *A. leucotrichus* L., fruit oil is mainly composed of two sterols of  $\Delta$ -5 family, namely  $\beta$ -sitosterol (43.6 %) and  $\Delta$ -5-stigmasterol (32.9 %). Five minority sterols also classified in this fraction including cholesterol, campesterol,  $\Delta$ -5-avenasterol,  $\Delta$ -7-Stigmasterol and  $\Delta$ -7-avenasterol and their proportions varying between 0.9 and 8.4 %.

*In-vivo* studies have shown that the  $\beta$ -sitosterol, as its glucoside  $\beta$ -sisteroline, possess anti-inflammatory, antipyretic, immunomodulatory and antineoplastic properties. Other studies, especially on human's body have shown promising effects on the normalization of the functioning of T cells and decreasing overactive antibody responses.  $\beta$ -sitosterol, alone or in combination with other phytosterols, decreases also blood cholesterol levels (Piironen et al., 2000).

**Table 18:** Sterol composition (%) of *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits oil.

<b>Sterols</b>	<b>(%)</b>
Cholesterol	0.9 ± 0.1
Campesterol	6.7 ± 0.8
Δ-5-Stigmasterol	32.9 ± 1.2
Unknown	2.6 ± 0.1
β-Sitosterol	43.6 ± 2.8
Δ-5-Avenasterol	2.0 ± 0.1
Δ-7-Stigmasterol	8.4 ± 0.1
Δ-7-Avenasterol	2.1 ± 0.1

Values are given as means of three replicates ± SD.

### 3. 4. *Tocopherol composition*

Tocopherol level in seed oils is extremely important, it plays a protective role against oxidative deterioration of polyunsaturated fatty acids in plant material. Due to their antioxidant properties, tocopherols can have interesting medical and cosmetic activities, especially as a source of anti-radical agents (Burton and Ingold, 1981). The contents of the individual tocopherols in oils are given in Table 19.

The total tocopherol content in *Ammodaucus leucotrichus* L., FO was 368.5 mg/kg which is higher than that of olive oil (220 mg/kg) but lower than argan oil (850 mg/kg), soybean (650 mg/kg) and sunflower (490 mg/kg) (Gharby et al., 2013). Two tocopherol homologues, α-tocopherol (10.7 mg/kg) and γ-tocopherol (357.5 mg/kg), were identified, whereas no β and δ-tocopherol were detected. Cactus seed oil, argan oil and sesame oil are the richest source of γ-tocopherol (Crews et al., 2006; Gharby et al., 2013). γ-tocopherol shows a higher antioxidant capacity as compared to α-tocopherol (Saloua et al., 2009). The main biochemical function of γ-tocopherol is its protection of polyunsaturated fatty acids against peroxidation (Kamal-Eldin and Lars-Åke, 1996).

**Table 19.** Tocopherol composition (mg/kg) of *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits oil.

<b>Tocopherols</b>	<b>mg/kg</b>
α-tocopherol	10.7 ± 1.3
γ-tocopherol	357.5 ± 4.1
Total tocopherol	368.5 ± 2.84

Values are given as means of three replicates ± SD.

#### **4. Conclusion**

Our study can be considered as the first report on the fatty acids, sterols and tocopherols composition of *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits oil. Obtained results indicated that *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits oil can be considered as an effective source of fatty acids, sterols, and tocopherols. In addition, the present study confirmed the homogeneity of fatty acid composition of Apiaceae family plants, with petroselinic acid as major fatty acid. This can give those species a cosmetic and medicinal applications.

## **Chapitre V : Profil lipidique et stabilité oxydative de l'huile du grenadier 'Sefri'**

Le but de cette étude était de déterminer la composition chimique (acides gras, tocophérols et stérols) et d'évaluer la stabilité oxydative de l'huile fixe du grenade marocaine (*Punica granatum* L.).

La composition en acides gras de l'huile de grenade a été déterminée par GC-FID. Les résultats obtenus ont montré que les acides gras saturés ne représentent que 4.74 %, avec l'acide palmitique (C16: 0) comme AGS majoritaire (2.64 %) suivi d'acide stéarique (C18: 0) 1.73 % et d'acide arachidique (C20: 0) 0.37 %. La teneur moyenne en AGI était d'environ 95.13 %, dont seulement 4.06 % sont des acides gras monoinsaturés et 91.07 % sont des acides gras polyinsaturés. Le principal AGPI était l'acide punique (9c, 11t, 13c-18: 3) qui représentait 75.1 %, suivi par l'acide catalpique (C18: 3 (t9, t11, c13)) (6.7 %) et l'acide linoléique (C18: 2) (4.11 %). Quatre acides linoléiques conjugués (CLnA) ont été identifiés, comme différents isomères géométriques de l'acide linoléique, à savoir : l'acide punique (C18: 3 (c9, t11, c13)), l'acide catalpique (C18: 3 (t9, t11, c13)) (6.7 %), l'acide  $\alpha$ -éléostéarique (C18: 3 (c9, t11, t13)) (3.73 %) et l'acide  $\beta$ -éléostéarique (C18: 3 (t9, t11, t13)) (1.43 %).

La teneur en stérols de l'huile de grenade est de 494.61 mg/100g, avec le  $\beta$ -sitostérol comme composé majoritaire (404.59 mg/100g).

La teneur totale en tocophérol était de 332.44 mg/100g. Le  $\gamma$ -tocophérol (190.47 mg/100g d'huile) était comme le constituant principal, suivi de l' $\alpha$ -tocophérol (74.62 mg/100g d'huile) et du  $\delta$ -tocophérol (53.3 mg/100g d'huile).

Le temps d'induction calculé par la méthode accélérée Rancimat s'est avéré être de 3,6 heures à 120 °C.

L'étude de l'huile de grenade (*Punica granatum* L.) du Maroc a montré une forte teneur en huile, avec les acides linoléiques conjugués (acide punique, acide catalpique) comme acide gras prédominant. De plus, une teneur considérable en tocophérols et en stérols a été révélée. Cette étude montre également que l'huile de grenade marocain est particulièrement



sensible à l'oxydation, ce qui pourrait s'expliquer par la forte teneur en CLnA. Des précautions particulières, telles que la réfrigération, doivent être envisagées pour le stockage prolongé de cette huile.

# Lipid profile and oxidative stability of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil

## Abstract

The aim of this study was to determine the chemical composition (fatty acids, tocopherols, and sterols) and evaluate the oxidative stability of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. The oil content of pomegranate seed was around 22.63 %. The fatty acid composition showed a dominance of conjugated linolenic acids (CLnAs) (86.69 %). The most dominant fatty acid was punicic acid (75.1 %), followed by catalpic acid (6.7 %) and linoleic acid with amounts of 4.11 %. The seed oil only contained a low level of saturated fatty acids with palmitic (2.64 %) and stearic acids (1.73 %) as main saturated fatty acids. The sterol marker,  $\beta$ -sitosterol, accounted for 404.59 mg/100g of the total sterol content in the seed oil. Total tocopherol content in seed oil was 332.44 mg/100g.  $\gamma$ -tocopherol (190.47mg/100g oil) is the major constituent, followed by  $\alpha$ -tocopherol (74.62mg/100g oil) and  $\delta$ -tocopherol (53.3mg/100g oil). The induction time calculated by the Rancimat accelerated method was found to be of 3.6 hours at 120°C.

**Keywords:** Fatty acid, oxidation, *Punica granatum* L., seed oil, sterol, tocopherol.

## 1. Introduction

Pomegranate (*Punica granatum* L., Punicaceae) is an ancient, beloved plant and delicious fruit consumed world-wide (Jing et al., 2012). They are widely grown in the Mediterranean regions and India, but sparsely cultivated in the USA, China, Japan and Russia (Fadavi et al., 2006). The edible parts of pomegranate fruits are consumed fresh and they are also used for the preparation of fresh juice (Fadavi et al., 2006). The fruits contain considerable

amounts of seeds (40–100g/kg fruit weight) (Syed et al., 2007), that are usually waste products from the fruit processing. Pomegranate seeds a rich source of lipids, which approximately 12 to 20 % of total seeds weight, varies according to cultivars (Kýralan et al., 2009). Many studies have indicated the pharmaceutical importance of pomegranate seed oil (PSO). For instance, they have been reported to promote epidermal tissue regeneration, boost the immune system in vivo, reduce the accumulation of hepatic triglycerides and display chemopreventive activity against hormone-related (prostate and breast) and colon cancers (Carvalho and Mancini, 2014).

Pomegranate seed oil (PSO) contains predominantly unsaturated fatty acids including oleic, linoleic and in particular, high levels of conjugated linolenic acids (CLnAs), also known as trienoic acids (Carvalho and Mancini, 2014; Lansky and Newman, 2006; Vroegrijk et al., 2011). The specific trienoic fatty acid found in pomegranate seed oil is referred to as punicic acid, which is a polyunsaturated fatty acid (18:3 n-5), also called trichosanic acid, cis 9, trans 11, cis 13. Punicic acid is referred as a "super CLnA" whose effect is even more potent than that of an ordinary CLnA (Aruna et al., 2016; Carvalho and Mancini, 2014). It possesses a wide array of biological properties including antidiabetic (Arao et al., 2004; Keisuke et al., 2004), anti-inflammatory (Boussetta et al., 2009), hypolipidemic (Koba et al., 2007), and anticarcinogenic activity against various forms of cancer (Tsuzuki et al., 2004).

Morocco is one of the biggest producers, the cultivation of pomegranate covers an area of about 4000 ha which gives an estimated production of 46000 T, an average yield of 12 T/ha (Haddioui, 2012). Many studies indicate a quantitative and qualitative difference in the chemical composition of pomegranate species oil, growing in different regions. To our knowledge, no study has been done to analyse Moroccan pomegranate seed oil. The aim of this study is to determine the lipid profile and evaluate the oxidative stability of the pomegranate seed oil growing in Morocco.

## 2. Experimental section (voir partie 3)

### 3. Results and discussion

#### 3. 1. Oil content

The oil content of pomegranate seed oil from Morocco was  $22.63 \pm 0.54$  %, which is comparable with that from Turkey (13.95-24.13 %) and Tunisia (5.89-21.58 %), as reported by Elfalleh et al., (2010) and K yralan et al., (2009) respectively. Jing et al., (2012) found less oil in the pomegranate seeds from China (11.4-14.9 %). The Pomegranate seeds investigated by Hernandez et al., (2011) (from Spain) and Fadavi et al., (2006) (from Iran) also contained lower amounts (4.44-13.7 % and 6.63-19.3 %, respectively) of oil. According to Taoufik et al., (2015), This variation can be due to the extraction method, cultivars, climatic factors and environmental conditions.

**Table 20.** Oil yield (%) of Moroccan pomegranate seed oil.

Pomegranate	Morocco (our study)	Turkey (K�yralan et al., 2009)	Tunisia (Elfalleh et al., 2010)	China (Jing et al., 2012)	Spain (Fernandes et al., 2015)	Iran (Fadavi et al., 2006)
Oil content	$22.63 \pm 0.54$	13.95–24.13	5.89-21.58	11.4-14.9	4.44-13.7	6.63-19.3

Values are given as means of three replicates  $\pm$  SD.

#### 3. 2. Fatty acid composition

The fatty acid profiles of cold pressed pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil determined by GC are shown in Table 21. The saturated fatty acid (SFA) represent only 4.74 %, Palmitic acid (C16:0) was the predominant SFA with 2.64 % followed by Stearic acid (C18:0) 1.73 % and Arachidic acid (C20:0) 0.37 %. The mean content of UFA is almost 95.13 %, in which only 4.06 % are monounsaturated fatty acids (MUFA) and 91.07 % are PUFA. Major PUFA was Punicic acid (9c,11t,13c-18:3) which accounted for 75.1 %, followed by Catalpic acid (C18:3 (t9, t11, c13)) (6.7 %) and Linoleic acid (C18:2) with amounts of 4.11 %. Four Conjugated Linolenic Acids (CLnA) were identified, as different geometric isomers of

conjugated Linolenic acid, namely, Punicic acid (C18:3 (c9, t11, c13)) is the major isomer (75.1 %), followed by Catalpic acid (C18:3 (t9, t11, c13)) (6.7 %),  $\alpha$ -Eleostearic acid (C18:3 (c9, t11, t13)) (3.73 %), and  $\beta$ -Eleostearic acid (C18:3 (t9, t11, t13)) (1.43 %). PSO Fatty acid composition was found to be in the range of previously published values for pomegranate seed oil from other countries reported in the literature (Elfalleh et al., 2010; Fadavi et al., 2006; Hernandez et al., 2011; Jing et al., 2012; Sassano et al., 2009).

Punicic acid was first isolated from pomegranate seed oil by Toyama and Tsuchiya, (1935). This fact was later confirmed by a reinvestigation of the oil by Farmer and Van den Heuvel, (1936) and also by other workers (Ahlers et al., 1954). According to Sassano et al., (2009) in nature, CLnAs are not found to any great extent in animal fat, but they are found in many seed oils as either C18 trienes or C18 tetraenes. The most commonly CLnAs known isomers found in seed oils from important plants are  $\alpha$ -eleostearic acid (*Vernicia fordii*), punicic acid (*Punica granatum* L.), calendic acid (*Calendula officinalis* L.), jacaric acid (*Jacaranda mimosifolia*), catalpic acid (*Catalpa ovata*),  $\beta$ -calendic (*Calendula officinalis* L.) and  $\alpha$ -parinaric acid (*Parinarium laurinum*) (Carvalho and Mancini, 2014; Sassano et al., 2009). In general, CLnAs are synthesized from linoleic acid through a specific conjugase enzyme, but they may also be produced during the processing of vegetable oils, as a result of isomerization and dehydration of secondary oxidation products of linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids (Hennessy et al., 2011; Koba et al., 2007).

**Table 21.** Fatty acid composition (%) of Moroccan pomegranate seeds oil.

Compound	Our results (%)	(Jing et al., 2012)	(Fadavi et al., 2006)	(Sassano et al., 2009)	(Hernandez et al., 2011)	(Elfalleh et al., 2010)
Miristic acid (C14:0)	-	-	0.1-4.7	-	-	Tr-0.85
Palmitic acid (C16:0)	2.64 ± 0.24	2.82-3.61	2.8-16.7	2.87-3.06	2.99-4.3	3.13-11.82
Stearic acid (C18:0)	1.73 ± 0.17	1.6-2.81	0.3-9.9	2.21-2.37	1.6-2.38	2.28-15.64
Oleic acid (C18:1)	3.64 ± 0.29	3.37-6.01	4.8-17.4	6.82-7.17	5.23-6.85	3.03-12.88
Linoleic acid (C18:2)	4.11 ± 0.57	3,74-5.13	0.7-24,4	6.46-6.84	4.98-8.54	3.57-13.92
Linolenic acid (C18:3)	-	7.43-11.71	-	-	-	-
Arachidic acid (C20:0)	0.37 ± 0.09	0.25-0.35	-	0.43-0.49	-	Tr-1.7
Gadoleic acid (C20:1)	-	-	-	-	-	0.6-9.94
Ecosoneic acid (C20:1)	0.42 ± 0.11	-	-	0.64-0.66	-	-
Behenic acid (C22:0)	-	-	0-3.9	-	-	-
Punicic acid (C18:3)	75.1 ± 1.62	73.45-78.80	55.8-86.6	64.9-71.76	80.41-91.03	12.45-55.45
$\alpha$ -Eleostearic acid (C18:3)	3.73 ± 0.47	-	-	4.6-6.15	-	8.63-22.53
Catalpic acid (C18:3)	6.7 ± 0.35	-	-	2.64-4.59	-	6.17-17.09
$\beta$ -Eleostearic acid (C18:3)	1.43 ± 0.11	-	-	0.49-2.39	-	0-17.82
Lignoceric acid (C24:0)	-	-	-	0.04-0,51	-	0-8.1
Nervonic acid (C24:1)	-	-	-	0.15-0.24	-	-
<b>SFA</b>	<b>4.74</b>					
<b>MUFA</b>	<b>4.06</b>					
<b>PUFA</b>	<b>91.07</b>					
<b>UFA</b>	<b>95.13</b>					
<b>CLnA</b>	<b>86.96</b>					
<b>Total</b>	<b>99.87</b>					

Values are given as means of three replicates ± SD.

### 3. 3. Sterol composition

Phytosterols are very useful parameters for detecting adulterations or to check authenticity, since it can be considered as a fingerprint (Gharby et al., 2018, 2017). Besides, their determination is of major interest due to their antioxidant activity and impact on health.

Table 22 lists the sterol levels obtained from Moroccan pomegranate seed oil.

The phytosterols contents of pomegranate seed oil are 494.61 mg/100g, which was found to be in the range of previously published values for pomegranate seed oil from other countries reported in the literature (408.9–620.5 mg/100g). In pomegranate seed oil,  $\beta$ -Sitosterol is also the most abundant sterol which constituted about 404.59 mg/100g. This sterol is also abundantly found in sesame, cactus and olive oil (Gharby et al., 2017, 2012). Among the different phytosterols,  $\beta$ -Sitosterol has been most intensively investigated with respect to its beneficial and physiological effects on human health. Besides,  $\beta$ -Sitosterol lowers Cholesterol levels, enhances immunity, and has anti-inflammatory, antipyretic and anti-carcinogenic effects (prostate essentially) (Gupta et al., 1980; Villaseñor et al., 2002). The next major component was Campesterol where it reaches about 38.18 mg/100g of the total sterols.  $\Delta$ 5-Avenasterol and Stigmasterol accounted for about 17.86 and 15.53 mg/100g respectively in this oil. Minor sterols were also detected ( $\Delta$ 7-Stigmasterol and cholesterol). The phytosterol content of pomegranate seed oil from Morocco was similar to that from Georgia and Italy, as reported by Pande and Akoh, (2009) and Fernandes et al., (2015), respectively.

**Table 22.** Phytosterol composition (mg/100g) of Moroccan pomegranate seeds oil.

<b>Compound</b>	<b>Our results mg/100g</b>	(Fernandes et al., 2015)	(Pande and Akoh, 2009)
<b>Cholesterol</b>	0.39 $\pm$ 0.01	-	-
<b>Brassicasterol</b>	-	-	0-2.2
<b>Campesterol</b>	38.18 $\pm$ 1.91	25.1-36.3	17.9-39.3
<b>Stigmasterol</b>	15.53 $\pm$ 1.28	11.8-17.0	27.8-46.3
<b><math>\beta</math>-Sitosterol</b>	404.59 $\pm$ 4.72	220.1-354.2	243.5-338.3
<b><math>\Delta</math>-5-Avenasterol</b>	17.86 $\pm$ 0.29	-	-
<b><math>\Delta</math>-7-Stigmasterol</b>	2.67 $\pm$ 0.17	-	-
<b>Sitostanol</b>	-	14.8-25.9	-
<b><math>\Delta</math>-7-Avenasterol</b>	0.76 $\pm$ 0.08	-	-
<b>Others</b>	-	89.8-122.3	-

Values are given as means of three replicates  $\pm$  SD.

### ***3. 4. Tocopherol composition***

In addition to the fatty acid composition and phytosterol profile, the composition of vitamin E active compounds is an important characteristic feature used to describe the identity of vegetable oils. Additionally, these compounds have some nutritional importance because they are known to have an antioxidative activity, which protects the polyunsaturated fatty acids against oxidative deterioration; additionally, a biological activity exists, which protects cells against oxidative stress (Bieri and Evarts, 1974; Blumberg, 1994; Tucker and Townsend, 2005).

The total tocopherol contents of pomegranate seed oil are 332.44 mg/100g, which is higher than that of argan (85 mg/100g), olive (22 mg/100g), sesame (44.6 mg/100g) and cactus (94.6mg/100g) oils (Gharby et al., 2017). Only  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Tocopherols, P8 and  $\gamma$ -Tocotrienol were present in pomegranate seed oil (Table 23).  $\gamma$ -Tocopherol was the main component and represented about 190.47 mg/100g of total tocopherols, followed by  $\alpha$ -Tocopherol (74.62 mg/100g),  $\delta$ -Tocopherol (53.3 mg/100g), P8 (10.56 mg/100g) and  $\gamma$ -Tocotrienol (3.49 mg/100g).

Our tocopherol profile was similar to the tocopherol composition reported by Fernandes et al., (2015) they indicate that the major tocopherol in pomegranate seed oil is  $\gamma$ -Tocopherol (123.0-449.7 mg/100g). However, this result contrasts with that reported by Pande and Akoh, (2009) showing the  $\alpha$ -Tocopherol is the major tocopherol in pomegranate seeds oil (161.2-173.7 mg/100g). In addition, Jing et al., (2012) found that the main Tocopherol in pomegranate seed oil is the  $\delta$ -Tocopherol (141.42-351.32 mg/100g).



**Table 23.** Tocopherol composition (mg/100g) of Moroccan pomegranate seed oil.

Compounds	Our results (mg/100g oil)	(Fernandes et al., 2015)	(Pande and Akoh, 2009)	(Jing et al., 2012)
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	74.62 $\pm$ 1.77	7.3-17.9	161.2-173.7	71.87-138.83
<b><math>\gamma</math>-Tocopherol</b>	190.47 $\pm$ 3.52	123.0-449.7	80.2-92.8	3.42-5.49
<b>P8</b>	10.56 $\pm$ 0.29	-	-	-
<b><math>\gamma</math>-Tocotrienol</b>	3.49 $\pm$ 0.16	-	-	-
<b><math>\delta</math>-Tocopherol</b>	53.3 $\pm$ 1.22	4.9-15.2	20.3-23.8	141.42-351.32

Values are given as means of three replicates  $\pm$  SD.

### 3. 5. *Oxidative stability*

The preservation of edible or cosmetic oil is an important economic parameter (Matthäus et al., 2010). In fact, oxidation of lipid is a major cause of deterioration in the quality of oils. It is the cause of important deteriorative changes in their chemical, sensory and nutritional properties (Frankel, 1980; Gray, 1978). The oxidative stability of pomegranate seed oil is expressed as the induction period determined by the Rancimat method at 120 °C. The induction time of pomegranate seed oil, as evaluated by the Rancimat accelerated method, was found to be 3.6  $\pm$  0.93 hours at 120 °C. At the same temperature, the Rancimat induction time is 6.1 and 5.5 hours for argan and olive, respectively (Mateos et al., 2006; Matthäus and Brühl, 2015). Therefore, the oxidation sensitivity of pomegranate seed oil, that is much higher than that of argan and olive oils, likely could be attributed to high content of CLnAs; molecules that do oxidize easily.

**Table 24.** Oxidative stability (hour) of pomegranate seeds oil measured by Rancimat test at 120 °C.

<b>Oil</b>	<b>Pomegranate</b>	<b>Argan</b> (Mathäus and Brühl, 2015)	<b>Olive</b> (Mateos et al., 2006)
<b>Induction time (hour)</b>	3.6 ± 0.93	6.1	5.5

Values are given as means of three replicates ± SD.

## 4. Conclusion

The study of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil growing in Morocco revealed high oil content, with conjugated linolenic acids (Punicic acid, Catalpic acid) as the predominant fatty acid, beside considerable amounts of tocopherols and phytosterols. This study shows also that Moroccan pomegranate seed oil is particularly sensitive to oxidation, which could be explained by the high content of CLnAs. Thus, special care such as refrigeration should be considered for oil prolonged storage. If enough precautions are taken, pomegranate seed oil deserves to find its place in the cosmetics and food industry, as a potent functional and/or nutraceutical ingredient.

## **Partie 3 : Partie expérimentale**

# Chapitre I : Matériel végétal et méthodes d'extraction

## 1. Origine du matériel végétal

### 1. 1. Échantillonnage et période de récolte

Les fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L., utilisée dans les parties « Fraction lipidique de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. comme source naturelle de l'acide pétroselinique.» et « Séparation, isolation et élucidation structurale des nouveaux dérivés de l'amide d'acide caféique à partir de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. », ont été récoltés dans son habitat naturel dans la région de **M'Hamid El Ghizlane**, durant le mois d'Avril 2017 et 2018, respectivement.

Le matériel végétal utilisé dans la partie « Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle des deux espèces *Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L. », a été récoltés dans deux régions :

- **Tazzarine** (30°46'2"N, 5°32'45"W), en Mai 2017, pour le *Cuminum cyminum* L.
- **M'hamid El Ghizlane** (29°43'58"N, 5°57'25"W), Avril 2017, pour l'*Ammodaucus leucotrichus* L.

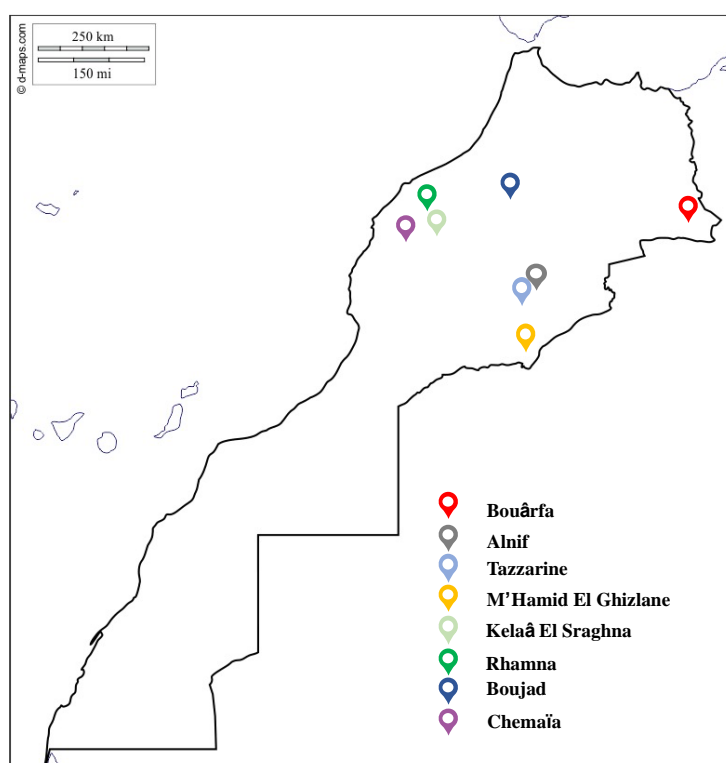
Afin, d'envisager l'impacte de l'origine géographique, sur le profile lipidique des fruits du cumin, nous avons choisi six régions marocaines de récolte, connues par la culture du cumin (voir la cartographie) :

- **Bouârfa** (32°31'51"N, 1°57'47"W).
- **Kelaâ El Sraghna** (32°2'53"N, 7°24'30"W).
- **Tazzarine** (30°46'2"N, 5°32'45"W).
- **Alnif** (31°07'N, 5°10'W).
- **Rhamna** (32°14'21"N, 7°57'29"W).

- **Chemaïa** (32°04'14"N, 8°39'12" W)

Tous les fruits du cumin utilisés lors de la réalisation de cette partie ont été récoltés durant le mois Juin 2015.

Les échantillons de graines et l'huile de presse, de la variété marocaine 'Sefri' de grenade (*Punica granatum* L.), utilisées lors de la réalisation de la partie « Profil lipidique et stabilité oxydative de l'huile de grenade marocaine (*Punica granatum* L.) 'Sefri' », ont été collectés et préparés en 2017 auprès de la coopérative Flora (ville de Boujad, Maroc, 32 ° 46'10 "N 6 ° 23'49" W).



**Figure 36.** Origine géographique du matériel végétal utilisé.

## ***1. 2. Identification botanique***

Les deux espèces (*Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L.), ont été taxinomiquement identifiées par le botaniste Professeur Dr. M. Fennane (Département de Zoologie et Ecologie Végétale de l'Institut Scientifique de Rabat, Maroc, Université Mohammed V).

### ***1. 3. Stockage des plantes***

Avant le stockage, les plantes entières ont été parfaitement séchées à l'aire libre et à l'abri de la lumière, puis triées en séparant les fruits des autres parties de la plante. Ensuite, chaque partie de la plante a été conservée dans un sac à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité jusqu'à utilisation.

## **2. Protocole d'extraction**

### ***2. 1. Préparation des extraits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. par percolation***

Les fruits secs d'*Ammodaucus leucotrichus* L. (622 g) sont broyés à l'aide d'un moulin RLBMill (Rotor AG, Suisse) et mélangés avec 620 g de sable de mer. Le mélange est ensuite percolé, successivement, avec de l'éther de pétrole (5,5 L), suivi par de l'acétate d'éthyle (6 L) et du méthanol (6 L). Les solvants sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le schéma suivant explique le processus d'extraction que nous avons réalisée. Le résiduel de solvant a été évaporé par un courant d'azote.



**Figure 37.** Montage d'extraction par percolation.

## ***2. 2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation***

L'hydrodistillation représente la méthode usuelle pour l'extraction des huiles essentielles. Elle repose sur le fait que la plupart des matières odorantes peuvent être entraînées par la vapeur d'eau. Son intérêt majeur réside dans l'utilisation du système de cohobation permettant une distillation en continu sans modifier la quantité en eau du ballon.

Les huiles essentielles utilisées dans notre étude ont été extraites à l'aide d'un extracteur Clevenger, selon la méthode décrite par Abu Zarga et al., (2013) et Iacobellis et al., (2005). En Bref, Cinquante grammes de matière végétale (fruits entiers) sont introduits dans un ballon de 2 litres avec 1 litre d'eau. La mise en marche du chauffage se fait à douce ébullition. Le réfrigérant est mis en fonction en réglant le débit d'eau. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation. Ensuite, les huiles essentielles sont récupérées à l'aide d'une pipette pasteur, puis séchées sur du sulfate de sodium anhydre et stockés dans des flacons ambrés à 4 °C jusqu'à utilisation. Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessous.



**Figure 38.** Montage d'hydrodistillation (Clevenger).

### 2. 3. *Extraction de la fraction lipidique*

La teneur en fraction lipidique a été déterminée selon la méthode officielle ISO 659:2009. Vingt grams des fruits entiers de l'espèce *Cuminum cyminum* L., préalablement broyés dans un moulin (IKA, modèle A11 BS000), sont extraits à l'aide de 150 mL de n-hexane dans un appareil Soxhlet et pendant 8 heures. Le solvant est ensuite éliminé par un évaporateur rotatif à 40 °C et 25 Torr (modèle RV 10 C S93, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Stauffen, Allemagne). Le résiduel de solvant a été évaporé par un courant d'azote.

Concernant, les fruits de l'*Ammodaucus leucotrichus* L. et les graines du *Punica granatum* L., le matériel végétal est extrait à l'aide de 150 mL de pétrole d'éther dans un appareil Twisselmann et pendant 6 heures. Le solvant a été éliminé par un évaporateur rotatif à 40 °C et 25 torr. L'huile a été séchée par un courant d'azote et stockée à -20 °C jusqu'à son utilisation.



*Extraction par Soxhlet*



*Extraction par Twisselman*

**Figure 39.** Montage d'extraction par Soxhlet et Twisselman.



# **Chapitre II : Isolation et élucidation structurale de nouveaux dérivés phénoliques à partir des fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L.**

## **1. Solvants et réactifs**

Pour l'extraction et la chromatographie sur colonne, des solvants de qualité technique (Scharlau, Espagne) ont été utilisés après distillation, et des solvants de qualité HPLC (Macron, Norvège) ont été utilisés pour les séparations HPLC. De l'eau de qualité HPLC a été obtenue à partir d'un système de purification d'eau Milli-Q (Merck Millipore). Le DMSO de Scharlau (Espagne) a été pour la préparation des solutions injectées en HPLC. La phase mobile utilisée pour la HPLC analytique contenait 0,1% d'acide formique. Les solvants deutérés utilisés ont été d'Armar Chemicals (Suisse). Le gel de silice (40 à 63  $\mu\text{m}$ , Merck) a été utilisé pour la chromatographie sur colonne ouverte. La colonne Sephadex LH-20 utilisée a été de GE Healthcare.

## **2. Spectroscopie Résonance magnétique nucléaire/RMN**

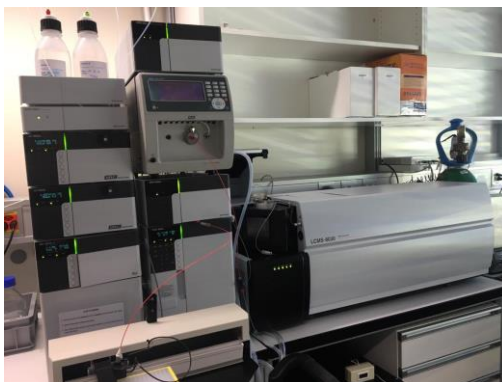
Les données RMN ont été enregistrées sur un spectromètre RMN BrukerAvance III fonctionnant à 500,13 MHz pour  $^1\text{H}$  et 125,77 MHz pour les noyaux  $^{13}\text{C}$ . Les données RMN  $^1\text{H}$ , les spectres COSY, HSQC, HMBC et NOESY ont été mesurés à 18 °C dans une sonde TXI de 1 mm avec un gradient z. Les spectres RMN/DEPTQ  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés à 23 °C dans des tubes de 3 mm avec une sonde BBI de 5 mm. Les spectres ont été analysés par BrukerTopSpin 3.0 et ACD Labs Spectrus Processor.



**Figure 40.** Spectroscopie Résonance magnétique nucléaire.

### **3. Analyse chromatographie en phase liquide à haute performance**

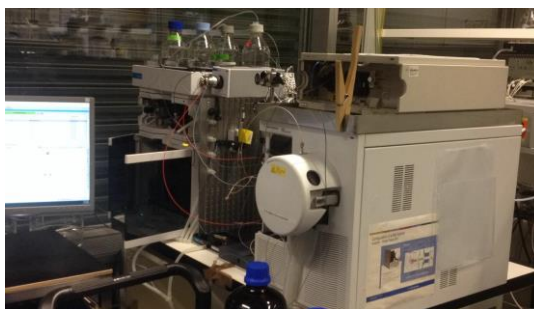
Les données HPLC-PDA-ELSD-ESIMS ont été enregistrées sur un système HPLC Shimadzu comprenant un dégazeur, une pompe de mélange haute pression binaire, un injecteur automatique, un four à colonne et un détecteur à barrette de diodes, connectés via un séparateur en T (1:10) à un Détecteur Alltech 3300 ELSD et un MS Shimadzu LC-MS/MS 8030 triple quadripôle. Les modes ESI positifs et négatifs ont été enregistrés en utilisant la commutation +/- . L'acquisition et le traitement des données ont été effectués avec le logiciel LabSolution.



**Figure 41.** Chromatographe analytique en phase liquide à haute performance.

#### **4. Analyse chromatographie en phase liquide à haute performance préparative et semi-préparative**

Des séparations HPLC semi-préparatoires ont été effectuées avec un système Agilent HP 1100 Series comprenant une pompe quaternaire, un injecteur automatique, un four à colonne et un détecteur à barrette de diodes (G1315B). Le logiciel Chemstation a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données.



**Figure 42.** Chromatographe en phase liquide à haute performance préparative et semi-préparative.

#### **5. Spectrométrie de masse à ionisation par électrospray haute résolution**

Les données HRESIMS ont été mesurées sur un spectromètre de masse LQT XL Orbitrap (Thermo Scientific) par injection directe. Les rotations optiques ont été mesurées à une concentration de 1 mg/ml dans du méthanol en utilisant un polarimètre PerkinElmer 341 avec une microcellule de 10 cm.



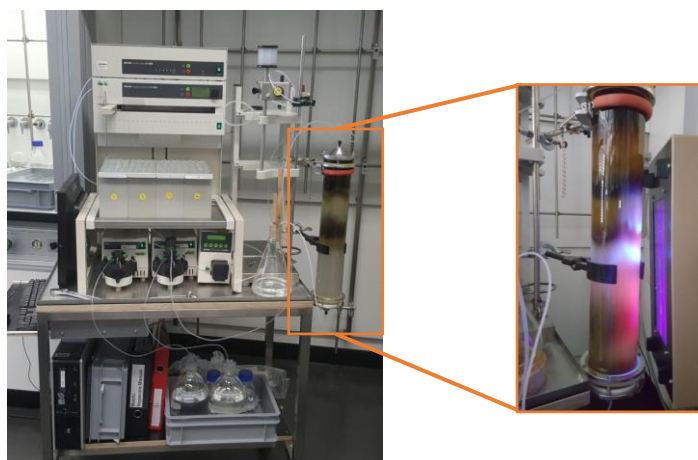
**Figure 43.** Spectromètre de masse à ionisation par électrospray haute résolution.

## 6. Colonnes

La colonne Waters SunFire C18 (3,5  $\mu\text{m}$ , 3,0  $\times$  150 mm ID, équipé d'une colonne de garde 10  $\times$  3,0 mm ID), SunFire Prep C18 (5  $\mu\text{m}$ , 10  $\times$  150 mm ID, équipé d'une colonne de garde 10  $\times$  10 mm ID), et la colonne SunFire Prep C18 OBD (5  $\mu\text{m}$ , 30  $\times$  150 mm id, équipées d'une colonne de garde 10  $\times$  20 mm id) ont été utilisées pour les séparations analytiques, semi-préparatives et préparatives, respectivement.

## 7. Fractionnement sur colonne de l'extrait d'acétate d'éthyle

L'extrait EtOAc (63,9 g) a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice (80  $\times$  5 cm, 40–63  $\mu\text{m}$ ), en utilisant comme phase mobile le système : Chloroforme-MeOH (100:0 pendant 60min; 100: 0  $\rightarrow$  90: 10% pour 1min; 90: 10  $\rightarrow$  80: 20% pendant 119min; 80: 20  $\rightarrow$  0: 100 pendant 30min; et enfin 0: 100 pendant 10min).



**Figure 44.** Séparation sur colonne à moyenne pression.

Les fractions A-P ont été combinées sur la base des modèles CCM (gel de silice, chloroforme-MeOH, 100:0, 90:10 et 80:20 ; avec une révélation à l'aide de 1% de vanilline éthanolique et 10% d'acide sulfurique, suivie d'un chauffage).

## 8. Séparation et purification des dérivés phénoliques

Les composés **7** (5,1 mg), **1** (17,4 mg), **2** (1,4 mg), **4** (3,3 mg), **5** (1,5 mg) ont été isolés à partir de la fraction J (310 mg), en utilisant une HPLC semi-préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B); 35 → 45% B (pendant 20min), 45 → 55% B (pendant 15min), 55 → 100% B (pendant 1 min) et 100% B (pendant 5min), débit 4mL / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100 µL].

La fraction K (230 mg) a été séparée sur une colonne Sephadex LH-20 (7 x 100 cm de diamètre interne) éluée avec MeOH à un débit de 1,5 ml / min. Un total de 6 fractions (K1-6) ont été combinées sur la base d'une analyse CCM. La fraction K6 a donné le composé **7** (4,2 mg). La fraction K5 (26,13 mg) a été soumise à une HPLC semi-préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeOH (B); 55% B (pendant 25 min), 55 → 100% B (pendant 1 min) et 100% B (pendant 5 min), débit 4 ml / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100 µL]. Des injections répétées ont donné deux composés **6** (11,64 mg) et **3** (0,62 mg).



**Figure 45.** Séparation sur colonne Sephadex LH-20.

La fraction I (250 mg) a été soumise à une HPLC semi-préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B); 10 → 30% B (pendant 10min), 30% B (pendant 15min), 30 → 100% B (pendant 1min) et

100% B (pendant 5min), débit 4 mL / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100  $\mu$ L], donnant le composé **14** (1.1 mg), d'apigénine (**8** : 0.5 mg), de chrysoeriol (**9** : 1.1 mg).

La fraction M (180 mg) a été soumise à une HPLC semi-préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B); 10  $\rightarrow$  60% B (pendant 30min), 30  $\rightarrow$  100% B (pendant 1min) et 100% B (pendant 5min), débit 4 mL / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100 $\mu$ L]. Des injections répétées ont donné les composés **3** (1,6 mg) et **6** (2,2 mg).

La fraction N (480 mg) a été soumise à une HPLC semi-préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B); 5  $\rightarrow$  30% B (pendant 15min), 30  $\rightarrow$  40% B (pendant 1min), 40  $\rightarrow$  52% B (pendant 14min), 52  $\rightarrow$  100% B (pendant 1min) et 100% B (pendant 5min), débit 4 ml / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100 $\mu$ L], donnant les fractions N1-8. La fraction N2 a donné le composé **12** (1,2 mg). La fraction N3 a été purifiée par HPLC semi-préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B); 17% B (pendant 30min), 17  $\rightarrow$  100% B (pendant 1min) et 100% B (pendant 5min), débit 4 mL / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100  $\mu$ L], pour donner **13** (0,9 mg). La fraction N4 a donné de la lutéoline (**7** :3,1 mg). La fraction N7 a donné le composé **3** (2,4 mg). La fraction N8 a donné le composé **6** (3,9 mg).

Cinq fractions O1-5 ont été obtenues à partir d'une partie de la fraction O (500 mg). La séparation a été réalisée par RP-HPLC préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B) ; 30  $\rightarrow$  44% B (pendant 1min), 44  $\rightarrow$  100% B (pendant 1min) et 100% B (5min), débit 25 mL / min; concentration de l'échantillon 100 mg / ml dans du DMSO; volume d'injection 1000 $\mu$ L]. La fraction O2 a été soumise à une HPLC semi-préparative [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B); 18% B (pendant 35min), 18  $\rightarrow$  100% B (pendant 1min) et 100% B (pendant 5min), débit 4 mL / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100  $\mu$ L], donnant deux composés **10** (0,7 mg) et **11** (1,2 mg). La fraction O4 a donné deux composés **3** (1,3 mg)

et **6** (2,7 mg), la séparation a été réalisée par HPLC semi-préparatoire [H<sub>2</sub>O (A), MeCN (B); 30 → 37% B (pendant 35min), 37 → 100% B (pendant 1min) et 100% B (pendant 5 min), débit 4 mL / min; concentration de l'échantillon 50 mg / ml dans le DMSO; volume d'injection 100µL].

## 9. Analyse des sucres

L'hydrolyse des sucres et l'analyse GC-MS des dérivés a été réalisée selon la méthode Abbet et al., (2011). Les composés **10** (0,5 mg), **11** (0,6 mg), **12** (0,5 mg) et **13** (0,5 mg) ont été hydrolysés séparément. Après chauffage à 100 °C pendant 1 h dans une solution de TFA 2 M (1 mL), le mélange a été extrait avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 1,0 mL). La phase aqueuse a été lyophilisée et redissoute dans de la pyridine sèche (200 mL) contenant 5 mg/ml de chlorhydrate d'ester méthylique de L-cystéine. Le mélange réactionnel a été chauffé à 60 °C pendant 1 h, suivi d'une silylation avec de l'hexaméthyl-di-silazane et du chlorotriméthylsilane (Fluka) dans de la pyridine (3: 1: 10, 300 µl) à 60 °C pendant 30 min (Chai et al., 2007). Après silylation, la pyridine a été évaporée et le résidu solide extrait avec du n-hexane. L'analyse GC-MS a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse 5890 série II couplé à un détecteur de masse HP 5971A (Hewlett Packard, USA). La séparation a été réalisée sur une colonne DB-225 MS (30 m x 0,25 mm, D.I., Waters, USA); température de la colonne. 150 °C pendant 2 min, puis gradient de 58 °C/min à 210 °C, puis 10 °C/min à 240 °C. La comparaison des temps de rétention des sucres de référence dérivés (D-glucose et L-glucose) avec ceux obtenus à partir d'échantillons a donné du D-glucose pour tous les composés (Rt 20,52 min).

## 10. Molecular modeling

Three dimensional structures of studied compounds were built in Maestro modeling environment (version 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015) and subjected to conformational analysis in the gas phase using program MacroModel (version 11.3,

Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015). For each compound, 20 000 conformations were generated and minimized using Truncated Newton Conjugate Gradient method (500 iterations) to a convergence threshold of  $0.05 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-1}$ . Mixed torsional/low-frequency-mode conformational search algorithm with extended sampling options in combination with the OPLS\_2005 force field was used. In case of conformational search of hydrated species, a single water molecule was placed randomly in the vicinity of the studied molecule and marked as the fragment for rotations and translations. For each compound, twenty conformers with lowest energy were saved and used as input for *ab initio* calculations in Gaussian09 (Revision D.01). All structures were fully minimized using the wB97XD hybrid functional in combination with cc-pVDZ basis set. The stability of the minimized conformers was verified by frequency analysis - no imaginary frequencies were found. In order to obtain the most accurate energies, the counterpoise correction for the basis set superposition error was applied to the global minimum structure of the hydrated species (with two fragments). The final stabilization energy was calculated by subtracting the energy of a dry molecule and one isolated water from the energy of the hydrated complex, i.e. negative values indicate favorable effect of hydration (Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A., Bloino, J., Janesko, B.G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H.P., , 2016).



# **Chapitre III : Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle des deux espèces *Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L.**

## **1. Composition chimique des huiles essentielles**

La composition chimique des huiles essentielles des deux espèces *Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L. a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CG-FID) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS).

### **1. 1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme**

L'analyse GC-FID a été réalisée sur une chromatographie en phase gazeuse, de type Hewlett Packard (HP 6890) équipé d'un seul injecteur et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne capillaire utilisée était une HP-5MS (30 m x 0,25 mm, épaisseur de film 0,25  $\mu$ m). Le détecteur FID réglé à 280 °C et utilisant un mélange H<sub>2</sub>/Air. Le débit du gaz porteur (azote) était de 1 ml/min. La température initiale de la colonne était de 60 °C et programmée pour augmenter de 4 °C/min à 280 °C. La température de l'injecteur a été réglée à 280 °C. L'injection en mode diviseur a été réalisée avec un rapport de 1:10. Le volume d'injection des huiles essentielles était de 0,5  $\mu$ L (5 mg/mL). L'appareil était contrôlé par un système informatique « ChemStation ». Les indices de rétention (RI) des composés ont été déterminés par rapport aux temps de rétention d'une série de n-alcanes (C5-C24) avec interpolation linéaire en utilisant l'équation de Dool and Kratz, (1963).

## **1. 2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse**

La GC-MS a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse (Perkin Elmer TM GC-680) couplé à un spectromètre de masse (Q-8 MS avec piège à ions). La fragmentation a été réalisée par impact électronique sous un champ de 70 eV. La colonne capillaire utilisée était un Rxi®-5sil MS (1,4-bis (diméthylsiloxyle) phénylène diméthylpolysiloxane (30 m x 0,25 mm). L'épaisseur du film était de 0,25 µm. La température de la colonne a été programmée de 60 à 280 °C avec un débit de 4 °C/min. Le gaz porteur était de l'hélium dont le débit était réglé à 1 mL/min. L'injection de l'échantillon a été effectuée en mode split. La gamme de masse était de  $m/z$  50 à 550. Les températures de l'ion source et du détecteur ont été maintenues respectivement à 250 et 150 °C. L'appareil a été connecté à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST.

L'identification des constituants a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque GC/MS NIST98 et ceux des bibliothèques spectrales Wiley, ainsi que par comparaison de leurs indices de rétention avec les données de la littérature (Adams, 2007).

## **2. Activité antioxydante des huiles essentielles**

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* de nos huiles essentielles a été réalisée par quatre techniques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du cation-radical ABTS, FRAP et le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène.

## **2. 1. Activité de piégeage des radicaux DPPH**

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH·) (Re et al., 1999). En présence de composés anti-radicalaires, ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radicalaire) en acceptant un atome d'hydrogène.

L'effet de chaque huile essentielle sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Scherer and Godoy 2009), avec quelques modifications. En bref, une solution de DPPH (0,2 mM dans de l'éthanol) a été préparée et 0,5 ml de cette solution a été ajouté à 2,5 ml d'une solution d'huile essentielle (1 mg/ml dans l'éthanol) et laissés à température ambiante pendant 30 minutes, puis l'absorbance a été lue à 517 nm contre un blanc. La même chose a été faite pour le Trolox de différentes concentrations (0,5-1-2,5-5-7,5 ug/ml). Le pourcentage d'inhibition (% RSA) de DPPH par les différentes concentrations a été calculé, en utilisant l'équation ci-dessous. Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles a été représenté en équivalent de Trolox (mg TE / g d'huile essentielle).

$$\% RSA = 100 \times \frac{A_c - A_s}{A_c}$$

%RSA : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH

A<sub>c</sub> : Absorbance à 517 nm du contrôle négatif.

A<sub>E</sub> : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

## **2. 2. Test de réduction du cation-radical ABTS**

L'ABTS est un radical cation libre stable de couleur bleu-vert, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). En

présence de composés anti-radicalaires, l'ABTS<sup>•+</sup> est réduit en ABTS cationique et devient incolore. Les absorbances mesurées à 734 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> (Oyaizu, 1986).

L'activité de piégeage du cation radical ABTS a été déterminée par la méthode décrite par Oyaizu et al. Brièvement, 10 ml d'ABTS (2 mM) est ajouté à un volume de 100 µL de persulfate de potassium (70 mM). La solution obtenue est maintenue à l'obscurité pendant 16 heures à une température ambiante. Puis, l'ABTS<sup>•+</sup> produit est dilué par le méthanol pour obtenir une absorbance de 0,70 à 734 nm.

Ensuite, à l'aide d'une micropipette on introduit un volume de 200 µl d'une solution d'huile essentielle (2 mg / ml dans le méthanol) dans un tube à essai, puis 2 ml de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> diluée a été additionné. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 734 nm. La même chose a été faite pour le Trolox de différentes concentrations (5-15-25-50-75-100 µg/ml). Le pourcentage d'inhibition (% RSA) d'ABTS<sup>•+</sup> par les différentes concentrations a été calculé, en utilisant l'équation suivante. le pouvoir antioxydant des huiles essentielles a été représenté en équivalent de Trolox (mg TE/g d'huile essentielle ).

$$\% RSA = 100 \times \frac{A_c - A_s}{A_c}$$

%RSA : Pourcentage d'inhibition du cation-radical ABTS

A<sub>c</sub> : Absorbance à 734 nm du contrôle négatif.

A<sub>E</sub> : Absorbance à 734 nm de l'échantillon.

### ***2. 3. Test de réduction des ions ferriques***

Le mécanisme du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP est basé sur le transfert d'électrons plutôt que sur le transfert d'atomes d'hydrogène. En effet, il est basé sur la capacité du pH à réduire les ions  $Fe^{3+}$  en ions  $Fe^{2+}$ .

Le pouvoir antioxydant par le test FRAP a été déterminée selon la méthode décrite par Benzie and Strain, (1996). En bref, 1 mL d'une solution d'huile essentielle (1 mg/mL d'OE dans l'éthanol contenant 1% de tween 20) a été mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1%). Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 minutes. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique (10%) ont été ajoutés au mélange réactionnel. Ensuite, le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2.5 mL du surnageant est mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de chlorure ferrique. La même chose a été faite pour le Trolox de différentes concentrations (20-60-100-160-200-320  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). L'absorbance a été mesurée à 700 nm après 30 min incubation. Le pouvoir réducteur des huiles essentielles a été représenté par l'équivalent de Trolox (mg TE/g d'huile essentielle).

### ***2. 4. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène***

Le  $\beta$ -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits (Bougatef et al., 2009). Cependant, dans le test du blanchiment du  $\beta$ -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le  $\beta$ -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du  $\beta$ -carotène (Unten et al., 1997). La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du  $\beta$ -carotène

en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système.

Le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de nos huiles essentielles a été décrit par Jamdar et al., (2010). En bref, 1 ml d'une solution de  $\beta$ -carotène (2 mg / ml dans le chloroforme), 40  $\mu$ L d'acide linoléique et 400  $\mu$ L de Tween 20 ont été transférés dans un ballon. Le chloroforme a été ensuite évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après avoir ajouté 100 ml d'eau distillée, le mélange a été agité pour avoir une émulsion stable. À 2,5 ml de l'émulsion, 500  $\mu$ L d'huile essentielle (1 mg / mL dans du méthanol) ont été ajoutés et 500  $\mu$ L d'eau distillée pour le test de contrôle. L'absorbance a été mesurée immédiatement à 470 nm. Les tubes ont été placés dans un bain Marie à 50 °C. L'absorbance a été mesurée après 120 min. La même chose a été faite pour le Trolox de différentes concentrations (4-10-20-40-80-100  $\mu$ g/ml). Le coefficient d'activité antioxydante a été calculé en utilisant l'équation suivante, décrite par Mallet et al., (1994) et l'activité antioxydante des huiles essentielles a été représentée par l'équivalent de Trolox (mg TE/g d'huile essentielle).

$$AAC = 1000 \times \frac{A_{s(120)} - A_{c(120)}}{A_{c(0)} - A_{c(120)}}$$

CAA : Coefficient d'activité antioxydante.

$A_E(120)$  : Absorbance de l'échantillon à  $t = 120$  min.

$A_c(120)$  : Absorbance du contrôle à  $t = 120$  min.

$A_c(0)$  : Absorbance du contrôle à  $t = 0$  min.

### 3. Activité antibactérienne des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielle a été réalisée en utilisant le test décrit par Ghanmi et al., (2011), avec quelques modifications. Les dix micro-organismes utilisés dans la réalisation de ce travail (*Enterococcus faecalis*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été collectés cliniquement. Ces derniers ont été maintenus sur un milieu d'agar nutritif favorable à leur croissance et incubés pendant 24 heures à 37 °C. En raison de l'immiscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une émulsification a été réalisée à travers une solution d'agar à 0,2 % (Remmal et al., 1993). Cela permet d'obtenir une répartition homogène des huiles essentielles dans le milieu et de maximiser le contact entre le microorganisme et les composés actifs. L'amoxicilline (25 µg) et la ciprofloxacine (5 µg) ont été utilisées comme contrôle positif dans le test. Pour déterminer la concentration inhibitrice minimale (CMI), des dilutions ont été préparées à 100 µL/mL, 40 µL/mL, 20 µL/mL, 10 µL/mL, 5 µL/mL, 3,3 µL/mL, 2 µL/mL dans cette solution d'agar. Aux tubes à essai contenant chacun 13,5 ml de MH solide (gélose Mueller Hinton), 1,5 mL de chaque dilution ont été ajoutés de manière à obtenir les concentrations finales de 10 µL/mL, 4 µL/mL, 2 µL/mL, 1 µL/mL, 0,5 µL/mL, 0,33 µL/mL, 0,2 µL/mL respectivement. Les tubes ont été agités afin de disperser adéquatement les huiles essentielles dans le milieu de culture avant de les verser dans les boîtes de Pétri. Des contrôles, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2% seuls, ont également été préparés. L'ensemencement a été réalisé par striation en utilisant une boucle de platine calibrée pour collecter le même volume d'inoculum et incubé à 37 °C pendant 24 heures.

# **Chapitre IV : Etude de la fraction lipidique des espèces *Cuminum cyminum* L., *Ammodaucus leucotrichus* L. et *Punica granatum* L.**

## **1. Analyse de la composition en acide gras**

Les glycérides dissous dans l'isooctane sont transformés en acides gras esters méthyliques par transestérification avec l'hydroxyde de potassium méthanoïque. A la fin de la réaction, l'hydroxyde de potassium est neutralisé par l'hydrogénosulfate de sodium afin d'éviter la saponification des esters méthyliques.

La composition en acides gras a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, selon la méthode décrite par la norme ISO 5508:1990.

Dans un tube à essai on pèse 60 mg d'huile, on ajoute 2 ml d'hexane puis 3ml d'une solution de KOH méthanoïque 2N, on agite pour homogénéiser le mélange puis on remplit le tube par l'eau distillée et on laisse décanter pendant quelques minutes.

La phase organique contenant les esters méthyliques est transvasée dans un tube à essai puis une solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  est ajoutée. Ce dernier neutralise tous les acides libres en donnant des sels de sodium avec un dégagement de gaz carbonique. On prélève les esters méthyliques, qui sont dans la phase organique, à l'aide d'une pipette. Les esters méthyliques d'acides gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse CPG.

Le chromatographe VARIAN CP-3800 séries GC système est équipé d'un injecteur diviseur 1177 (T: 200°C) et d'un détecteur Détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne utilisée était une colonne CP-Wax 52CB (30 m x 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur de film 1-2  $\mu\text{m}$ ; Varian Inc., Middelburg, Pays-Bas). Le gaz vecteur était de l'hélium et le débit



de gaz était de 1 ml/min. La température initiale et finale de la colonne était respectivement de 170 ° C et 230 ° C, et la température a été augmentée par paliers de 4 ° C/min. La température de l'injecteur et du détecteur était de 230 °C. Les données ont été traitées à l'aide d'une station de travail Varian Star v 6.30 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). Les résultats ont été exprimés en pourcentage relatif de chaque acide gras présent dans l'échantillon.

## **2. Analyse de la composition en stérols**

Les stérols jouent un rôle biologique très important. Ils sont aussi très utilisés pour vérifier l'authenticité des huiles végétales. Pour les analyser, on pèse 250 mg d'huile dans un ballon de 25 mL et on ajoute 1,0 mL de solution d'étalon interne (Bétuline dans l'acétone 1,0 mg/ml). On lui ajoute 5 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium (1N de l'éthanol). On chauffe à ébullition le ballon sous reflux pendant 15 min jusqu' à ce que la solution devienne limpide. L'insaponifiable est isolé par extraction en phase solide sur une colonne d'oxyde d'aluminium sur laquelle les anions d'acide gras sont retenus et la matière insaponifiable a été élué avec 5 mL d'éthanol, puis avec 30 mL d'éther.

La fraction stérolique est séparée des matières insaponifiables par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant comme phase mobile un mélange de n-heptane et d'éther diéthylique distillé (50:50 v/v). La fraction stérolique est grattée puis mise dans un bécher contenant 10ml de chloroforme. Après filtration et évaporation du solvant, la fraction des stérols a été convertie en dérivés silylés (TMS) en utilisant un agent de silylation (50 µl de méthylimidazole dissout dans le MSHFBA). La composition de la fraction stérolique est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Les composés sont séparés sur une colonne SE 54 CB (Macherey-Nagel, Duren, Allemagne; 50 m de long, 0,32 mm de diamètre, 0,25 µm d'épaisseur de film). Les autres paramètres sont les suivants: hélium en tant que gaz vecteur, température d'injection et de détection ajustée à 320 °C, programme de four, 245– 260 °C à 5

°C/ min. Les pics ont été identifiés soit par des composés standards ( $\beta$ -sitostérol, campestérol, stigmastérol) soit par un mélange de stérols isolés de l'huile de colza (brassicastérol), soit par un mélange de stérols isolés de l'huile de tournesol (D7-avénastérol, D7-stigmastérol et D7-campestérol). Tous les autres stérols ont été identifiés par GC-MS pour la première fois et ensuite par comparaison avec le temps de rétention.

### **3. Analyse de la composition en tocophérols**

Les composés actifs en vitamine E (les tocophérols, les tocotriénols et le plastochromanol-8) ont été déterminés selon la méthode allemande (DGF) F-II 4a, 2013). En résumé, 150 mg d'huile sont dissouts dans 1 ml de n-heptane. Après filtration, 20  $\mu$ L de l'échantillon sont injectés directement par un échantillonneur automatique Marathon Basic (Spark Ajemmen, Pays-Bas) dans une colonne HPLC en phase Diol de 25 cm x 4,6 mm ID (Merck, Darmstadt, Allemagne) utilisé avec un débit de 1,3 mL/min. Le système HPLC est mis en œuvre avec un système à gradient de pression (basse pression Merck-Hitachi), équipé d'une pompe L-6000 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Allemagne), d'un spectrophotomètre à fluorescence Merck- Hitachi F-1000 (Darmstadt, Allemagne, longueur d'onde d'excitation 295 nm - longueur d'onde d'émission 330 nm) et un système d'intégration ChemStation (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Allemagne). La phase mobile utilisée était le n-heptane et l'éther méthylique de tert-butyle.

### **4. Évaluation de la stabilité oxydative par Rancimat**

Le Rancimat est une méthode qui nous donne le temps d'induction de la dégradation de l'huile. Il consiste à vieillir prématurément les huiles et graisses par décomposition thermique. Les produits de dégradation apparaissant sont expulsés par un courant d'air et

transférés dans la cellule de mesure remplie d'eau distillée. Le temps d'induction est déterminé par conductimétrie. L'évaluation est effectuée de façon entièrement automatique.

La stabilité à l'oxydation des huiles est déterminée par la méthode Rancimat (Gharby, 2012). Toutes les expériences ont été réalisées avec un Rancimat 743 (Metrohm AG, Herisau, Suisse). En bref, 3g d'huile sont pesés et mises dans le récipient de la réaction. Ce récipient est placé dans le bloc chauffant maintenu à 110 °C. Le débit d'air est réglé à 20 L/h pour toutes les déterminations. Les composés volatils libérés au cours du processus de dégradation sont recueillis dans une fiole réceptrice remplie de 60 mL d'eau distillée. La lecture est donnée par le système informatique et correspond au temps d'induction en heures.

# **Conclusion générale**

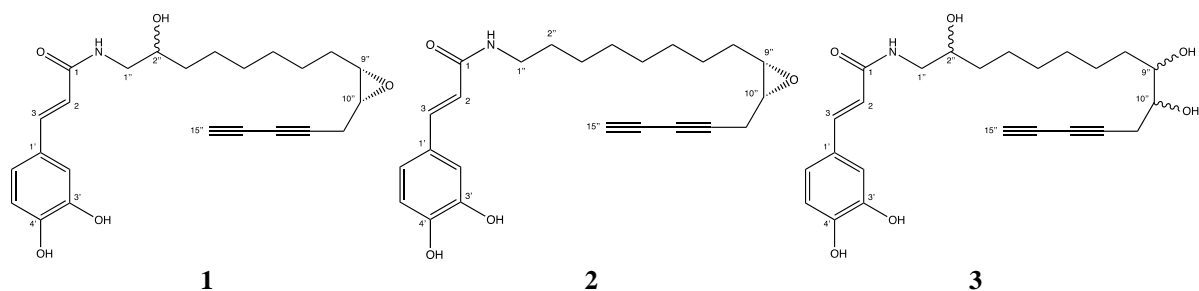
## Conclusion générale

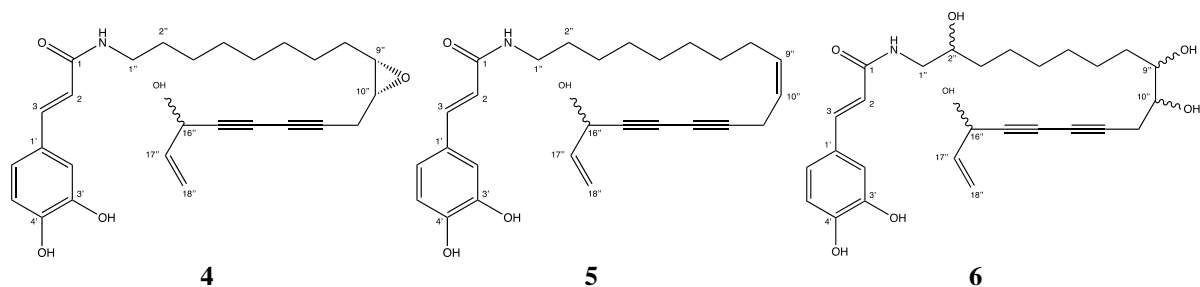
Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales marocaines, nous avons entrepris l'étude phytochimique de trois plantes des zones arides et semi-arides du Maroc. Il s'agit d'*Ammodaucus leucotrichus* L. (Apiaceae), *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae) et *Punica granatum* L. (Punicaceae). Cette approche cible plus précisément les métabolites primaires et secondaires et permettrait de les promouvoir comme actif cosmétique ou composé industriel. Ces plantes ont été récoltées à M'hamid El Ghizlane pour *A. leucotrichus* et Boujad pour *P. granatum*. Pour *C. cyminum*, il a été récolté dans plusieurs régions (Bouârfa, Kelaâ El Sraghna, Tazzarine, Alnif, Rhamna et Chemaïa) afin d'évaluer la variation de sa composition chimique en fonction des régions.

L'espèce *A. leucotrichus* ou Cumin Essoufi, est très connue en médecine traditionnelle marocaine en revanche peu de travaux scientifiques figurent dans les bases de données. Aussi, sommes-nous intéressés à l'étude de son huile essentielle, de sa fraction lipidique et de son extrait polaire. Un fractionnement grossier de l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits de *A. leucotrichus*, par chromatographie sur colonne de gel de silice suivie par une séparation dichotomique sur gel de séphadex LH-20, a permis l'obtention de seize fractions. L'utilisation de l'HPLC préparative et semi-préparative était nécessaire avant de les soumettre aux analyses spectroscopiques modernes. L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution moyennant le mode d'ionisation Electrospray (HRESIMS) a permis de connaître avec exactitude les masses des nouveaux composés. L'élucidation structurale s'est accomplie via les différentes techniques de RMN mono et bidimensionnelle ainsi que par quelques analyses chimiques. Cet ensemble de techniques a permis de caractériser six nouveaux dérivés d'amide d'acide caféïque **1-6** ; cinq flavones connues **7-11** et quatre lignanes **12-14** déjà décrits dans la littérature. Les composés **1-6** sont de nouvelles molécules, jamais décrites dans la littérature.

Ce sont des dérivés d'acide caféique attachés à une chaîne acétylénique latérale par une liaison amide. D'où la présence de plusieurs carbones asymétriques qui rendaient la caractérisation encore plus complexe et très consommatrice de temps pour les chercheurs. La RMN 2D et particulièrement le NOESY et le dichroïsme circulaire ont été mis à profit pour déterminer la configuration absolue des carbones asymétriques des molécules connues dans la littérature (**11-13**). Les fragments monosaccharides dans les composés **10-13** ont été identifiés par GC-MS après hydrolyse acide et leur configuration L ou D ont été obtenue par dérivatisation avec l'ester méthylique de L-cystéine et comparaison avec des données de la littérature et les monosaccharides de référence. Néanmoins, il restait une énigme à résoudre en spectrométrie de Masse. En effet, les spectres de masse obtenus par HRESIMS des deux molécules **3** et **6** indiquait la présence d'une molécule d'eau en plus des carbones et protons identifiés par RMN. Le recours à un calcul des énergies de ces molécules, en présence et en absence d'une molécule d'eau, était nécessaire pour démontrer leur stabilité. Ainsi, les énergies calculées ont confirmé que les deux molécules **3** et **6** sont plus stables quand elles incorporent une molécule d'eau en phase gazeuse. La stabilité de cette conformation résulte des interactions intramoléculaires de liaison hydrogène. De plus, la forme hydratée de ces deux molécules a montré une meilleure géométrie des liaisons hydrogène et moins de déformation intramoléculaire (liaison et angles de torsion).

Les six nouvelles substances naturelles sont représentées ci-dessous.





Les composés **7** à **14** sont identifiés par RMN mono et bidimensionnelle. Leurs données sont comparées à celles décrites dans la littérature. Ils sont décrits pour la première fois dans l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L.

Dans la suite de notre travail nous nous sommes intéressés aux huiles essentielles des espèces *A. leucotrichus* et *C. cyminum* du fait de leur similitude de nom en arabe (Kamoun). Nous avons caractérisé leur structure chimique et leurs activités antioxydante et antibactérienne. Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation et leur rendement est respectivement de 2.2 % et 1.7 %. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et celle couplée à un FID (GC-FID) montre que les deux huiles se composent principalement de monoterpènes oxygénés mais très différentes les unes des autres. Les principaux composants de l'huile essentielle de *C. cyminum* sont le  $\gamma$ -terpinène-7-al (37.2%), le cuminaldéhyde (29.1%), le  $\gamma$ -terpinène (10.0%), le  $\beta$ -pinène (7.1%) et le p-cymène (6.1%). Pour l'espèce *A. leucotrichus*, les principaux constituants sont le perrilla aldéhyde (78.2%) et le limonène (9.5%). Ensuite, nous avons évalué le pouvoir antioxydant et antibactérien des deux huiles essentielles. Elles ont montré un profil particulièrement intéressant vis-à-vis de l'oxydation des corps gras insaturés et un pouvoir inhibiteur puissant contre la plupart des souches bactériennes testées (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella* spp, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*). Les diamètres des zones

d'inhibition variaient de 0,80 à 1,20 cm pour l'huile de *C. cyminum*, et de 0,70 à 0,80 cm pour l'huile d'*A. leucotrichus*, alors qu'il était de 0 à 1,40 cm pour l'amoxicilline et de 0 à 2,60 pour la ciprofloxacine. En revanche aucune inhibition n'ait été observée contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans la troisième partie de notre étude nous avons évalué l'influence de l'origine géographique sur la composition lipidique du cumin (*C. cyminum*) de six régions marocaines. En effet, plusieurs observations du terrain ont montré des différences sensorielles. Notre étude a montré de grandes variations en termes de rendement en huile (16.3-25.7 %) et de composition chimique. D'une manière générale, la fraction lipidique du cumin est très insaturée. Les principaux acides gras rencontrés sont l'acide pétrosélinique et l'acide linoléique. Leur composition varient entre 54.9-60.9 % et 30.1-31.3 % respectivement. Les principaux tocophérols et tocotriénols sont le  $\alpha$ -tocophérol et le  $\alpha$ -tocotriénol. Les fruits de cumin récoltés aux altitudes les plus basses présentaient la plus faible teneur en  $\alpha$ -tocophérol (de 20,9 à 32,8 mg/100g), tandis que celles prélevées à une altitude plus élevée avaient une teneur plus élevée (Alnif : 50,3 mg/100g). Ces différences en composition chimiques peuvent être dues à l'altitude ou d'autres facteurs non encore identifiés, tel que l'aridité ou les conditions pédoclimatiques. Par conséquent, l'utilisation d'une nomenclature comme les fruits du cumin indien ou tunisien ou marocain, n'est pas du tout informative.

Notre étude décrit également pour la première fois la composition en acide gras, en stérols et en tocophérols de l'espèce *A. leucotrichus*. La teneur en huile a été déterminée par extraction solide-liquide en utilisant de l'éther de pétrole. Les résultats obtenus ont montré que les fruits d'*Ammodaucus leucotrichus* L., sont constitués d'environ 10.8 % de matière grasse. Ils indiquent, également, que cette huile peut être considérée comme une source importante d'acides gras insaturés (particulièrement l'acide pétrosélinique : 71.2 %), de stérols ( $\beta$ -sitostérol : 43.6 % et  $\Delta$ -5-stigmastérol : 32.9 %) et de tocophérols ( $\alpha$ -tocophérol : 10.7 mg/kg



et  $\gamma$ -tocophérol : 357.5 mg/kg). Notre étude a confirmé ainsi la présence de l'acide pétrosélinique comme acide gras majeur chez les plantes de la famille des Apiacées.

Dans la dernière partie de notre étude nous avons décrit la composition chimique de l'huile de la variété 'Sefri' de la grenade marocaine. Le rendement en huile était déterminé par extraction solide-liquide en utilisant l'éther de pétrole (22.63 %). Les résultats obtenus ont montré que les acides gras de cette huile se compose principalement d'acides linoléniques conjugués avec l'acide punique comme acide gras majoritaire (75.1 %). Quatre acides linoléniques conjugués ont été identifiés, comme différents isomères géométriques de l'acide linoléniques, à savoir : l'acide punique (C18: 3 (c9, t11, c13)), l'acide catalpique (C18: 3 (t9, t11, c13)) (6.7 %), l'acide  $\alpha$ -éléostéarique (C18: 3 (c9, t11, t13)) (3.73 %) et l'acide  $\beta$ -éléostéarique (C18: 3 (t9, t11, t13)) (1.43 %). La teneur en stérols de l'huile de grenade est de 494.61 mg/100g, avec le  $\beta$ -sitostérol comme composé majoritaire (404.59 mg/100g). La teneur totale en tocophérols est de 332.44 mg/100g. Le  $\gamma$ -tocophérol (190.47 mg/100g d'huile) est le constituant principal. Cette étude montre également que l'huile de grenade est particulièrement sensible à l'oxydation, ce qui pourrait s'expliquer par la forte teneur en acides linoléniques conjugués. Des précautions particulières, telles que la réfrigération, et le conditionnement en flacons teintés doivent être envisagées pour le stockage prolongé de cette huile.

En perspective de notre travail, plusieurs études restent à entreprendre :

- Évaluation des activités pharmacologiques des nouveaux dérivés de l'amide d'acide caféique isolés afin de les promouvoir comme composés industriels
- Criblage des autres extraits du cumin essoufi, afin de caractériser les autres métabolites secondaires.
- Introduction de la fraction lipidique du cumin et du cumin essoufi dans des aliments fonctionnels en tant que source naturelle importante de l'acide pétrosélinique.
- Description de la composition chimique des autres variétés du grenade marocain.

# Références

- Abbet, C., Neuburger, M., Wagner, T., Quitschau, M., Hamburger, M., Potterat, O., 2011. Phyteumosides A and B: New saponins with unique triterpenoid aglycons from *Phyteuma orbiculare* L. *Org. Lett.* 13, 1354–1357. <https://doi.org/10.1021/ol200047v>
- Abu Zarga, M.H., Al-Jaber, H.I., Baba Amer, Z.Y., Sakhrib, L., Al-Qudah, M.A., Al-humaidi, J.Y.G., Abaza, I.F., Afifi, F.U., 2013a. Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of Essential Oil of *Ammodaucus leucotrichus* Growing in Algeria. *J. Biol. Act. Prod. from Nat.* 3, 224–231. <https://doi.org/10.1080/22311866.2013.833469>
- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- Adlard, E.R., 2010. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications 72, 1021. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1680-0>
- Adorjan, B., Buchbauer, G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Wiley Online Libr.* 25, 407–426. <https://doi.org/10.1002/ffj.2024>
- Ahlers, N.H.E., Dennison, A.C., O'NEILL, L.A., 1954. Spectroscopic examination of punicic acid. *Nature* 173, 1045–1046.
- Al-Bataina, B.A., Maslat, A.O., Al-Kofahi, M.M., 2003. Element analysis and biological studies on ten oriental spices using XRF and Ames test, *J. Trace Elem. Med. Biol.*
- Amiri, M.S., Joharchi, M.R., 2016. Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna J. phytomedicine* 6, 621–635.
- Anastas, P.T., Warner, J.C., 1998. Green Chemistry: theory and practice, in: Oxford University Press. p. 30.
- Arao, K., Wang, Y.M., Inoue, N., Hirata, J., Cha, J.Y., Nagao, K., Yanagita, T., 2004. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats. *Lipids Health Dis.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-3-24>
- Arun, N., Singh, D.P., 2012. *Punica granatum*: a review on pharmacological and therapeutic properties. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3, 1240–1245.
- Aruna, P., Venkataramanamma, D., Singh, A.K., Singh, R.P., 2016. Health Benefits of Punicic Acid: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 16–27. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12171>
- Athamena, S., 2008. Etude qualitative des flavonoides des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Université El-Hadj Lakhdar-Batna.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Leban. Sci. J.* 17, 85–90.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M., Coleman, R., Gaitini, D., Nitecki, S., Hofman, A., Rosenblat, M., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., 2002. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. 28, 49–62.
- Azadzoi, K.M., Schulman, R.N., Aviram, M., Siroky, M.B., 2005. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: Prophylactic role of antioxidants. *J. Urol.* 174, 386–393. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000161209.39959.67>
- Badr, F.H., Georgiev, E. V., 1990. Amino acid composition of cumin seed (*Cuminum cyminum* L.). *Food Chem.* 38, 25–29.
- Bashyal, P., Parajuli, P., Pandey, R.P., Sohng, J.K., 2019. Microbial biosynthesis of antibacterial chrysoeriol in recombinant *Escherichia coli* and bioactivity assessment. *Catalysts* 9, 112. <https://doi.org/10.3390/catal9020112>
- Baur, M., Fay, L., Malnoem, A., 1999. Utilisation de l'acide pétrosélinique pour le traitement des inflammations des tissus superficiels.

- Behera, S., Nagarajan, S., Rao, L.J.M., 2004. Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. *Food Chem.* 87, 25–29.
- Bellakhdar, J., 1997. Pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis press.
- Ben Abdennebi, M.A., 2012. Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. Université de Montréal.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*.
- Bettaieb, I., Bourgou, S., Wannas, W.A., Hamrouni, I., Limam, F., Marzouk, B., 2010. Essential oils, phenolics, and antioxidant activities of different parts of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 58, 10410–10418. <https://doi.org/10.1021/jf102248j>
- Bettaieb, I.R., Kefi, S., Limam, F., Marzouk, B., 2013. Variations in fatty acid composition during maturation of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 5303–5307.
- Bieri, J.G., Evarts, R.P., 1974. Gamma tocopherol: metabolism, biological activity and significance in human vitamin E nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 980–986.
- Blumberg, J., 1994. The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study in Finland. *Nutr. Rev.* 52, 242–245.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.* 114, 1198–1205.
- Boussetta, T., Raad, H., Letté Ron, P., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Marie, J.-C., Driss, F., El-Benna, J., 2009. Punicic Acid a Conjugated Linolenic Acid Inhibits TNF $\alpha$ -Induced Neutrophil Hyperactivation and Protects from Experimental Colon Inflammation in Rats. *PLoS One* 4, e6458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006458>
- Boyras, N., Özcan, M., 2005. Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia* 76, 661–665.
- Bray, C., 2005. Huiles essentielles et parfums: aromathérapie et aromachologie. Université de Picardie.
- Breitmaier, E., 2006. Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1981. Autoxidation of Biological Molecules. 1. The Antioxidant Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in Vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6472–6477. <https://doi.org/10.1021/ja00411a035>
- Cahoon, E.B., Shanklin, J., Ohlrogge, J.B., 1992. Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco (fatty acid desaturation/transgenic expression/Umbelliferae/unsaturated fatty acid), *Plant Biology*.
- Caprioli, G., Fiorini, D., Maggi, F., Marangoni, M., Papa, F., Vittori, S., Sagratini, G., 2014. Ascorbic acid content, fatty acid composition and nutritional value of the neglected vegetable Alexanders (*Smyrniolus atratum* L., Apiaceae). *J. Food Compos. Anal.* 25, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.05.001>
- Cardinali, A., Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochem. Adv. Res.* 37, 23–67.
- Carvalho, P.D.M., Mancini, J., 2014. Pomegranate Seed Oil (*Punica Granatum* L.): A Source of Punicic Acid (Conjugated  $\alpha$ -Linolenic Acid) Application of Non-thermal Processing Technologies for Obtaining High Quality Fruit Products and Characterization of Bioactive and Aroma Compounds in Develop. *J. Hum. Nutr. Food Sci* 2, 1–11.
- Casabianca, H., Graff, J. -B., Jame, P., Perrucchiotti, C., Chastrette, M., 1995. Application of hyphenated techniques to the chromatographic authentication of flavors in food products

- and perfumes. *J. High Resolut. Chromatogr.* 18, 279–285. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240180503>
- Chai, X.Y., Xu, Z.R., Ren, H.Y., Shi, H.M., Lu, Y.N., Li, F.F., Tu, P.F., 2007. Itosides A-I, new phenolic glycosides from *Itoa orientalis*. *Helv. Chim. Acta* 90, 2176–2185. <https://doi.org/10.1002/hlca.200790225>
- Christian Ngakegni-Limbili, A., 2012. Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserve et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. Université de Toulouse.
- Couderc, V., 2001. Toxicité des huiles essentielles. Université de Toulouse.
- Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C., Basu, C., 2019. Therapeutic and medicinal uses of terpenes, in: *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy*. Springer International Publishing, pp. 333–359. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15)
- Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W., 2006. Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6261–6265. <https://doi.org/10.1021/jf060338y>
- Dahmane, D., Dob, T., Krimat, S., Nouasri, A., Metidji, H., Ksouri, A., 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of medicinal plant *Ammodaucus leucotrichus* from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 29, 48–55. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1201015>
- Dahmane, D., Dob, T., Krimat, S., Nouasri, A., Metidji, H., Ksouri, A., 2016. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of medicinal plant *Ammodaucus leucotrichus* from Algeria. *J. Essent. oil Res.* 29, 48–55. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1201015>
- Degenhardt, J., Köllner, T.G., Gershenzon, J., 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70, 1621–1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>
- Delbeke, E.I.P., Everaert, J., Uitterhaegen, E., Verweire, S., Verlee, A., Talou, T., Soetaert, W., Van Bogaert, I.N.A., Stevens, C. V., 2016. Petroselinic acid purification and its use for the fermentation of new sophorolipids. *AMB Express* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0199-7>
- Dhandapani, S., Subramanian, R., Rajagopal, S., Namasivayam, N., 2002. Hypolipidemic effect of *cuminum cyminum* L. On alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res.* 46. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00131-7)
- Diao, W.-R., Hu, Q.-P., Zhang, H., Xu, J.-G., 2014. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* 35, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>
- Dool, H. Van Den, Kratz, P., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11, 463–471.
- Dutta, P.C., Appelqvist, L.-Å., 1989. The effects of different cultural conditions on the accumulation of depot lipids notably petroselinic acid during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Plant Sci.* 64, 167–177.
- El-ghorab, A.H., Nauman, M., Muhammad Anjum, F., Hussain, S., Nadeem, M., 2010. A Comparative Study on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) and Cumin (*Cuminum cyminum*). *J. Agric. Food Chem* 58, 8231–8237. <https://doi.org/10.1021/jf101202x>
- El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M.I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., Marzouki, M.N., Ben Hadj Ahmed, S., 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Evidence-Based Complement. Altern.*

Med. 1–11.

- El Haib, A., 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Université de Toulouse.
- Elfalleh, W., Ying, M., Nasri, N., Guasmi, F., 2010. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds Article in. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62, 200–206. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526932>
- Essaghouani, A.L., Elmsellem, H., Boulhaoua, M., Ellouz, M., El Hafi, M., Sebbar, N.K., Essassi, E.M., Bouabdellaoui, M., Aouniti, A., Hammouti, B., 2016. Adsorption proprieties and inhibition of mild steel corrosion in HCl solution by 1-Benzyl-4-phenyl-2,3-dihydro-1H-1,5-benzodiazepin-2-one. *Der Pharma Chem.* 8, 347–355.
- Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M.H., 2006. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *J. Food Compos. Anal.* 19, 676–680.
- Farmer, E.H., Van den Heuvel, F., 1936. Highly unsaturated compounds. Part VI. The triene acid from the seeds of pomegranates. *J. Chem. Soc.* 1809–1811.
- Fatiha, B.A., Ouafae, B., Souad, S., Fatima, E.H., Jamila, D., Allal, D., Lahcen, Z., 2017. Ethnobotany Study of Medicinal Plants Used in the Treatment of Respiratory Diseases in the Middle Region of Oum Rbai. *Int. J. Environ. Agric. Biotechnol.* 2, 1460–1468. <https://doi.org/10.22161/ijeab/2.4.3>
- Fernandes, L., Pereira, A., Lopéz-Cortés, I., Salazar, D.M., Ramalhosa, E., Casal, S., 2015. Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from 2 nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars 3 grown in Spain. *J. Food Compos. Anal.* 39, 13–22.
- Filliat, P., 2012. Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs. Université Joseph Fourier.
- Frankel, E., 1980. Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.* 19, 1–22.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A., Bloino, J., Janesko, B.G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H.P., , 2016. Gaussian 09, Revision D.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.* 102, 898–904.
- Ghanmi, Mohamed, Farah, Abdellah, Amarti, F., Ajjouri, M. El, Ghanmi, M, Satrani, B., Aafi, A., Farah, A, Khia, A., Guedira, A., Rahouti, M., Chaouch, A., 2011. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l’huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie* 9, 149–157. <https://doi.org/10.1007/s10298-011-0625-6>
- Gharby, S., 2012. Contribution à la valorisation de l’huile d’argane “Influence de l’origine du fruit (terroir, forme) et de la méthode d’extraction sur la composition chimique, les caractéristiques organoleptiques et la stabilité de l’huile d’argane.” Université de Mohammed V.
- Gharby, S., Harhar, H., Bouzoubaa, Z., Asdadi, A., El Yadini, A., Charrouf, Z., 2017. Chemical characterization and oxidative stability of seeds and oil of sesame grown in Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 16, 105–111.
- Gharby, S., Harhar, H., Charrouf, Z., Bouzoubaa, Z., Boujghagh, M., Zine, S., 2013. Physicochemical composition and oxidative stability of *Opuntia ficus-indica* seed oil from Morocco, in: VIII International Congress on Cactus Pear and Cochineal. pp. 83–88. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1067.11>
- Gharby, S., Harhar, H., El Monfalouti, H., Kartah, B., Maata, N., Guillaume, D., Charrouf, Z., 2012. Chemical and oxidative properties of olive and argan oils sold on the Moroccan

- market. A comparative study. *Med. J. Nutrition Metab.* 5, 31-38. <https://doi.org/10.1007/s12349-011-0076-5>
- Gharby, S., Harhar, H., Farssi, M., Taleb, A.A., Guillaume, D., Laknifli, A., 2018. Influence of roasting olive fruit on the chemical composition and polycyclic aromatic hydrocarbon content of olive oil. *ocl-journal* 25, A303.
- Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Roudani, A., Boulbaroud, S., Ibrahim, M., Ahmad, M., Sultana, S., Hadda, T.B., Chafchaoui-Moussaoui, I., Charrouf, Z., 2015. Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 14, 172–177.
- Graille, J., 2003. *Lipides et corps gras alimentaires*. Lavoisier Tec et Doc, Paris.
- Gray, J.I., 1978. Measurement of lipid oxidation: A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55, 539–546. <https://doi.org/10.1007/BF02668066>
- Gueniche, A., Mahe, Y., Bru, C., 2014. .Utilisation de l'acide pétrosélinique pour lutter contre les troubles esthétiques de la silhouette associés à des modifications du tissu adipeux. WO2014180808 A1.
- Gupta, M.B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava, K.P., 1980. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. *Planta Med.* 39, 157–163. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074919>
- Gurr, M., Harwood, J., Frayn, K., Murphy, D., Michell, R., 2016. *Lipids: biochemistry, biotechnology and health*, 6th ed.
- Haddioui, A., 2012. *La culture du grenadier (Punica granatum L.) au Maroc*, Options Méditerranéennes, A.
- Hadj Salem, J., 2009. Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Institut national polytechnique de Lorraine.
- Hajib, A., Nounah, I., Oubihi, A., Harhar, H., Gharby, S., Kartah, B., Bougrin, K., Charrouf, Z., 2020. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from the Fruits of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L. (Apiaceae). *J. Essent. Oil-Bearing Plants* 1–10. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1790427>
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R., Bakhrouf, A., 2010. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2186–2192. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.044>
- Halla, N., Heleno, S.A., Costa, P., Fernandes, I.P., Calhella, R.C., Boucherit, K., Rodrigues, A.E., Ferreira, I.C.F.R., Barreiro, M.F., 2018. Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Ammodaucus leucotrichus* fruits growing in Sahara and its evaluation as a cosmeceutical ingredient. *Ind. Crops Prod.* 119, 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.043>
- Harborne, J., Marby, H., Marby, T., 2013. *The flavonoids*.
- Harborne, J.B., 1973. Phenolic Compounds, in: *Phytochemical Methods*. Springer Netherlands, pp. 33–88. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7_2)
- Hemavathy, J., Prabhakar, J.V., 1998. Lipid composition of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *J. Food Sci* 53, 1578–1579.
- Hennessy, A.A., Ross, R.P., Devery, R., Stanton, C., 2011. The health promoting properties of the conjugated isomers of  $\alpha$ -linolenic acid. *Lipids* 46, 105–119. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3501-5>
- Hernandez, F.C.A., Melgarejo, P., Martínez, J.J., Martínez, R., Legua, P., 2011. Fatty acid composition of seed oils from important Spanish pomegranate cultivars. *Ital. J. Food Sci.* 23, 188–193.
- Hmid, I., 2014. CONTRIBUTION A LA VALORISATION ALIMENTAIRE DE LA

GRENADE MAROCAINE (*Punica Granatum L.*): CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE, BIOCHIMIQUE ET STABILITE DE LEUR JUS FRAIS. Alimentation et Nutrition. Université d'Angers.

- Ho, C.-T., 2021. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II, in: Health II ACS Symposium Series. American Chemical Society, p. 17.
- Ho, S., Tsai, T., Tsai, P., Toxicology, C.L.-F. and C., 2008, U., 2008. Protective capacities of certain spices against peroxy-nitrite-mediated biomolecular damage. *Food Chem. Toxicol.* 46, 920–928.
- Iacobellis, N.S., Lo Cantore, P., Capasso, F., Senatore, F., 2005. Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum L.* and *Carum carvi L.* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 53, 57–61. <https://doi.org/10.1021/jf0487351>
- Idm'hand, E., Msanda, F., Cherifi, K., 2020. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Ammodaucus leucotrichus*. *Clin. Phytoscience* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-0154-7>
- Jalali-Heravi, M., Zekavat, B., Sereshti, H., 2007. Use of gas chromatography–mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian cumin and caraway. *J. Chromatogr. A* 1143, 215–226.
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., Sharma, A., 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem.* 121, 178–184.
- Janahmadi, M., Niazi, F., Danyali, S., Kamalinejad, M., 2006. Effects of the fruit essential oil of *Cuminum cyminum Linn.* (Apiaceae) on pentylenetetrazol-induced epileptiform activity in F1 neurones of *Helix aspersa*. *J. Ethnopharmacol.* 104, 278–282. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.019>
- Jennings, W., Shibamoto, T., 2012. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/ed058pa381.1>
- Jing, P.U., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., Liu, L., Yu, L.L., 2012. Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. *Food Chem.* 132, 1457–1464.
- Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., Eddouks, M., 2001. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharmacol.* 77, 175–182. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00289-6)
- Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F., 2012. La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie, 1st ed, Collection Phytothérapie pratique. Springer Paris, Paris. <https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0309-8>
- Kamal-Eldin, A., Lars-Åke, A., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.
- Kawaii, S., Lansky, E.P., 2004. Differentiation-Promoting Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Fruit Extracts in HL-60 Human Promyelocytic Leukemia Cells. *J. Med. Food* 7, 13–18. <https://doi.org/10.1089/109662004322984644>
- Keisuke, A., Hiroaki, Y., Seo-Young, H., Koji, N., Teruyoshi, Y., 2004. The 9cis,11trans,13cis Isomer of Conjugated Linolenic Acid Reduces Apolipoprotein B100 Secretion and Triacylglycerol Synthesis in HepG2 Cells. *Biotechnol. Biochem.* 68, 2643–2645. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2643>
- Khanbabaee, K., Van Ree, T., 2001. Tannins: Classification and Definition. *pubs.rsc.org* 18, 641–649. <https://doi.org/10.1039/B101061L>
- Koba, K., Imamura, J., Akashoshi, A., Kohno-Murase, J., Nishizono, S., Iwabuchi, M., Tanaka, K., Sugano, M., 2007. Genetically modified rapeseed oil containing cis-9,trans-11,cis-13-



- octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3741–3748. <https://doi.org/10.1021/jf063264z>
- Kobayashi, M., Mahmud, T., Umezome, T., Wang, W., Murakami, N., Kitagawa, I., 1997. The absolute stereostructures of the polyacetylenic constituents of Ginseng Radix Rubra. *Tetrahedron* 53, 15691–15700. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10026-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10026-6)
- Kulbat, K., 2016. Biotechnology and Food Sciences The role of phenolic compounds in plant resistance, *Biotechnol Food Sci.*
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 85, 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>
- Kÿralan, M., Ae, K., Gölü, M., Haluk Tokgöz, A.E., 2009. Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 985–990. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1436-x>
- Lansky, E.P., Newman, R.A., 2006. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* 109, 177–206. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.006>
- Lardry, J.-M., Haberkorn, V., 2007. L’aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie la Rev.* 61, 14–17.
- Laugier, J.P., Picard, E., 1996. Utilisation d’une huile riche en acide pétrosélinique comme agent hydratant. EP0709084 A2.
- Lin, L.C., Pai, Y.F., Tsai, T.H., 2015. Isolation of Luteolin and Luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and Their Pharmacokinetics in Rats, in: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, pp. 7700–7706. <https://doi.org/10.1021/jf505848z>
- Louail, Z., Kameli, A., Benabdelkader, T., Bouti, K., Hamza, K., Krimat, S., 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. seeds, *J. Mater. Environ. Sci.*
- Loza-Tavera, H., 1999. Monoterpenes in essential oils: Biosynthesis and properties, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 49–62. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4729-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4729-7_5)
- Mabry, T., Markham, K., Thomas, M., 2012. The systematic identification of flavonoids.
- Macheix, J.-J., 1996. Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle? *Acta Bot. Gall.* 143, 473–479. <https://doi.org/10.1080/12538078.1996.10515344>
- MacHida, K., Yamauchi, M., Kurashina, E., Kikuchi, M., 2010. Four new lignan glycosides from *osmanthus fragrans* lour. var. *aurantiacus* makino. *Helv. Chim. Acta* 93, 2164–2175. <https://doi.org/10.1002/hlca.201000074>
- Maghraoui, A.E., 1986. Monographie de la culture du cumin. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.
- Mahe, Y., Bru, C., 2014. Association d’acide petroselinique et de zinc pour une administration par voie orale pour lutter contre le vieillissement des cheveux. CA2911368 A1.
- Mahe, Y., Bru, C., ICastiel, I., Gueniche, A., 2016. Association d’acide petroselinique et de taurine pour une administration par voie orale pour lutter contre le vieillissement des cheveux. EP2994099 A1.
- Mallet, J.F., Cerati, C., Ucciani, E., Gamisana, J., Gruber, M., 1994. Antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivares. *Food Chem.* 49, 61–65.
- Mansoori, B., Modirsanei, M., Kiaei, M.-M., 2006. Cumin seed meal as an alternative to wheat bran in commercial laying hen diets. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2134–2139. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2587>
- Marriott, P.J., Shellie, R., Cornwell, C., 2001. Gas chromatographic technologies for the

- analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A* 936, 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01314-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01314-0)
- Mateos, R., Aguilera, M.P., Beltrán, G., 2006. Relationship of Rancimat values at varying temperatures for virgin olive oils. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 246–252. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0185-9>
- Matthäus, B., Brühl, L., 2015. Quality parameters for the evaluation of cold-pressed edible argan oil. *J. fur Verbraucherschutz und Leb.* 10, 143–154. <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0922-8>
- Matthäus, B., Guillaume, D., Gharby, S., Haddad, A., Harhar, H., Charrouf, Z., 2010. Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chem.* 120, 426–432.
- Mead, J., 1986. *Lipids: chemistry, biochemistry, and nutrition*. Plenum Press.
- Milan, K.M., Dholakia, H., Chemistry, T.P.K.-F., 2008, U., 2008. Enhancement of digestive enzymatic activity by cumin (*Cuminum cymínum* L.) and role of spent cumin as a bionutrient. *Food Chem.* 110, 678–683.
- Minh, C. Van, Nhiem, N.X., Yen, H.T., Kiem, P. Van, Tai, B.H., Le Tuan Anh, H., Hien, T.T.T., Park, S.J., Kim, N., Kim, S.H., 2015. Chemical constituents of *Trichosanthes kirilowii* and their cytotoxic activities. *Arch. Pharm. Res.* 38, 1443–1448. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0490-6>
- Moser, B., 2016. Fatty acid profile of 25 plant oils and implications for industrial applications (Abstract), in: *American Oil Chemist's Society Annual Meeting and Expo*. p. 60.
- Moussard, C., 2006. *Biochimie structurale et métabolique*.
- Msaada, K., Hosni, K., Taarit, M.B., Chahed, T., Hammami, M., Marzouk, B., 2008. Changes in fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit during maturation Valorisation of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) in Tunisia View project Metabolic disorders and diet View project. *Ind. Crops Prod.* 29, 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.05.011>
- Muckensturm, B., Diyani, F., Le Nouën, D., Fkih-Tetouani, S., Reduron, J.P., 1997. Ammolactone, a guaianolide from a medicinal plant, *Ammodaucus leucotrichus*. *Phytochemistry* 44, 907–910. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00621-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00621-8)
- Murphy, D., 1992. Identification and characterisation of genes and enzymes for the genetic engineering of oilseed crops for production of oils for the oleochemical industry: a review. *Ind. Crops Prod.* 1, 251–259.
- Mustapha, A., Fouad, M., Mousadik, A. El, Hassan, B., Baha, S., Khalil, C., 2012. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Tata Province, Morocco. *Int. J. Med. Plant Res.* 1, 99–123.
- Nait Achou, K., 2012. Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'*Euclýptus* poussant dans la région de Tizi Ouzou. Université Mouloud Mameri - Tii Oudou.
- Nalini, N., Sabitha, K., ... P.V.-J. of, 1998, U., 1998. Influence of spices on the bacterial (enzyme) activity in experimental colon cancer. *J. Ethnopharmacol.* 48, 25–32.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., 2003. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J. Food Sci.* 68, 1473–1477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09669.x>
- Nejia, H., 2013. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles. Université de Toulouse.
- Neurath, A.R., Strick, N., Li, Y.Y., Debnath, A.K., 2004. *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect. Dis.* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-41>
- Ngo-Duy, C.-C., Destailats, F., Keskitalo, M., Arul, J., Angers, P., 2009. Triacylglycerols of

- Apiaceae seed oils: Composition and regiodistribution of fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 111, 164–169. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800178>
- Nguyen, T., Aparicio, M., Saleh, M.A., Mcphee, D.J., 2015. Accurate Mass GC/LC-Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry Analysis of Fatty Acids and Triacylglycerols of Spicy Fruits from the Apiaceae Family. *Molecules* 20, 21421–21432. <https://doi.org/10.3390/molecules201219779>
- O’Riordan, M.J., Wilkinson, M.G., 2008. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chem.* 107, 1429–1435.
- Ohlrogge, J.B., 1994. Design of New Plant Products: Engineering of Fatty Acid Metabolism. *Plant Physiol.* 104, 821–826.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* 44, 307–315.
- Özcan, M., Erkmén, O., 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *Eur. Food Res. Technol* 212, 658–660.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2021. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Panda, H., 2010. Handbook on spices and condiments (cultivation, processing and extraction). Asia Pacific Business Press Inc. New Delhi, India.
- Pande, G., Akoh, C.C., 2009. Antioxidant Capacity and Lipid Characterization of Six Georgia-Grown Pomegranate Cultivars. *J. Agric. Food Chem* 57, 9427–9436. <https://doi.org/10.1021/jf901880p>
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2015. Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. *Front. Microbiol.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076>
- Perveen, S., Al-Taweel, A., 2018. Terpenes and terpenoids.
- Phillipson, J., 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry. Phytochemistry* 68, 2960–2972.
- Pietta, P.-G., 2000. Reviews Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A.M., 2000. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)
- Platel, K., Srinivasan, K., 2000. Stimulatory influence of select spices on bile secretion in rats. *Nutr. Res.* 20, 1493–1503.
- Prashanth, D., Asha, M., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 72, 171–173.
- Puneeth, H.R., Chandra, S.S.P., 2020. A review on potential therapeutic properties of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *Plant Sci.* 7, 9–16.
- Rawdkuen, S., Suthiluk, P., Kamhangwong, D., Benjakul, S., 2012. Antimicrobial activity of some potential active compounds against food spoilage microorganisms. *African J. Biotechnol.* 11, 13914–13921. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1400>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., Tantaoui-Elaraki, A., 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Essent. Oil Res.* 5, 179–184. <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698197>
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric.*

- Food Chem. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L., Alarcon-Aguilar, F.J., 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J. Ethnopharmacol.* 18, 131–142.
- Romeilah, R.M., Fayed, S.A., Mahmoud, G.I., 2010. Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *J. Appl. Sci. Res.* 6, 50–62.
- Sadaoui, N., Bec, N., Barragan-Montero, V., Kadri, N., Cuisinier, F., Larroque, C., Arab, K., Khettal, B., 2018. The essential oil of Algerian *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur. and its effect on the cholinesterase and monoamine oxidase activities. *Fitoterapia* 130, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.07.015>
- Saiedirad, M.H., Tabatabaeefar, A., Borghei, A., Mirsalehi, M., Badii, F., Ghasemi Varnamkhasti, M., 2007. Effects of moisture content, seed size, loading rate and seed orientation on force and energy required for fracturing cumin seed (*Cuminum cyminum* Linn.) under quasi-static loading. *J. Food Eng.* 86, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.021>
- Saloua, F., Eddine, N., Hedi, Z., 2009. Chemical composition and profile characteristics of Osage orange *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider seed and seed oil. *Ind. Crops Prod.* 29, 1–8.
- Sassano, G., Sanderson, P., Franx, J., Groot, P., Van Straalen, J., Bassaganya-Riera, J., 2009. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. *J. Sci. Food Agric.* 89, 1046–1052. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3552>
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 21–40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- Shahnaz, H., Hifza, A., Bushra, K., Khan, J.I., 2004. Lipid studies of *cuminum cyminum* fixed oil, Pak. *J. Bot.*
- Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B., Rafieian-Kopaei, M., 2016. A Review Study on *Punica granatum* L. *J. Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 21, 221–227. <https://doi.org/10.1177/2156587215598039>
- Shen, C.-C., Chang, Y.-S., Ho, L.-K., 1993. Nuclear Magnetic Resonance Studies of. *Phytochemistry* 34, 843–845.
- Shivakumar, S.I., Shahapurkar, A.A., Kalmath, K. V., Shivakumar, B., 2010. Antiinflammatory activity of fruits of *Cuminum cyminum* Linn. *Der Pharm. Lett.* 2, 22–24.
- Singh, B., Singh, J.P., Kaur, A., Singh, N., 2018. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chem.* 261, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.039>
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Pandey, S.K., Singh, U.K., Singh, R.K., 2002. Studies on essential oils: Part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phyther. Res.* 16, 680–682. <https://doi.org/10.1002/ptr.951>
- Sofowora, A., 2010. *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique.*
- Sowbhagya, H.B., 2013. Chemistry, Technology, and Nutraceutical Functions of Cumin (*cuminum cyminum* L): An Overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 1–10. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500223>
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30, 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., De Riccardis, F., Leitz, R., Oleszek, W., 2001. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 49, 753–758. <https://doi.org/10.1021/jf000876p>
- Svoboda, K., Svoboda, T., Syred, A., 2000. Secretory structures of aromatic and medicinal plants: a review and atlas of micrographs.
- Syed, D.N., Afaq, F., Mukhtar, H., 2007. Pomegranate derived products for cancer

- chemoprevention. *Semin. Cancer Biol.* 17, 377–385.
- Taoufik, F., Zine, S., El Hadek, M., Idrissi Hassani, L.M., Gharby, S., Harhar, H., Matthäus, B., 2015. Oil content and main constituents of cactus seed oils *Opuntia Ficus Indica* of different origin in Morocco. *Med. J. Nutrition Metab.* 8, 85–92.
- Telli, A., Esnault, M.A., Ould El Hadj Khelil, A., 2016. An ethnopharmacological survey of plants used in traditional diabetes treatment in south-eastern Algeria (Ouargla province). *J. Arid Environ.* 127, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.11.005>
- Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F., 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food Chem. Toxicol.* 49, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.022>
- Toyama, Y., Tsuchiya, T., 1935. new stereoisomer of eleostearic acid in pomegranate seed oil. *Kogyo Kagaku Zasshi* 38, 182–185.
- Trifan, A., Aprotosoiaie, A.C., Brebu, M., Cioancă, O.A.N.A., Gille, E., Hăncianu, M.O.N.I.C.A., Miron, A., 2015. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from Romanian *Satureja montana* L. *Farmacia* 63, 413–416.
- Tsuzuki, T., Tokuyama, Y., Igarashi, M., Miyazawa, T., 2004. Tumor growth suppression by  $\alpha$ -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis* 25, 1417–1425.
- Tuberoso, C.I.G., Orrù, C.D., 2008. Phenolic compounds in food, in: *Progress in Food Chemistry*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 1–45. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001>
- Tucker, J.M., Townsend, D.M., 2005. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed. Pharmacother.* 59, 380–387.
- Tunc, I., Berger, B., Erler, F., Research, F.D.-J. of S.P., 2000, U., 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 36, 161–168.
- Unten, L., Koketsu, M., Kim, M., 1997. Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on  $\beta$ -carotene. *J. Agric. food Chem.* 45, 2009–2012.
- Vance, J., Vance, D., 2008. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 5th ed.
- Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Pérez De Paz, P.L., Palá-Paúl, J., Sanz, J., 2006. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the volatiles from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* subsp. *leucotrichus* and subsp. *nanocarpus* grown in North Africa and the Canary Islands, respectively. *J. Chromatogr. A* 1108, 273–275. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.031>
- Villaseñor, I.M., Angelada, J., Canlas, A.P., Echegoyen, D., 2002. Bioactivity studies on  $\beta$ -sitosterol and its glucoside. *Phyther. Res.* 16, 417–421. <https://doi.org/10.1002/ptr.910>
- Viuda-Martos, M., Mohamady, M., Fernández-López, J., ElRazik, K.A., Omer, E., Pérez-Alvarez, J., Sendra, E., 2011. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control* 22, 1715–1722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.003>
- Voet, D., Voet, J., 2016. *Biochimie*.
- Vroegrijk, I.O., Can Diepen, J.A., Can den Berg, S., Westbroek, I., Keizer, H., Gambelli, L., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., Zondag, G.C., Romijn, J.A., Havekes, L.M., 2011. Pomegranate seed oil, a rich source of puniceic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1426–1430.
- Wald, E., 2009. Le grenadier (*punica granatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1.
- Warashina, T., Nagatani, Y., Noro, T., 2004. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 65, 2003–2011.

- <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.06.012>
- Weil, J., Bonnet, J., Bonnet, J., 2001. *Biochimie générale*.
- Wen, Q., Lin, X., Liu, Y., Xu, X., Liang, T., Zheng, N., Kintoko, K., Huang, R., 2012. Phenolic and lignan glycosides from the butanol extract of *averrhoa carambola* l. root. *Molecules* 17, 12330–12340. <https://doi.org/10.3390/molecules171012330>
- Willatgamuwa, S., Platel, K., Research, G.S.-N., 1998, U., 1998. Antidiabetic influence of dietary cumin seeds (*Cuminum cyminum*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Nutr. Res.* 18, 131–142.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2010. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 11, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Yassir, E.O., Costa, Jean, Manssouri, M., Ouadi, Y. El, Znini, M., Costa, J, Bouyanzer, A., Desjobert, J.-M., Majidi, L., 2015. Adsorption proprieties and inhibition of mild steel corrosion in HCl solution by the essential oil from fruit of Moroccan *Ammodaucus leucotrichus* Valorization of Moroccan aromatic and medicinal plants View project Biological activities of natural products. *J. Mater. Environ. Sc* 6, 631–646.
- Zhang, C.F., Zhou, J., Yang, J.Z., Li, C.J., Ma, J., Zhang, D., Li, L., Zhang, D.M., 2016. Three new lignanosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 18, 913–920. <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1187603>
- Ziani, B.E.C., Rached, W., Bachari, K., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Detailed chemical composition and functional properties of *Ammodaucus leucotrichus* Cross. ampamp; Dur. and *Moringa oleifera* Lamarck. *J. Funct. Foods* 53, 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.023>

**Annexe (Caffeic acid amides  
derivatives from *Ammodaucus  
leucotrichus* L. fruits (Apiaceae)  
supporting informations)**

Supporting information

**Caffeic acid amides derivatives from *Ammodaucus leucotrichus* L.  
fruits (Apiaceae)**



**Table 25.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of **7-9** (DMSO- $d_6$ ; 500.13 Hz for  $^1\text{H}$  and 125.77 for  $^{13}\text{C}$  NMR;  $\delta$  in ppm).

Position	<b>7</b>		<b>8</b>		<b>9</b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)
2	163.6, C		163.2, C		163.1, C	
3	101.8, CH	6.54, s	102.2, CH	6.68, s	102.6, CH	6.77, s
4	181.0, C		181.0, C		181.2, C	
5	161.1, C		161.0, C		<sup>c</sup>	
6	99.0, CH	6.10, d (1.2)	98.8, CH	6.16, br s	98.9, CH	6.16, br s
7	165.9, C		164.9, C		<sup>c</sup>	
8	93.7, CH	6.36, d (1.2)	93.7, CH	6.44, br s	93.9, CH	6.44, br s
9	157.1, C		<sup>c</sup>		<sup>c</sup>	
10	102.5, C		103.0, C		102.6, C	
1'	120.1, C		120.6, C		121.0, C	
2'	112.4, CH	7.34 <sup>b</sup>	128.0, CH	7.87, br d (8.5)	109.9, CH	7.51 <sup>b</sup>
3'	146.0, C		115.7, CH	6.92, br d (7.9)	147.8, C	
4'	151.0, C		161.0, C		151.0, C	
5'	115.6, CH	6.83, br d (8.6)	115.7, CH	6.92, br d (7.9)	115.6, CH	6.94, br s
6'	118.5, CH	7.35 <sup>b</sup>	128.0, CH	7.87, br d (8.5)	120.0, CH	7.51 <sup>b</sup>
7-OCH <sub>3</sub>					55.7, CH <sub>3</sub>	3.88, s

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  shifts were extracted from HSQC and HMBC data. <sup>b</sup> Overlapped  $^1\text{H}$ -NMR signals are reported without multiplicities. <sup>c</sup> Signal not found.

**Table 26.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectroscopic data of **10** and **11** (DMSO- $d_6$ ; 500.13 Hz for  $^1\text{H}$  and 125.77 for  $^{13}\text{C}$  NMR;  $\delta$  in ppm).

Position	<b>10</b>		<b>11</b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)
2	164.1, C		164.0, C	
3	102.7, CH	6.81, s	103.1, CH	6.91, s
4	181.6, C		181.6, C	
5	160.9, C		156.6, C	
6	99.3, CH	6.45, d (1.8)	99.4, CH	6.45, d (1.8)
7	162.6, C		162.8, C	
8	94.5, CH	6.82, d (1.8)	94.8, CH	6.85, d (1.8)
9	156.6, C		160.9, C	
10	105.0, C		105.1, C	
1'	120.5, C		121.0, C	
2'	128.2, CH	7.93, br d (8.5)	110.3, CH	7.57 <sup>b</sup>
3'	115.8, CH	6.95, br d (8.5)	147.9, C	
4'	161.3, C		150.9, C	
5'	115.8, CH	6.95, br d (8.5)	115.6, CH	6.96, d (8.2)
6'	128.2, CH	7.93, br d (8.5)	120.3, CH	7.58 <sup>b</sup>
1''	99.9, CH	5.06, d (7.3)	99.9, CH	5.05, d (7.3)
2''	72.8, CH	3.29 <sup>b</sup>	72.9, CH	3.30 <sup>b</sup>
3''	76.2, CH	3.33 <sup>b</sup>	76.2, CH	3.34 <sup>b</sup>
4''	69.4, CH	3.21, br d (9.2)	69.5, CH	3.21, br d (9.1)
5''	76.9, CH	3.45, m	77.0, CH	3.46, m
6''	60.4, CH <sub>2</sub>	3.51, m	60.5, CH <sub>2</sub>	3.51, m
		3.74, m		3.75, m
7-OCH <sub>3</sub>			55.8, CH <sub>3</sub>	3.90, s

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  shifts were extracted from HSQC and HMBC data. <sup>b</sup> Overlapped  $^1\text{H}$ -NMR signals are reported without multiplicities.

**Table 27.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectroscopic data of **12** (methanol- $d_4$ ; 500.13 Hz for  $^1\text{H}$  and 125.77 for  $^{13}\text{C}$  NMR;  $\delta$  in ppm).

Position	<b>12</b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	129.1, C	
2	134.5, C	
3	117.4, CH	6.21, s
4	145.2, C	
5	147.2, C	
6	112.7, CH	6.67, s
7	33.6, CH <sub>2</sub>	2.82, m
8	39.6, CH	2.09, m
9	65.5, CH <sub>2</sub>	3.71, dd (11.0, 4.1) 3.75, dd (11.0, 4.1)
1'	138.6, C	
2'	114.6, CH	6.79, d (1.8)
3'	148.9, C	
4'	145.8, C	
5'	116.1, CH	6.76, d (8.0)
6'	123.2, CH	6.65, dd (8.0, 1.8)
7'	47.9, CH	4.03 <sup>b</sup>
8'	45.9, CH	1.90, ddt (10.1, 9.7, 3.0)
9'	70.0, CH <sub>2</sub>	3.30 <sup>b</sup> 4.04 <sup>b</sup>
1''	105.0, CH	4.15, d (7.9)
2''	75.2, CH	3.23 <sup>b</sup>
3''	78.1, CH	3.36, dd (9.10, 8.9)
4''	71.7, CH	3.31 <sup>b</sup>
5''	77.7, CH	3.22 <sup>b</sup>
6''	62.9, CH <sub>2</sub>	3.67, dd (11.9, 5.5) 3.84, m
5-OCH <sub>3</sub>	56.6, CH <sub>3</sub>	3.81, s
3'-OCH <sub>3</sub>	56.6, CH <sub>3</sub>	3.79, s

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  shifts were extracted from HSQC and HMBC data. <sup>b</sup> Overlapped  $^1\text{H}$ -NMR signals are reported without multiplicities.

**Table 28.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectroscopic data of **13** (methanol- $d_4$ ; 500.13 Hz for  $^1\text{H}$  and 125.77 for  $^{13}\text{C}$  NMR;  $\delta$  in ppm).

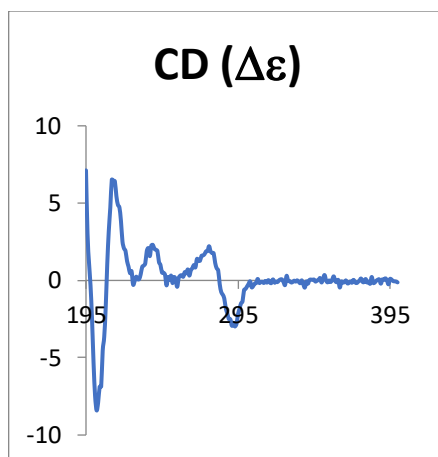
<b>13</b>		
Position	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	134.6, C	
2	110.7, CH	6.98, d (1.9)
3	149.0, C	
4	146.3, C	
5	115.6, CH	7.08, d (8.5)
6	118.0, CH	6.86, dd (8.5, 1.9)
7	87.5, CH	5.62, d (6.4)
8	52.5, CH	3.52, m
9	62.6, CH <sub>2</sub>	3.69 <sup>b</sup> 3.75, m
1'	127.7, C	
2'	112.8, CH	7.27 <sup>b</sup>
3'	143.9, C	
4'	150.7, C	
5'	129.9, C	
6'	118.7, CH	7.29 <sup>b</sup>
7'	153.7, CH	7.63, d (15.6)
8'	126.0, CH	6.72, dd (15.6, 7.8)
9'	194.0, CH	9.59, d (7.8)
1''	100.2, CH	4.87, d (7.3)
2''	76.6, CH	3.29 <sup>b</sup>
3''	73.1, CH	3.28 <sup>b</sup>
4''	69.6, CH	3.18, m
5''	76.7, CH	3.27 <sup>b</sup>
6''	60.7, CH <sub>2</sub>	3.46, m 3.67 <sup>b</sup>
3-OCH <sub>3</sub>	55.8, CH <sub>3</sub>	3.75, s
3'-OCH <sub>3</sub>	55.8, CH <sub>3</sub>	3.84, s

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  shifts were extracted from HSQC and HMBC data. <sup>b</sup> Overlapped  $^1\text{H}$ -NMR signals are reported without multiplicities.

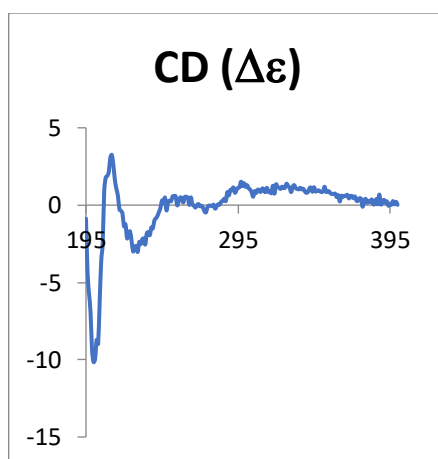
**Table 29.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectroscopic data of **14** (DMSO- $d_6$ ; 500.13 Hz for  $^1\text{H}$  and 125.77 for  $^{13}\text{C}$  NMR;  $\delta$  in ppm).

Position	<b>14</b>	
	$\delta_{\text{C}}$ , type <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	134.1, C	
2	111.5, CH	6.92, d (1.3)
3	149.1, C	
4	147.5, C	
5	116.1, CH	6.78 <sup>b</sup>
6	120.7, CH	6.79 <sup>b</sup>
7	85.8, CH	4.51, d (8.5)
8	55.8, CH	2.28, m
9	63.4, CH <sub>2</sub>	3.64, m
1'	136.2, C	
2'	111.9, CH	6.99, d (1.5)
3'	149.1, C	
4'	147.4, C	
5'	116.1, CH	6.78 <sup>b</sup>
6'	120.9, CH	6.82, dd (7.9, 1.5)
7'	77.5, CH	4.47, d (8.9)
8'	52.9, CH	2.62, m
9'	71.2, CH <sub>2</sub>	3.60, m
		3.71, dd (9.2, 6.7)
3-OCH <sub>3</sub>	56.6, CH <sub>3</sub>	3.86, s
3'-OCH <sub>3</sub>	56.6, CH <sub>3</sub>	3.84, s

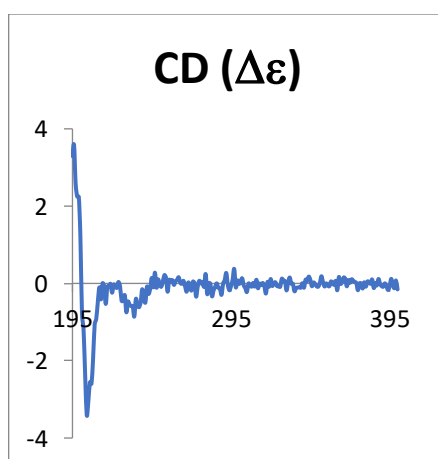
<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  shifts were extracted from HSQC and HMBC data. <sup>b</sup> Overlapped  $^1\text{H}$ -NMR signals are reported without multiplicities.



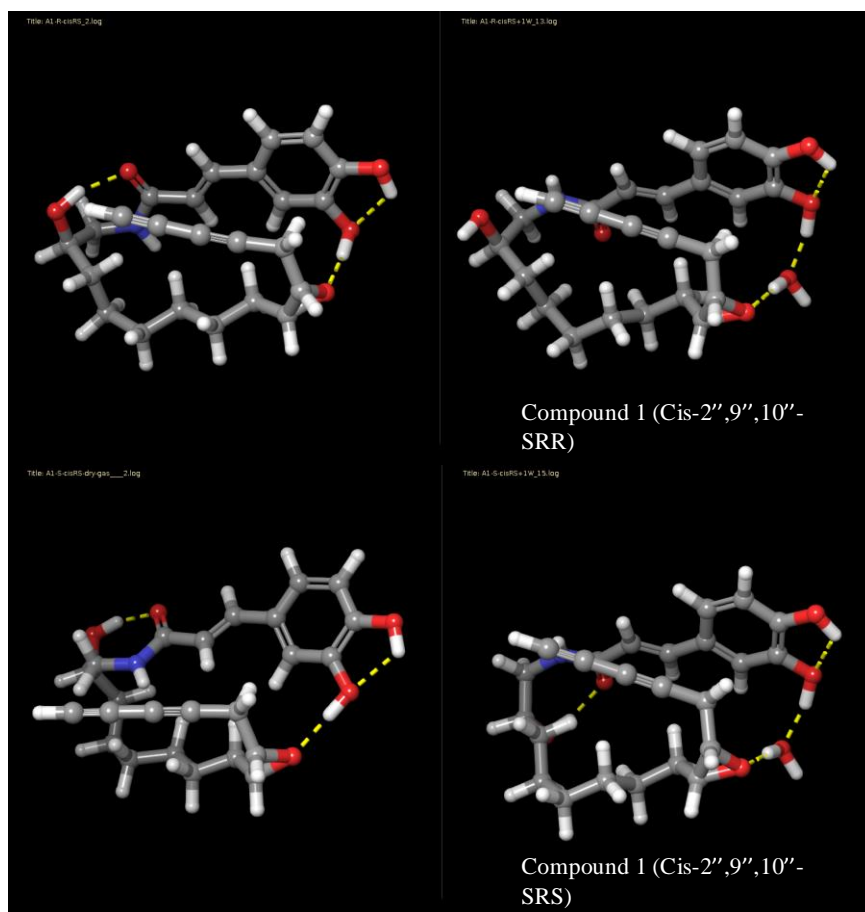
**Figure 46.** Experimental ECD Spectrum of Compound **12** in MeOH.



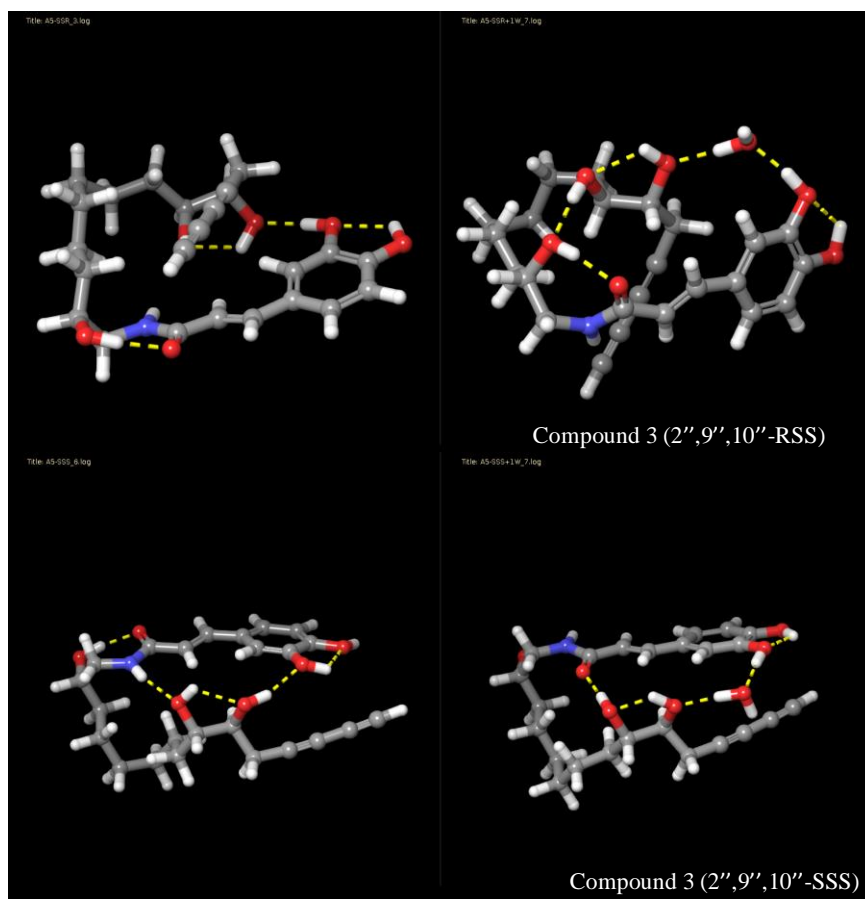
**Figure 47.** Experimental ECD Spectrum of Compound **13** in MeOH.



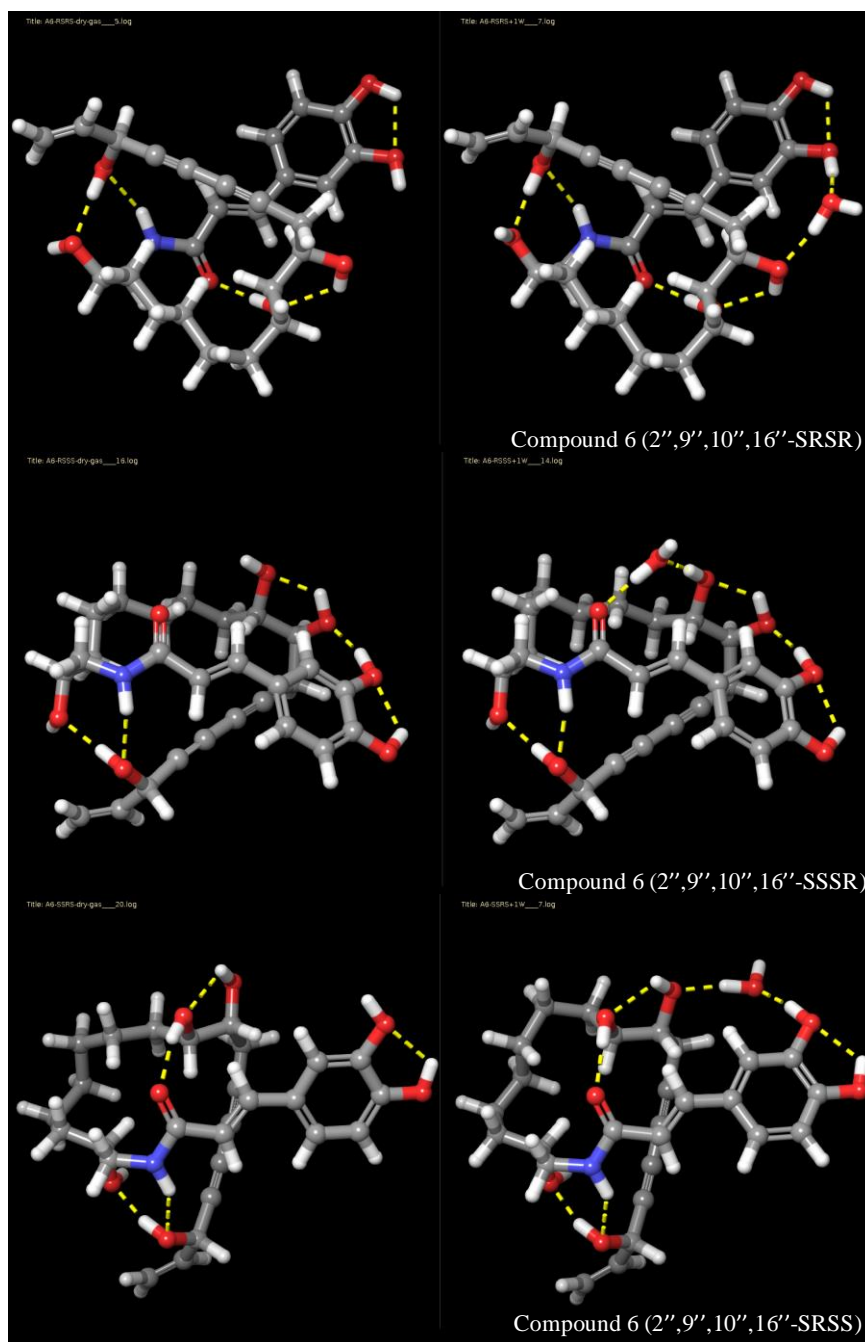
**Figure 48.** Experimental ECD Spectrum of Compound **14** in MeOH.



**Figure 49.** Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form global minima of compound **1**.

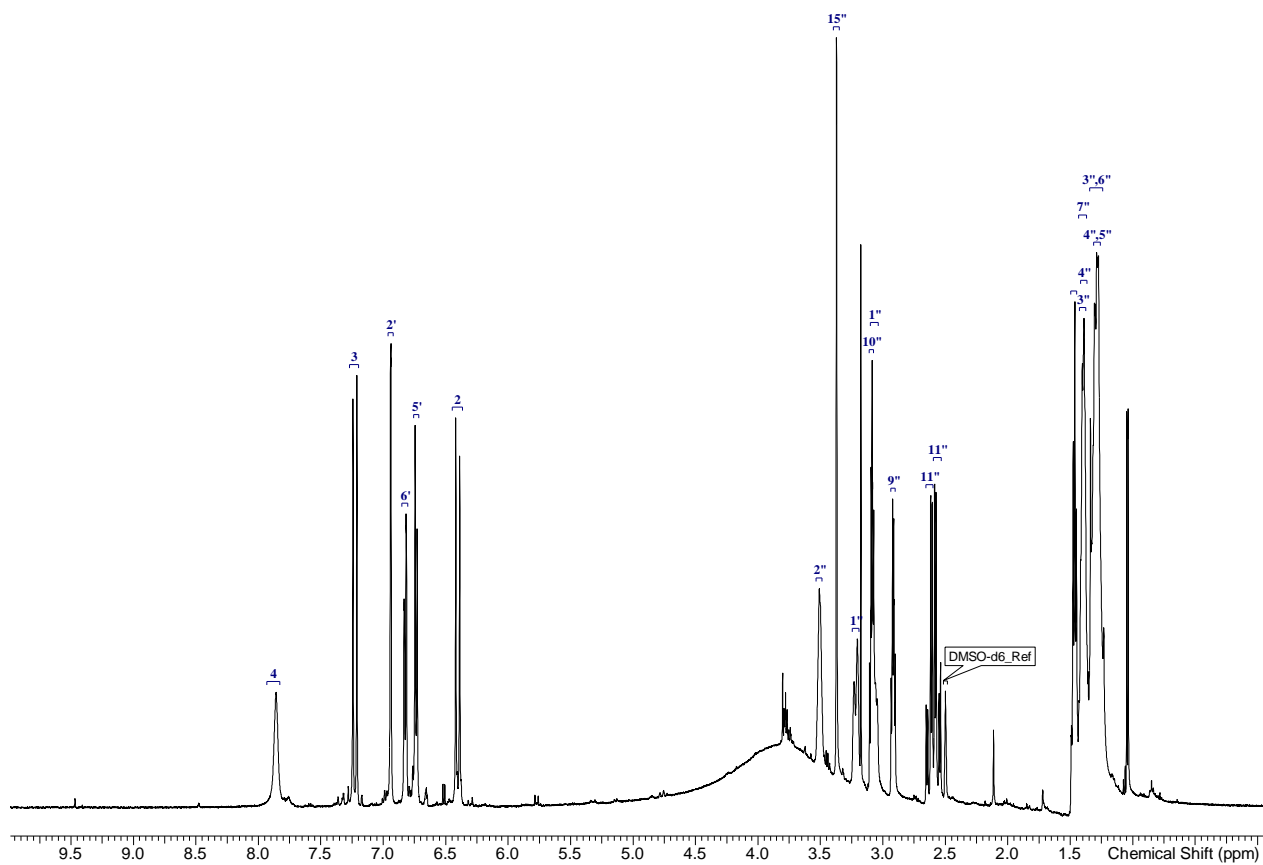


**Figure 50.** Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form global minima of compound 3.

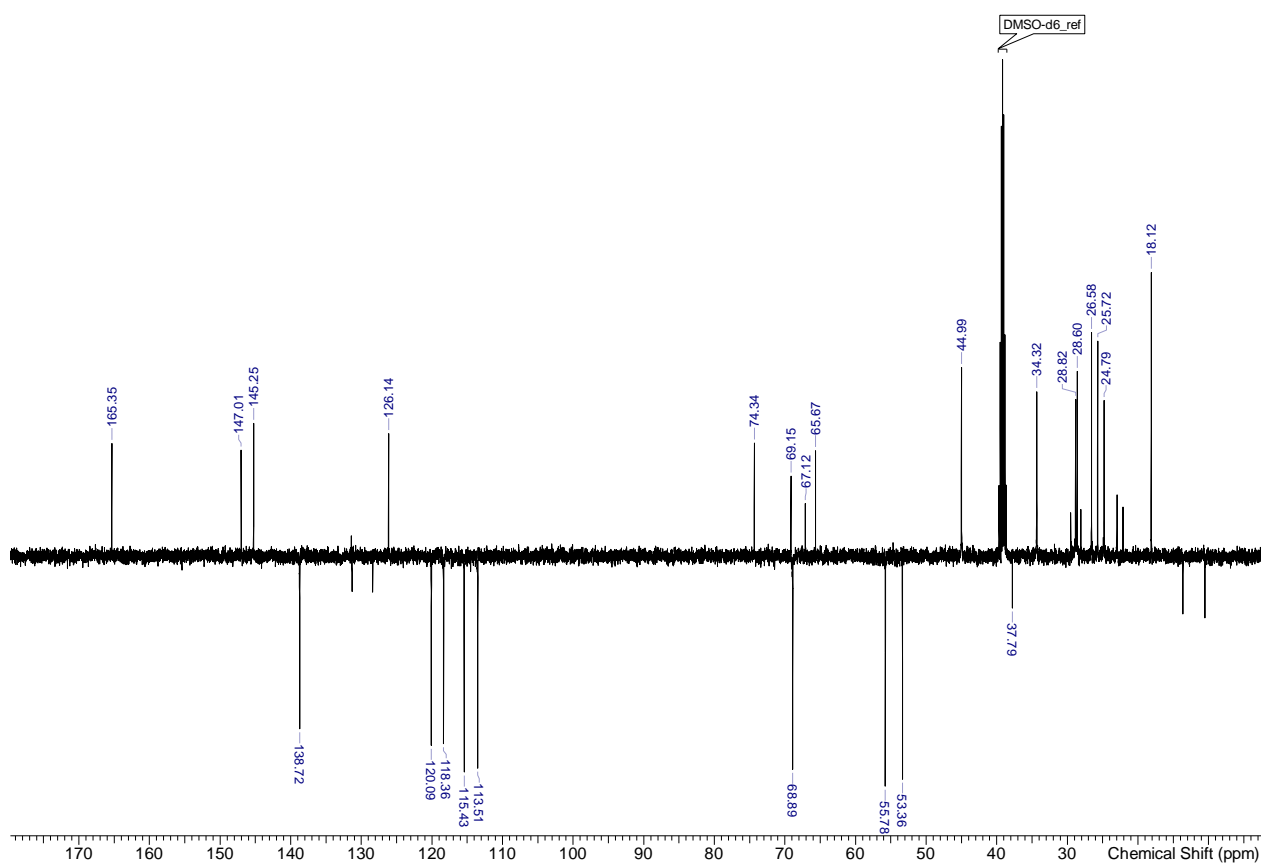


**Figure 51.** Comparisons of "dry" vs. "hydrated" form global minima of compound 6.

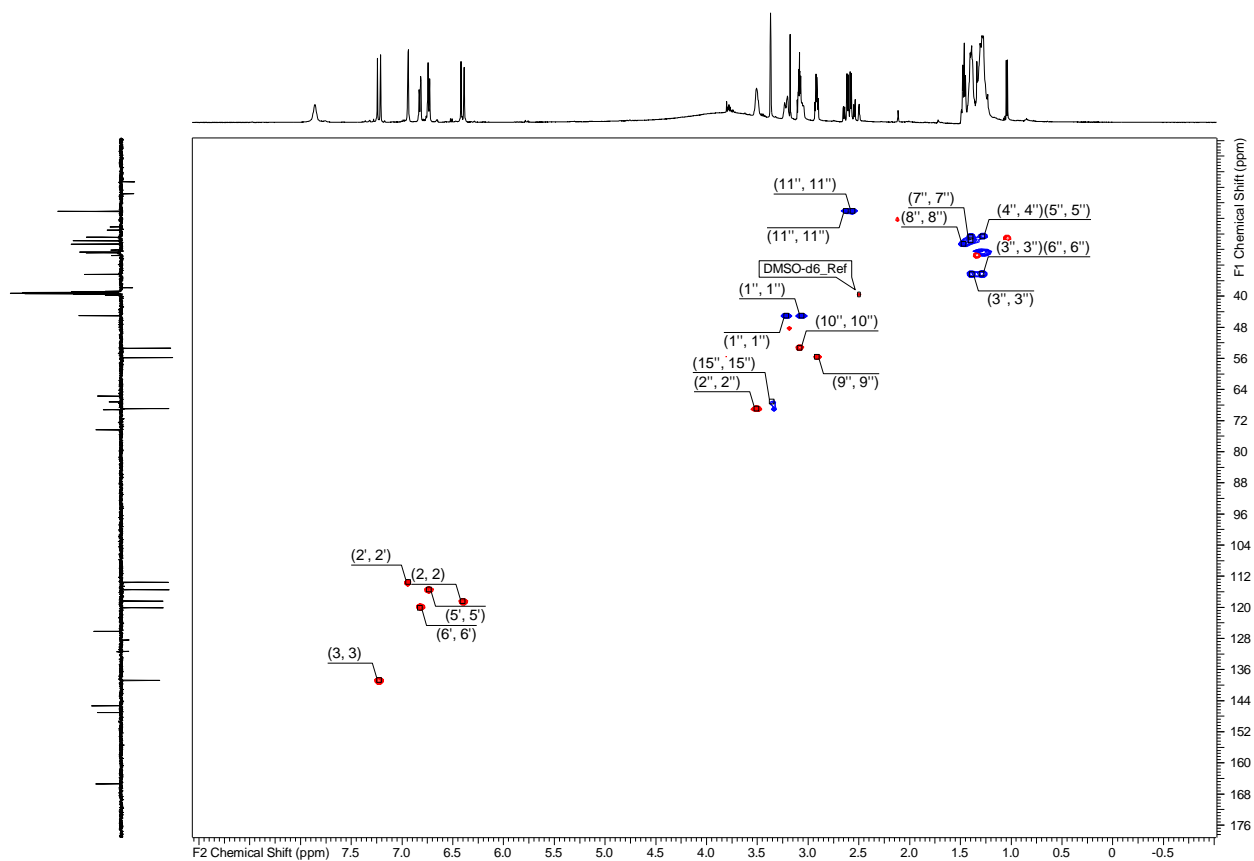




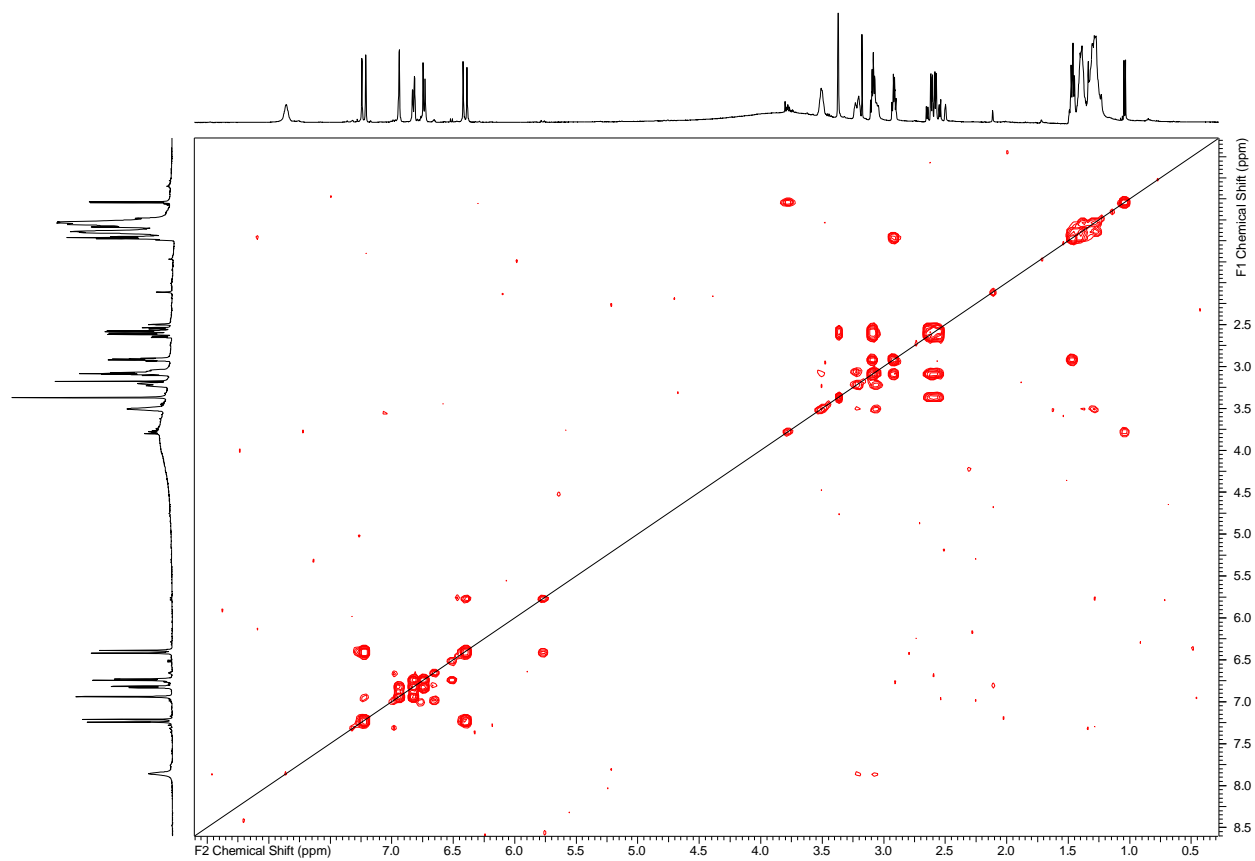
**Figure 52.**  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of Compound **1** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



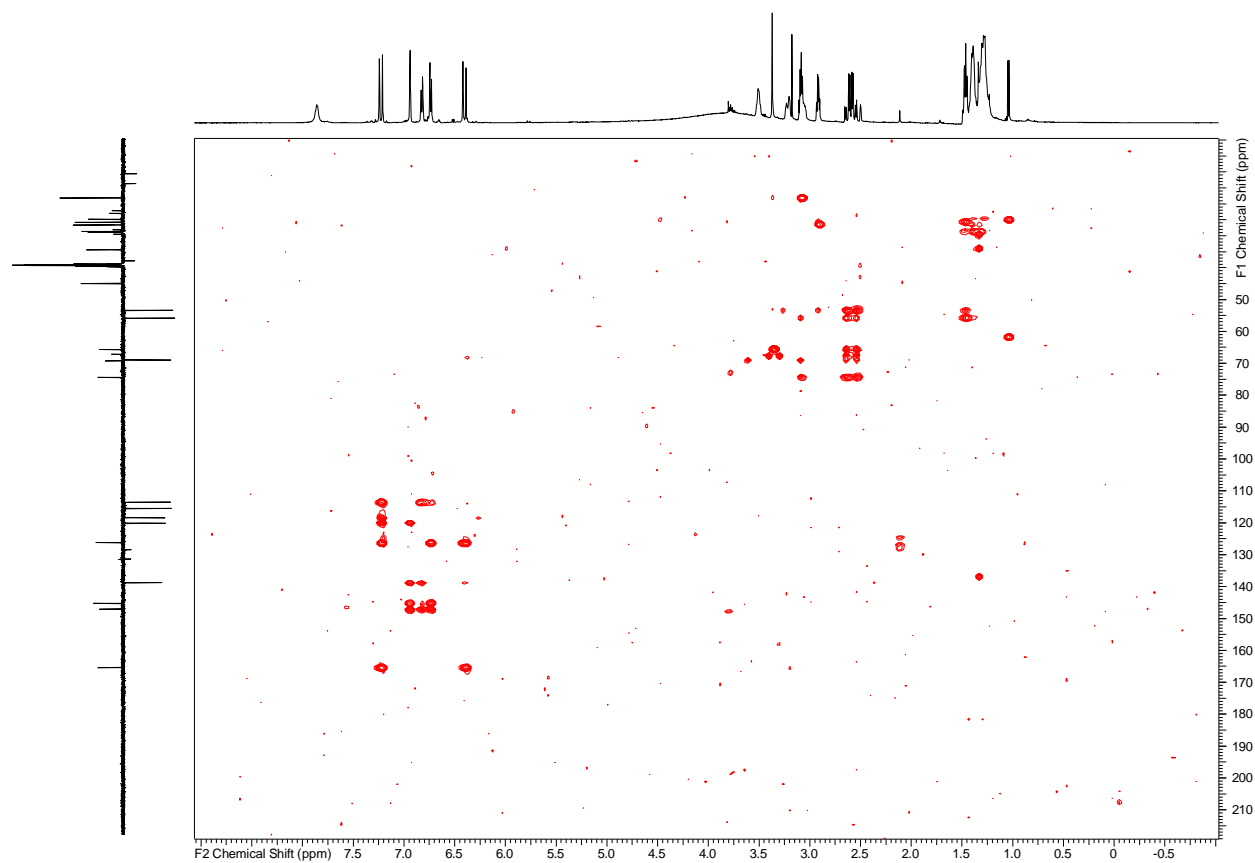
**Figure 53.**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum of Compound 1 (125.77 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



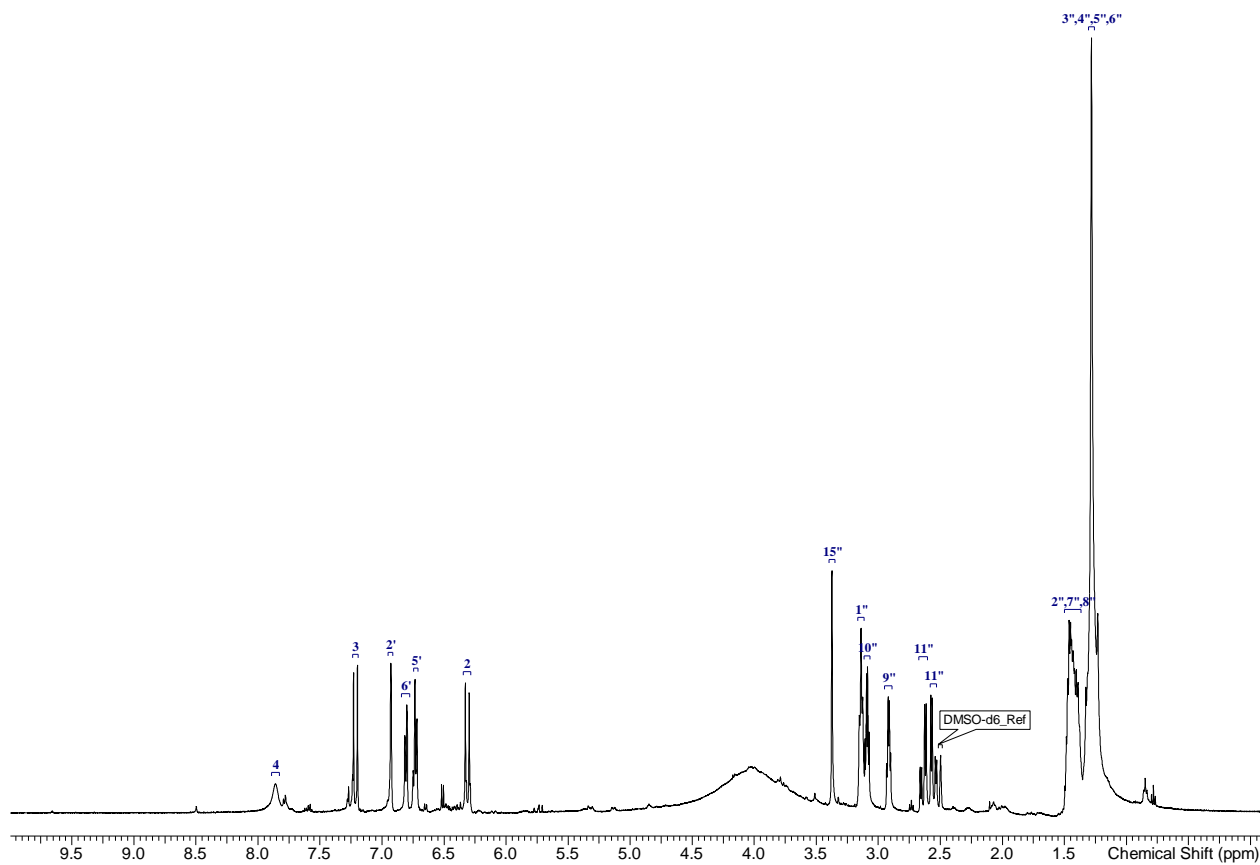
**Figure 54.** HSQC-DEPT Spectrum of Compound **1** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ ).



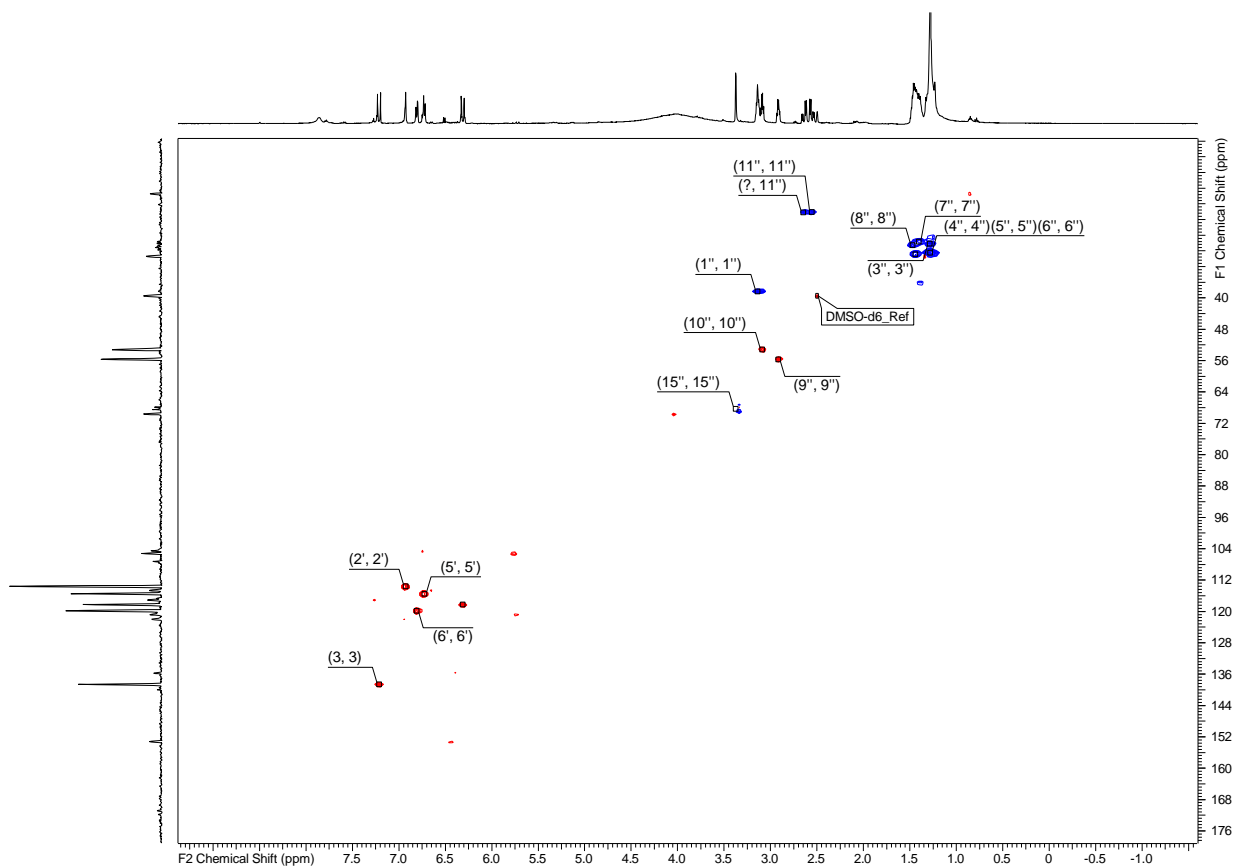
**Figure 55.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spectrum of Compound **1** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



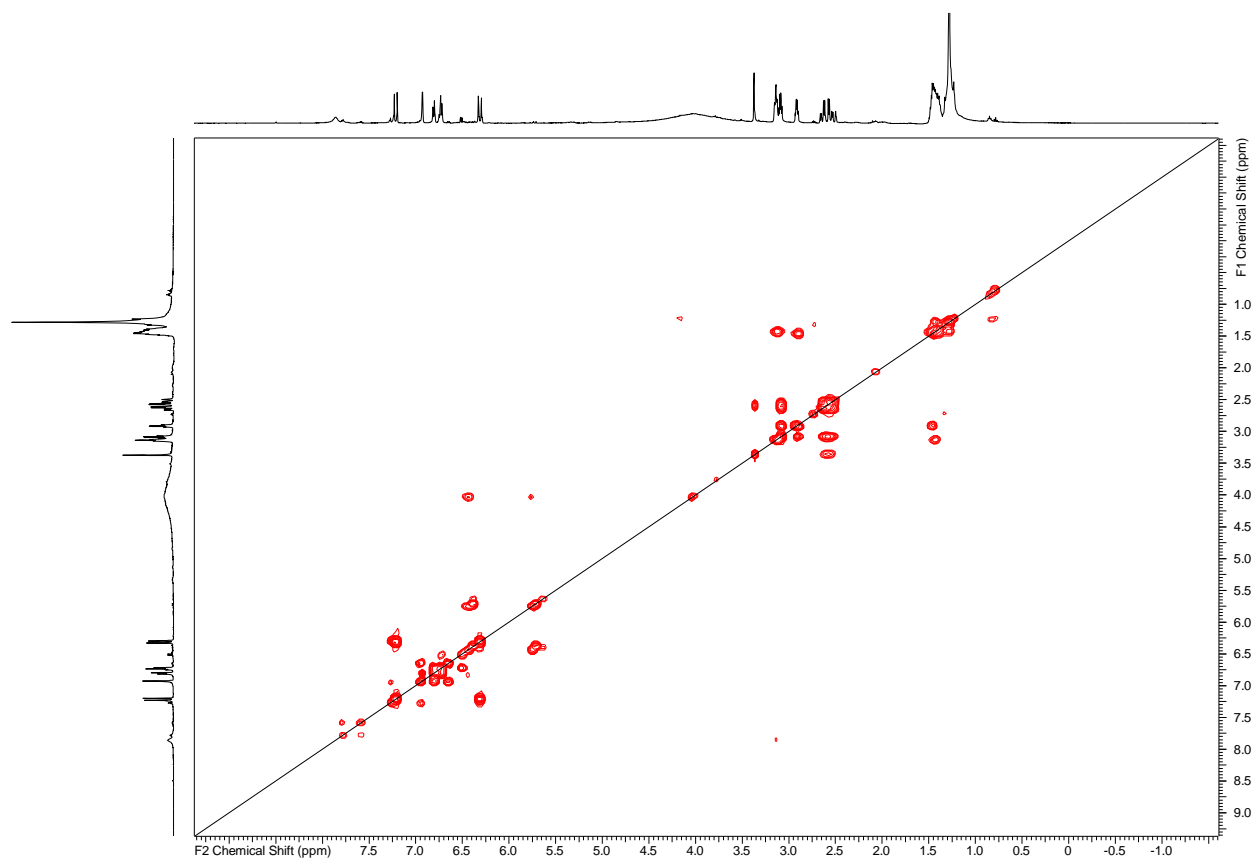
**Figure 56.** HMBC Spectrum of Compound **1** (500.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



**Figure 57.**  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of Compound **2** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

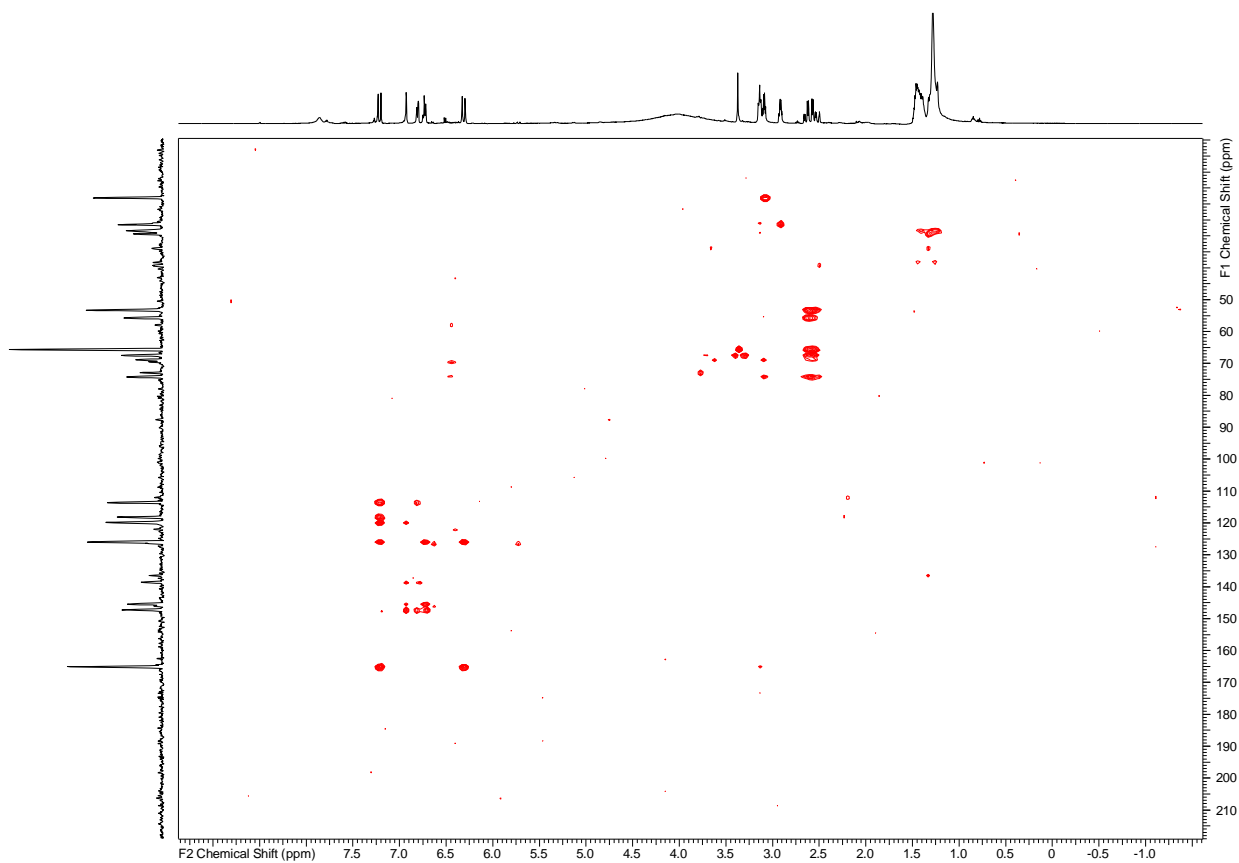


**Figure 58.** HSQC-DEPT Spectrum of Compound **2** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ ).

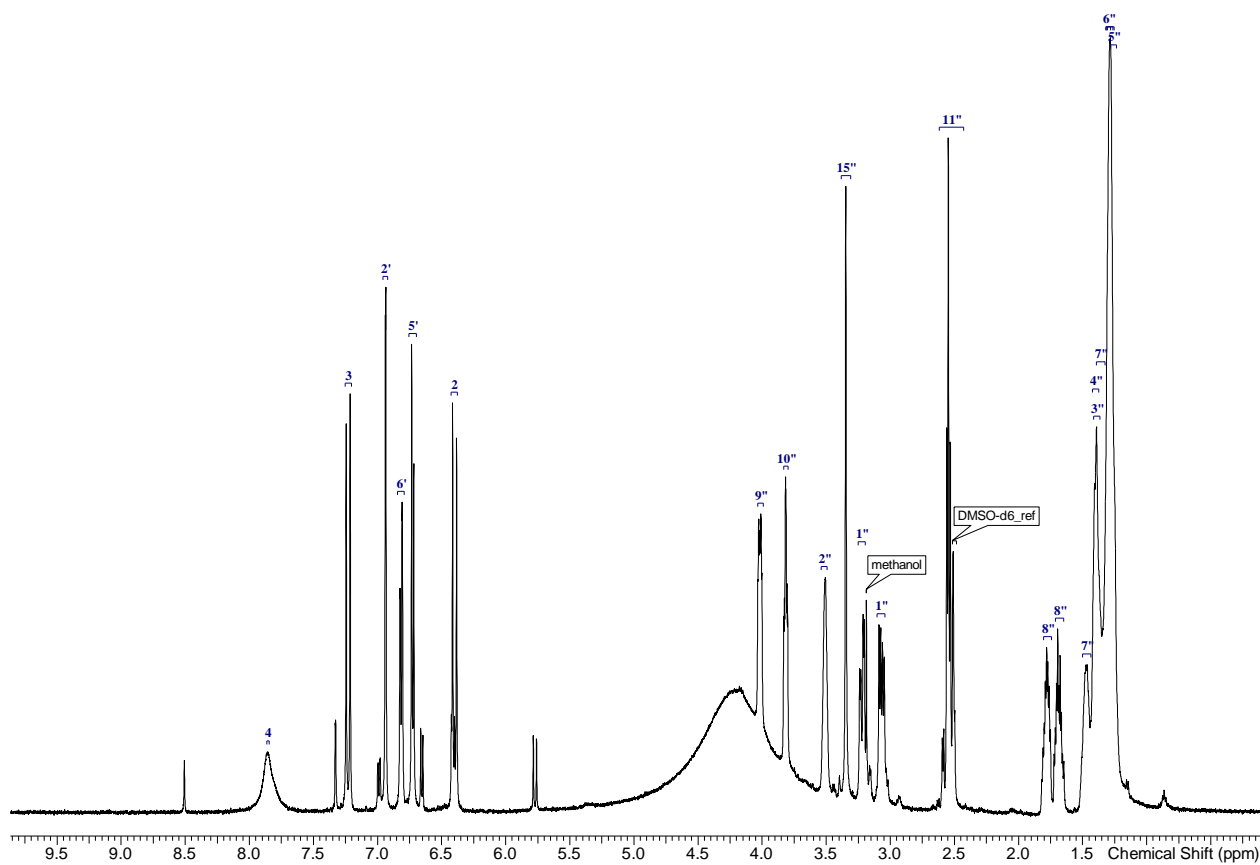


**Figure 59.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spectrum of Compound **2** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

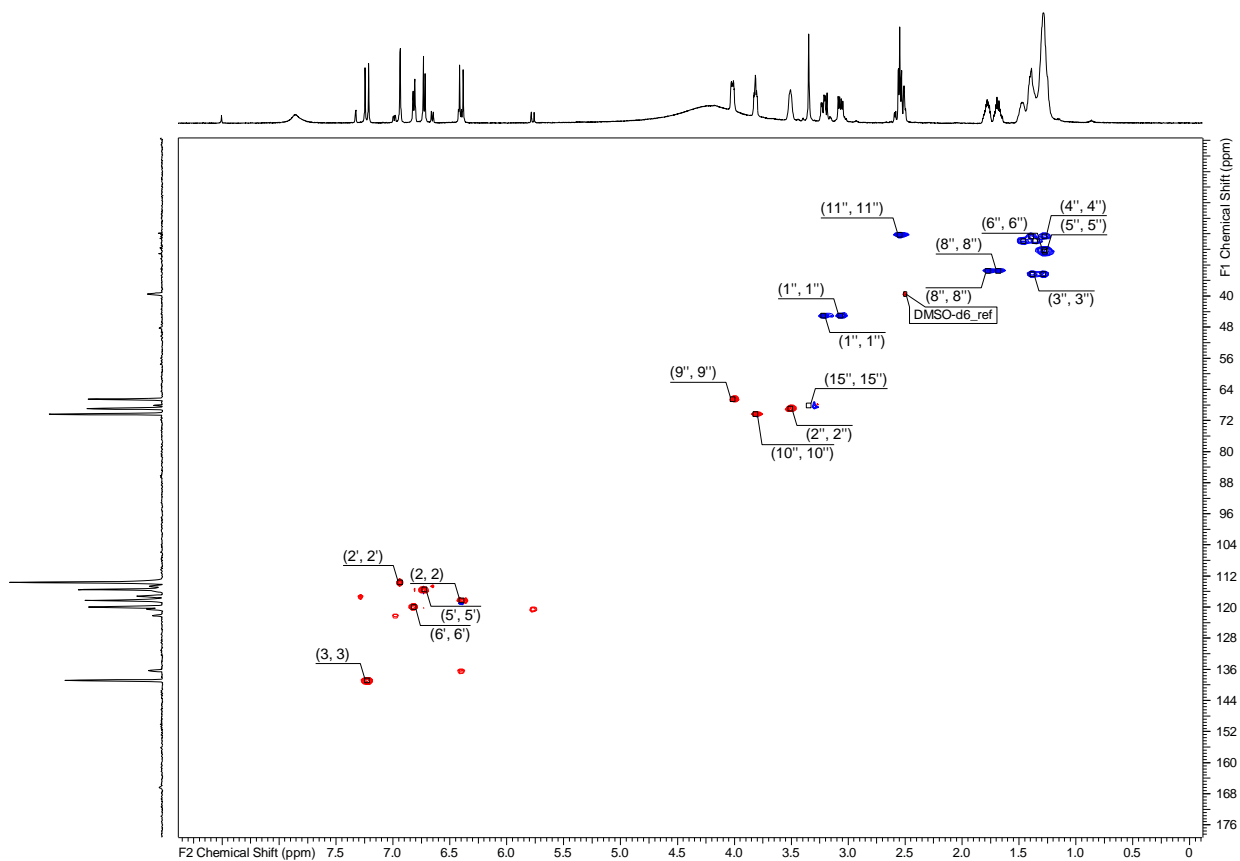




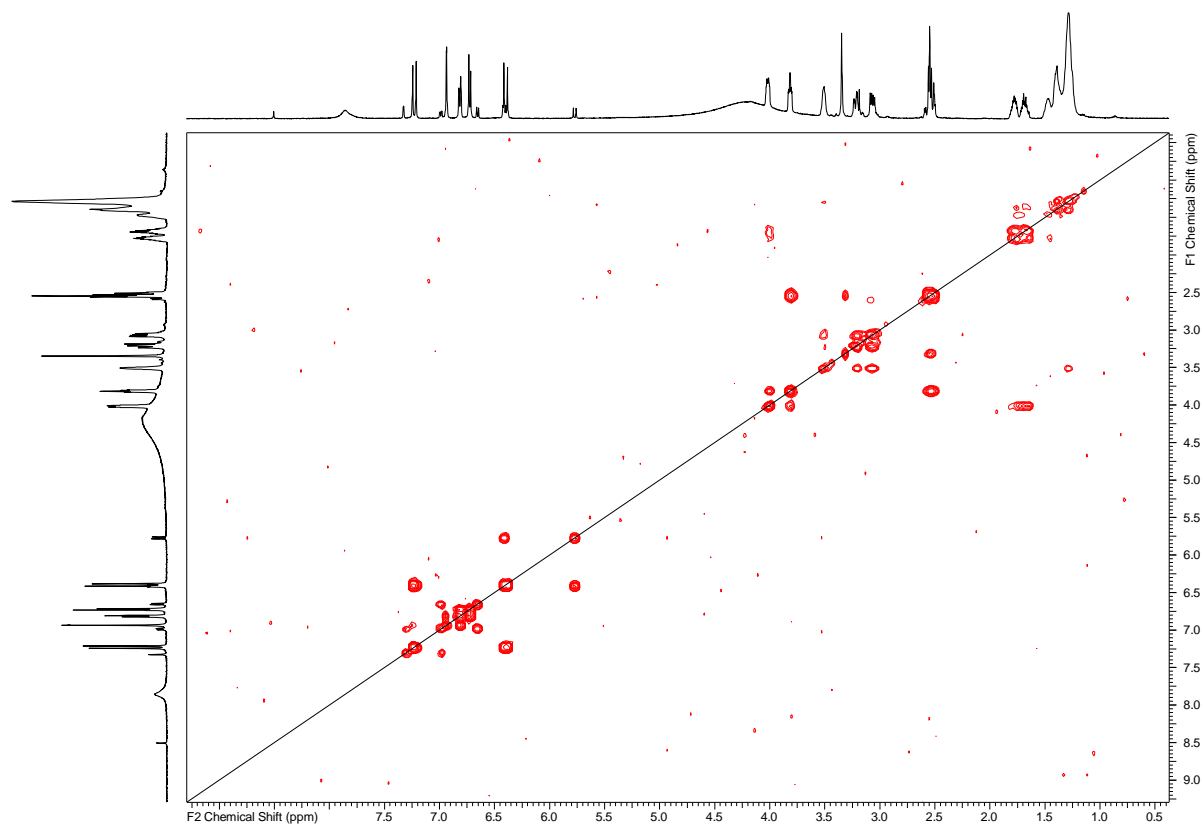
**Figure 60.** HMBC Spectrum of Compound **2** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



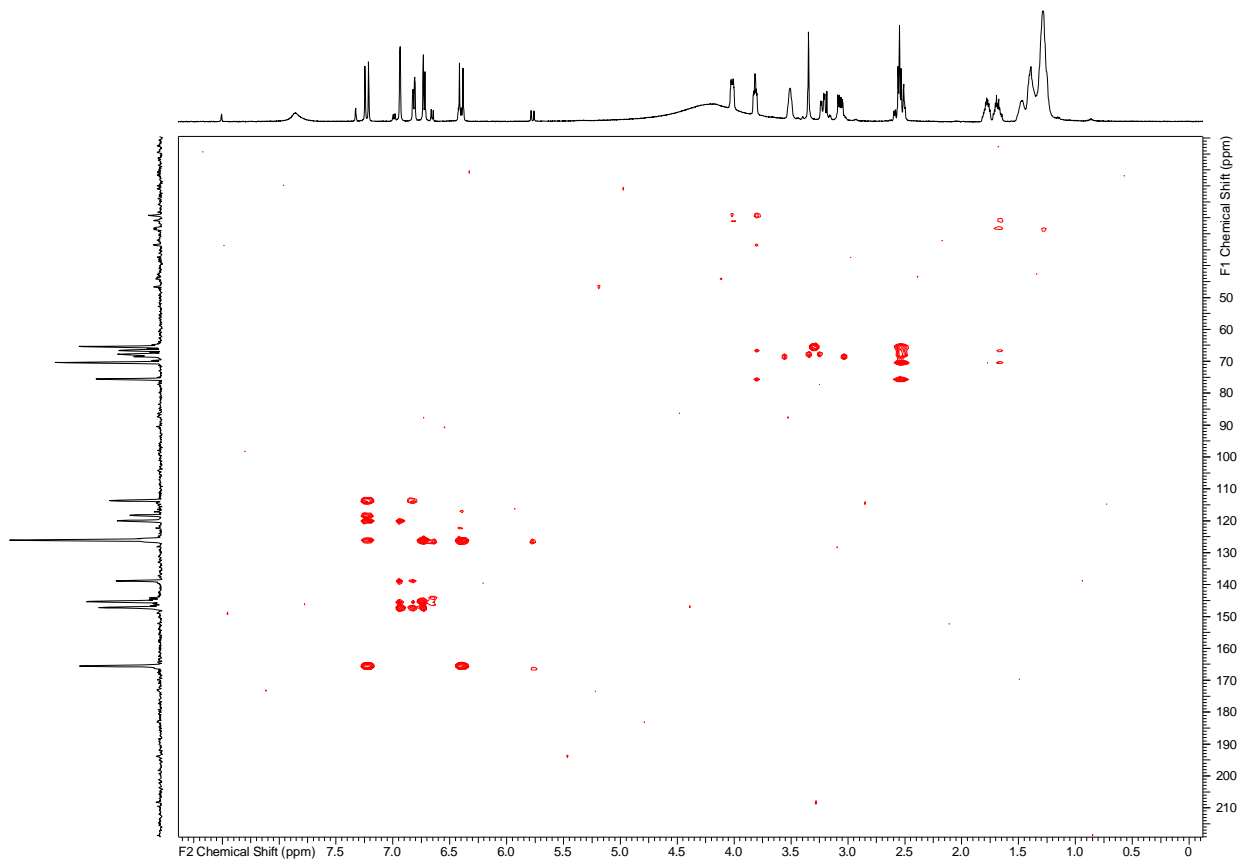
**Figure 61.** <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of Compound 3 (500.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



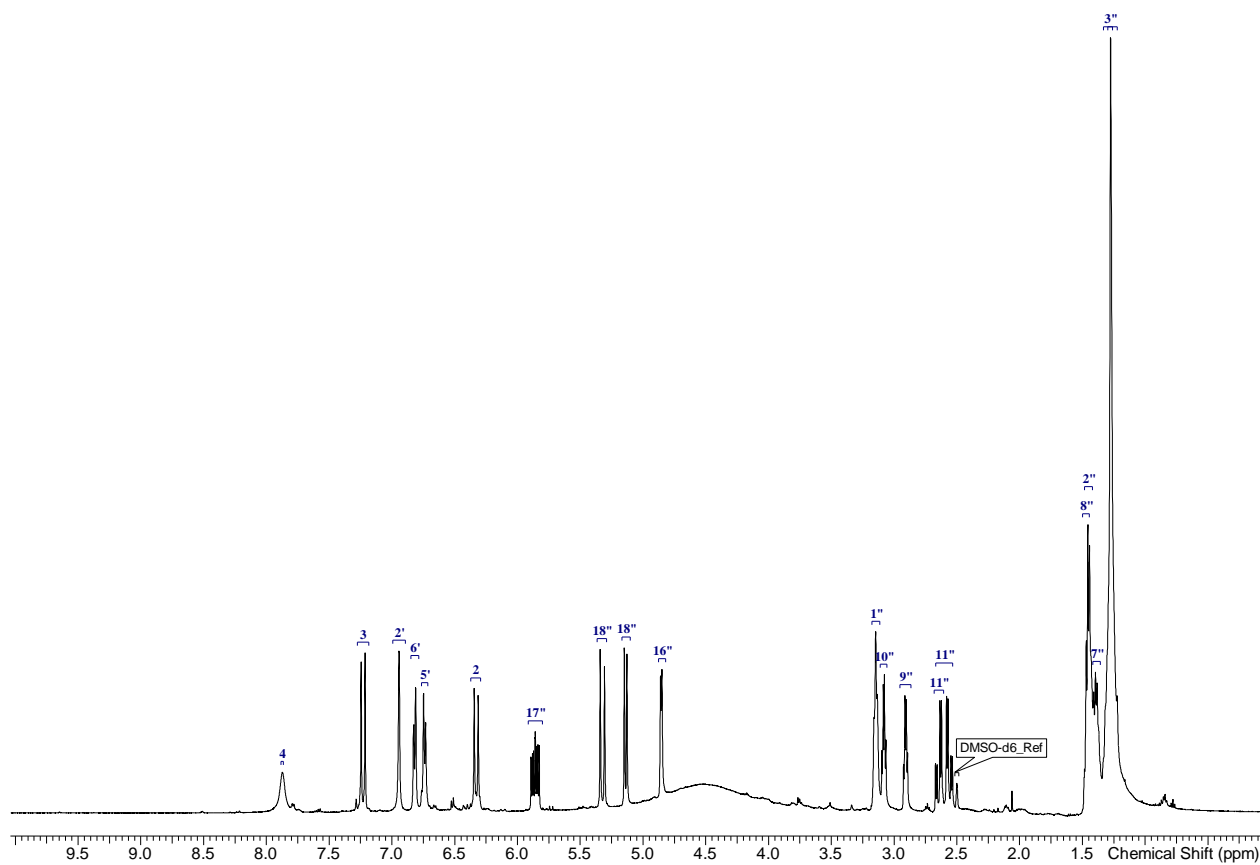
**Figure 62.** HSQC-DEPT Spectrum of Compound **3** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ ).



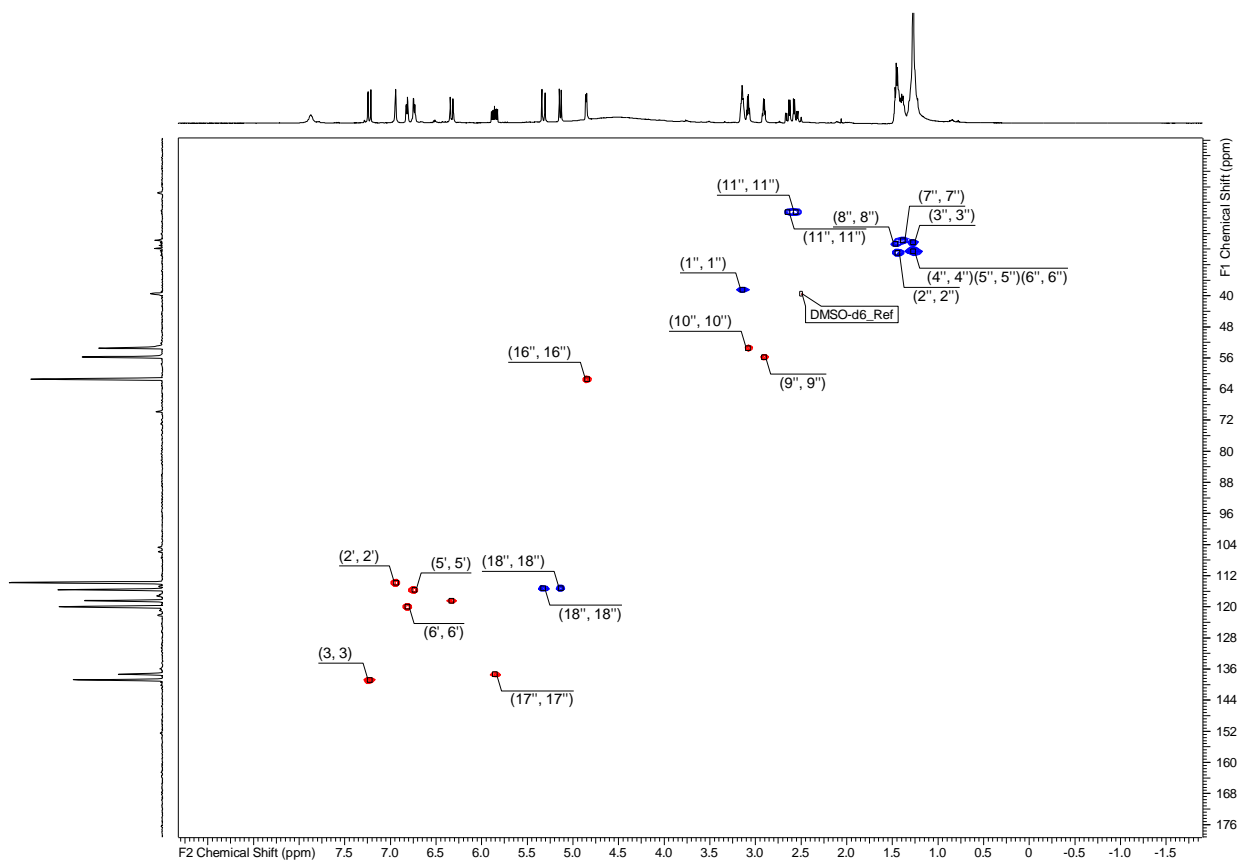
**Figure 63.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spectrum of Compound **3** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



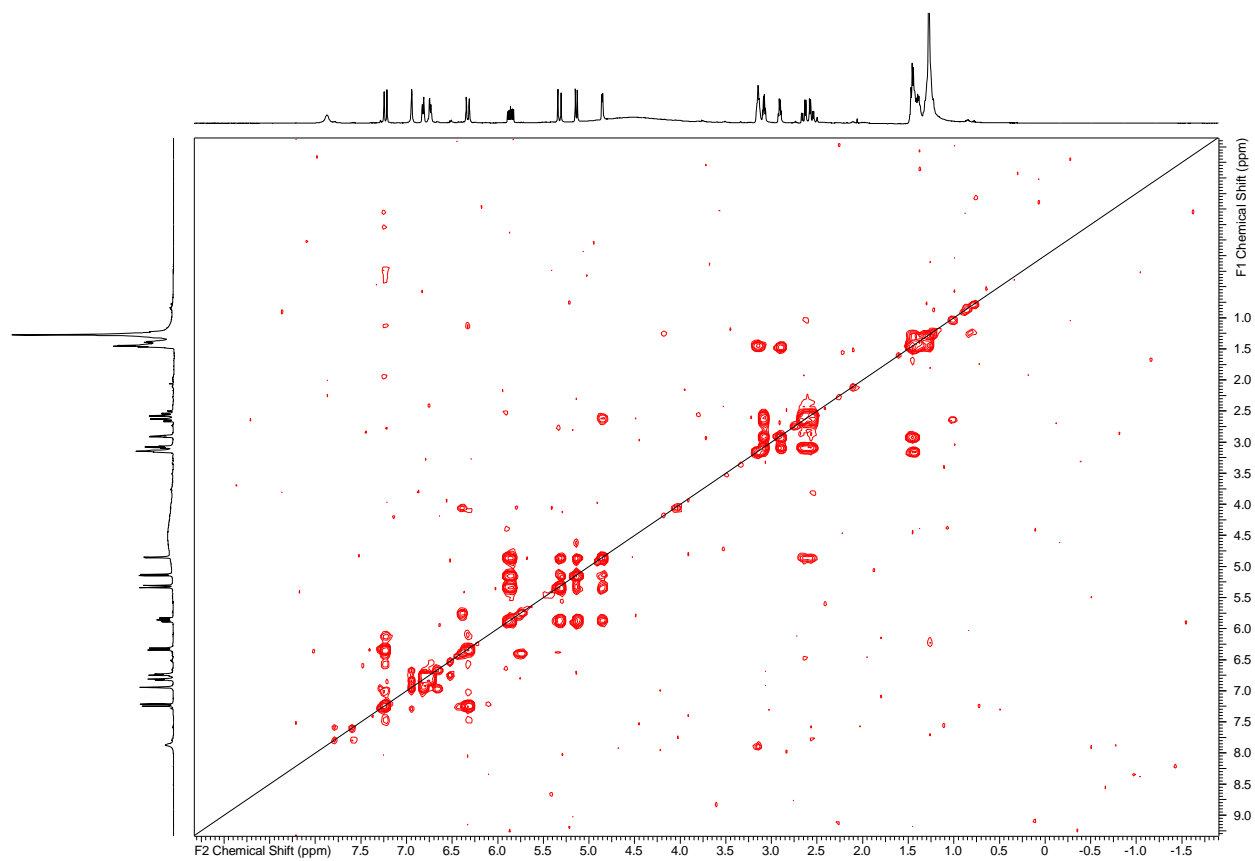
**Figure 64.** HMBC Spectrum of Compound **3** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figure 65.**  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of Compound **4** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

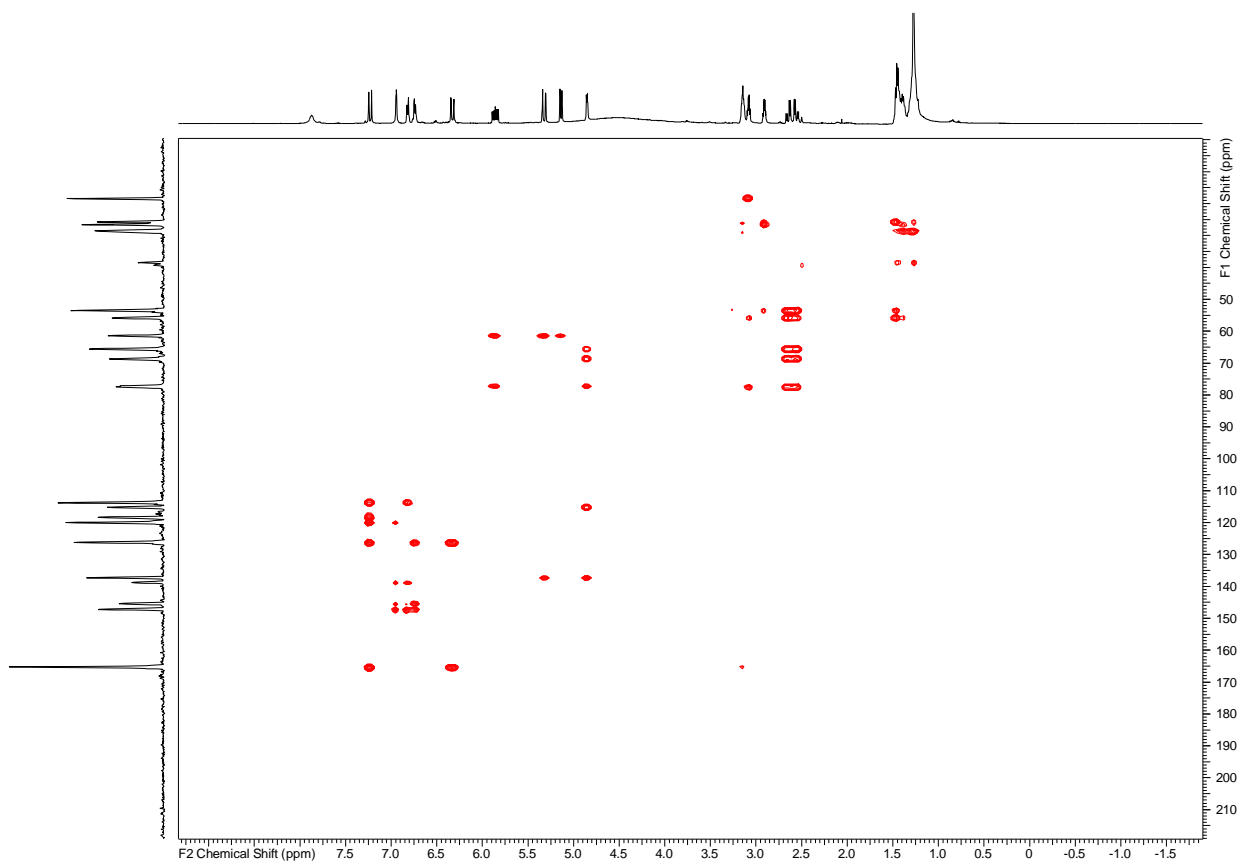


**Figure 66.** HSQC-DEPT Spectrum of Compound 4 (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ ).

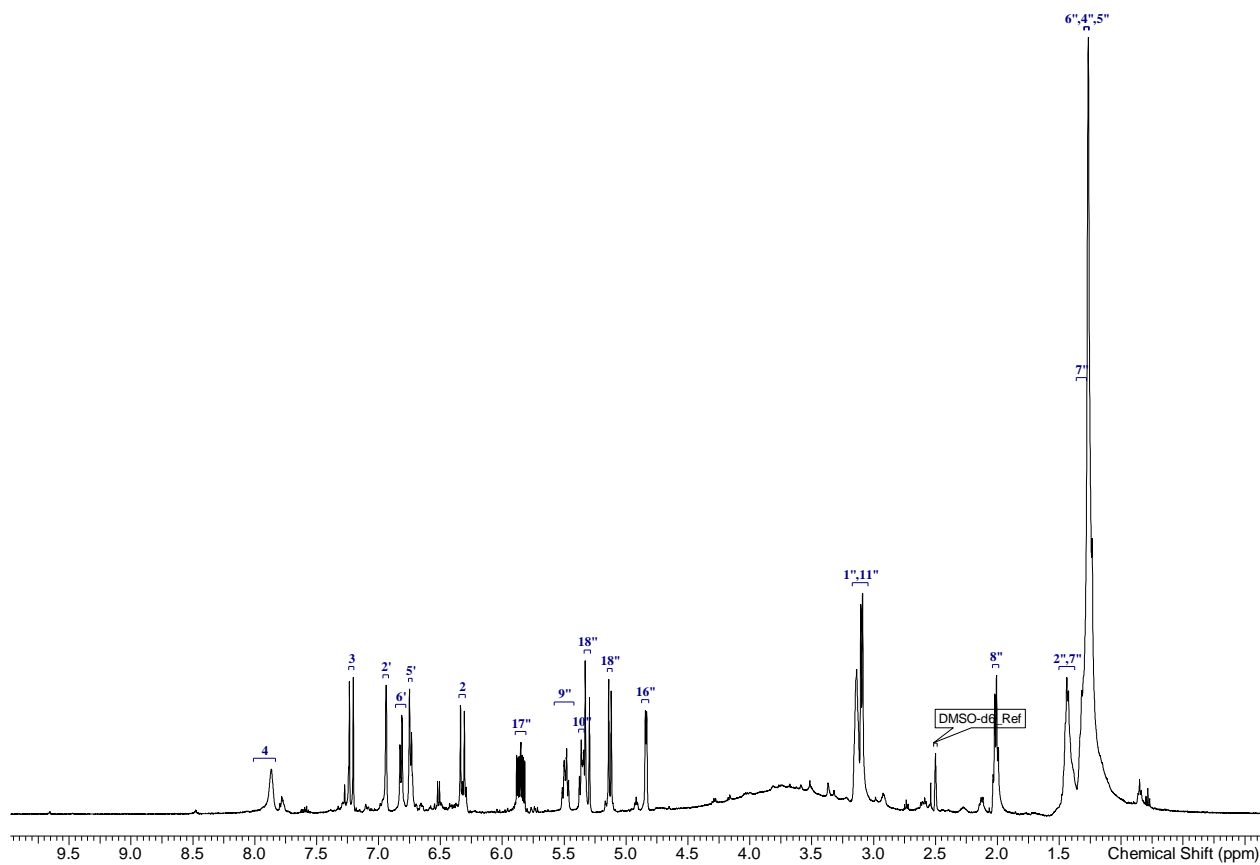


**Figure 67.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spectrum of Compound **4** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

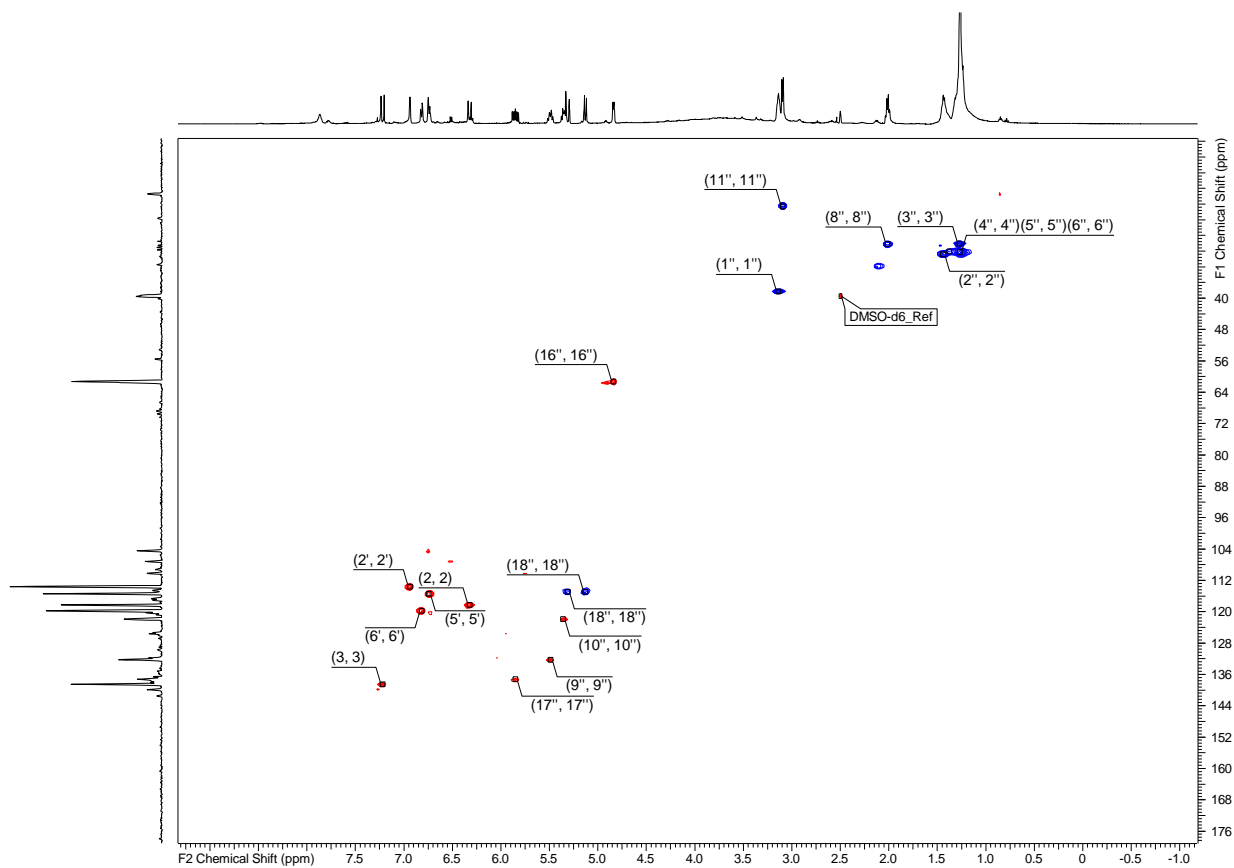




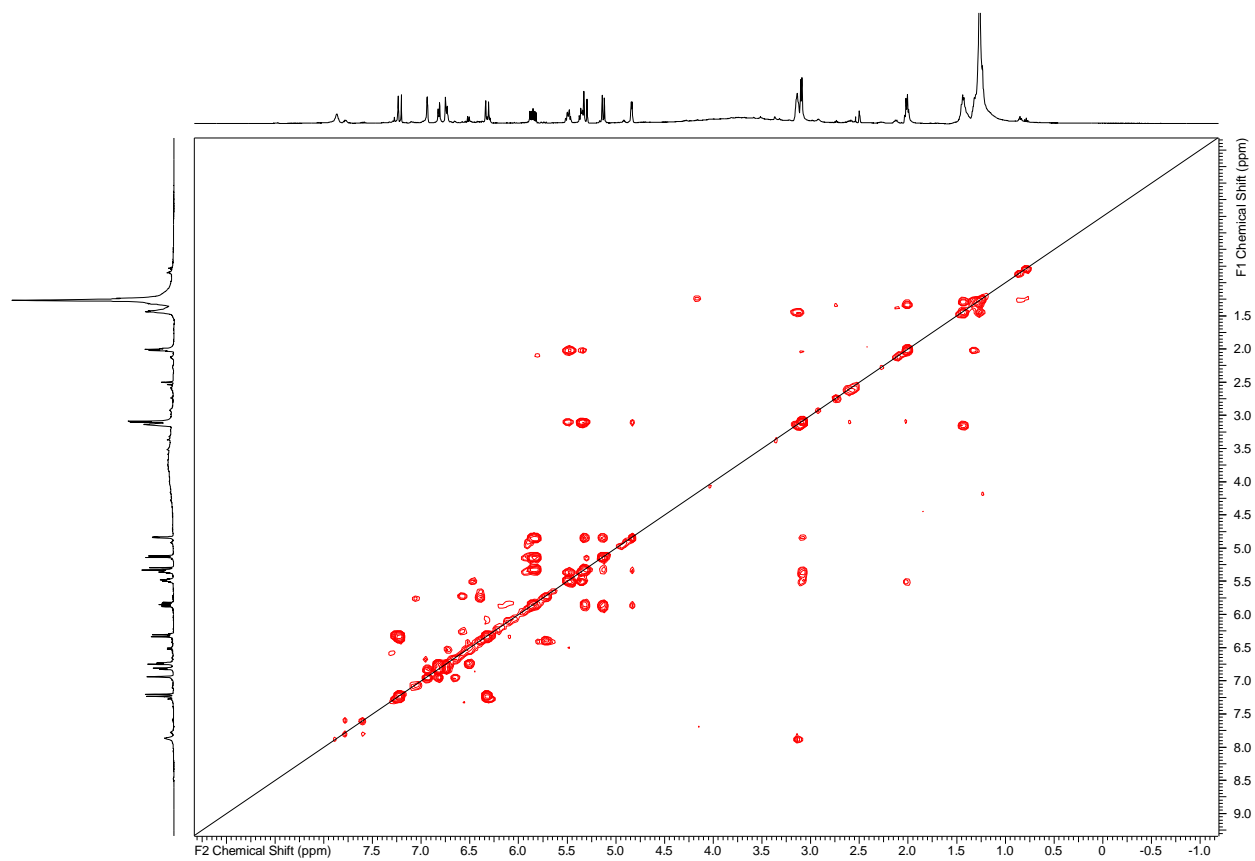
**Figure 68.** HMBC Spectrum of Compound **4** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



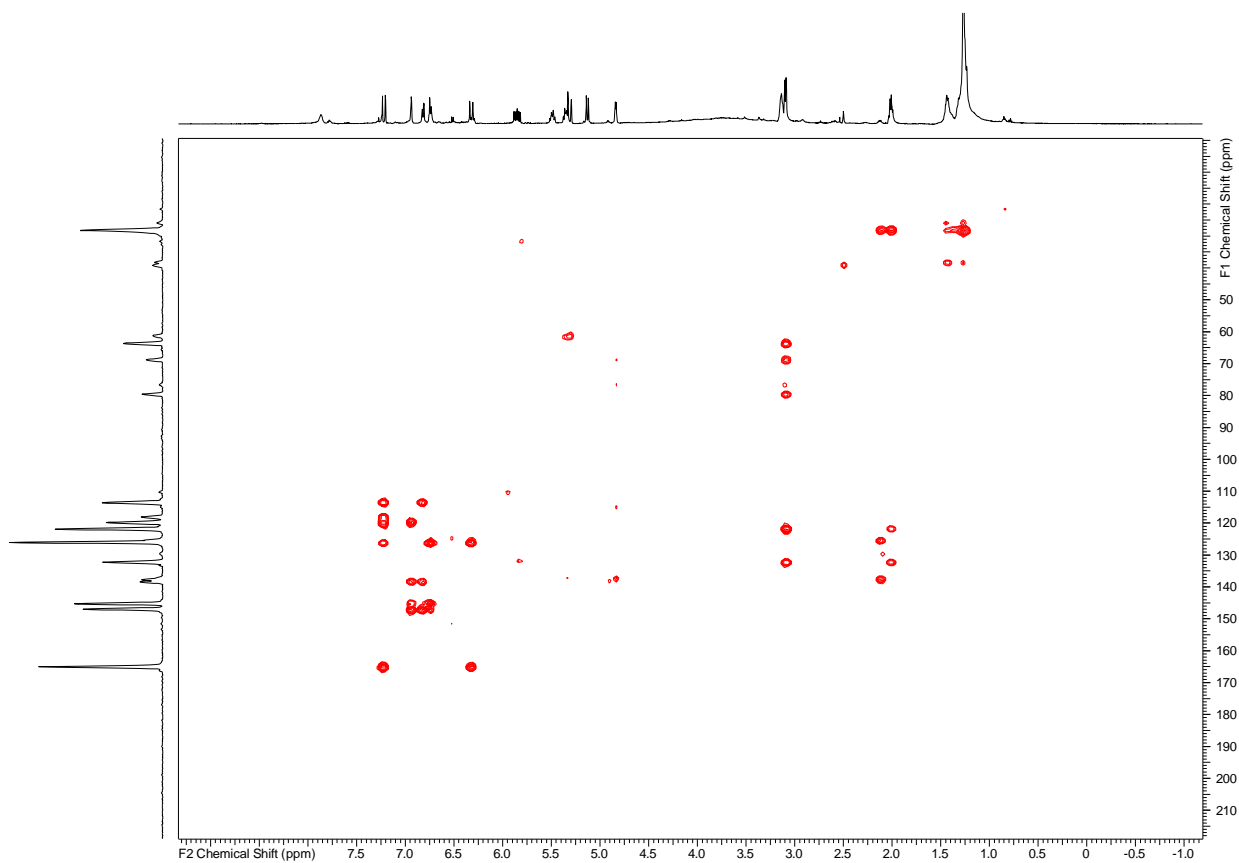
**Figure 69.** <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of Compound 5 (500.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



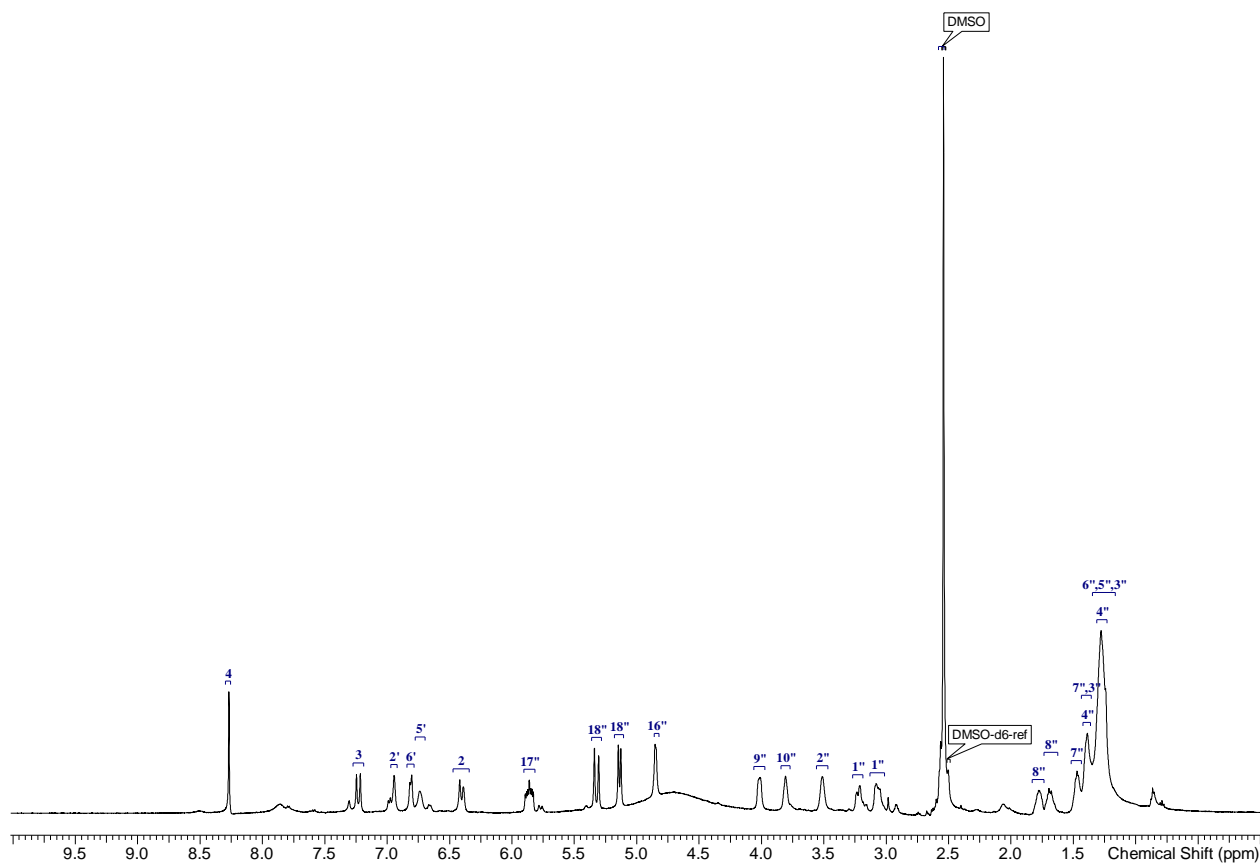
**Figure 70.** HSQC-DEPT Spectrum of Compound **5** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



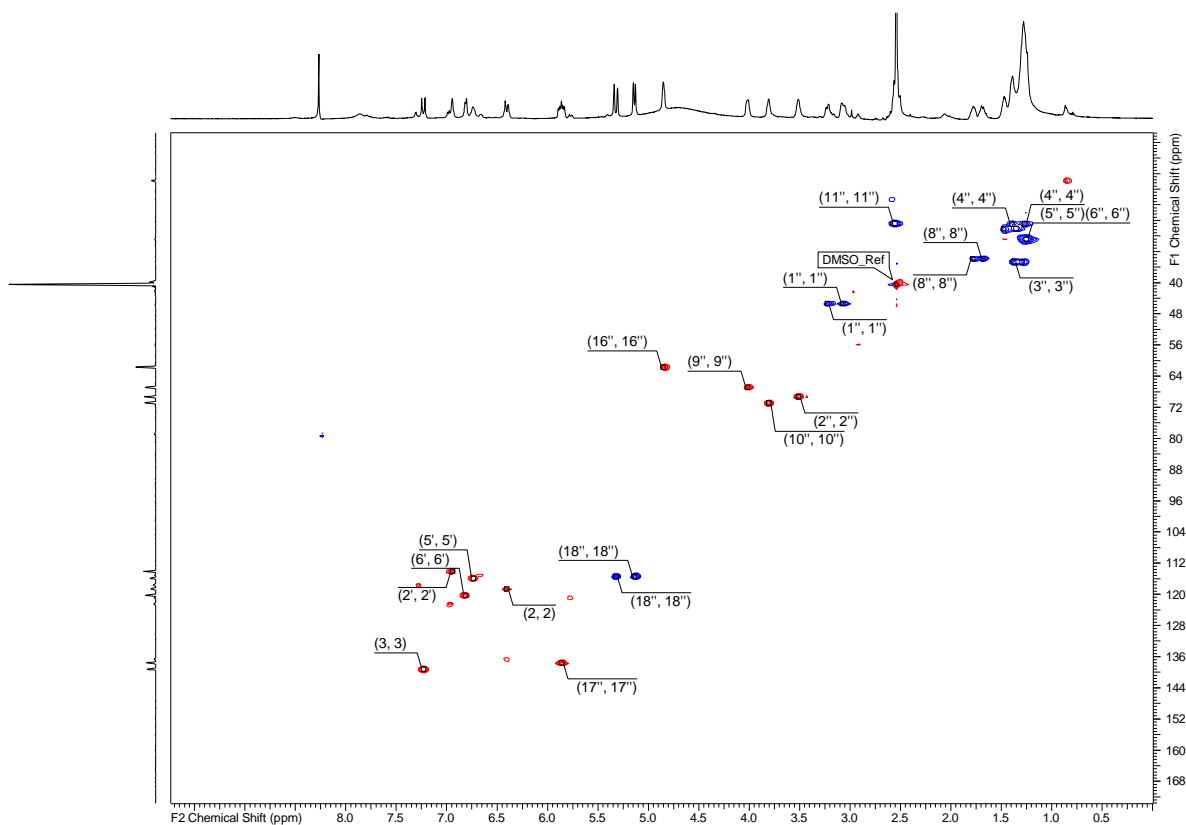
**Figure 71.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spectrum of Compound **5** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



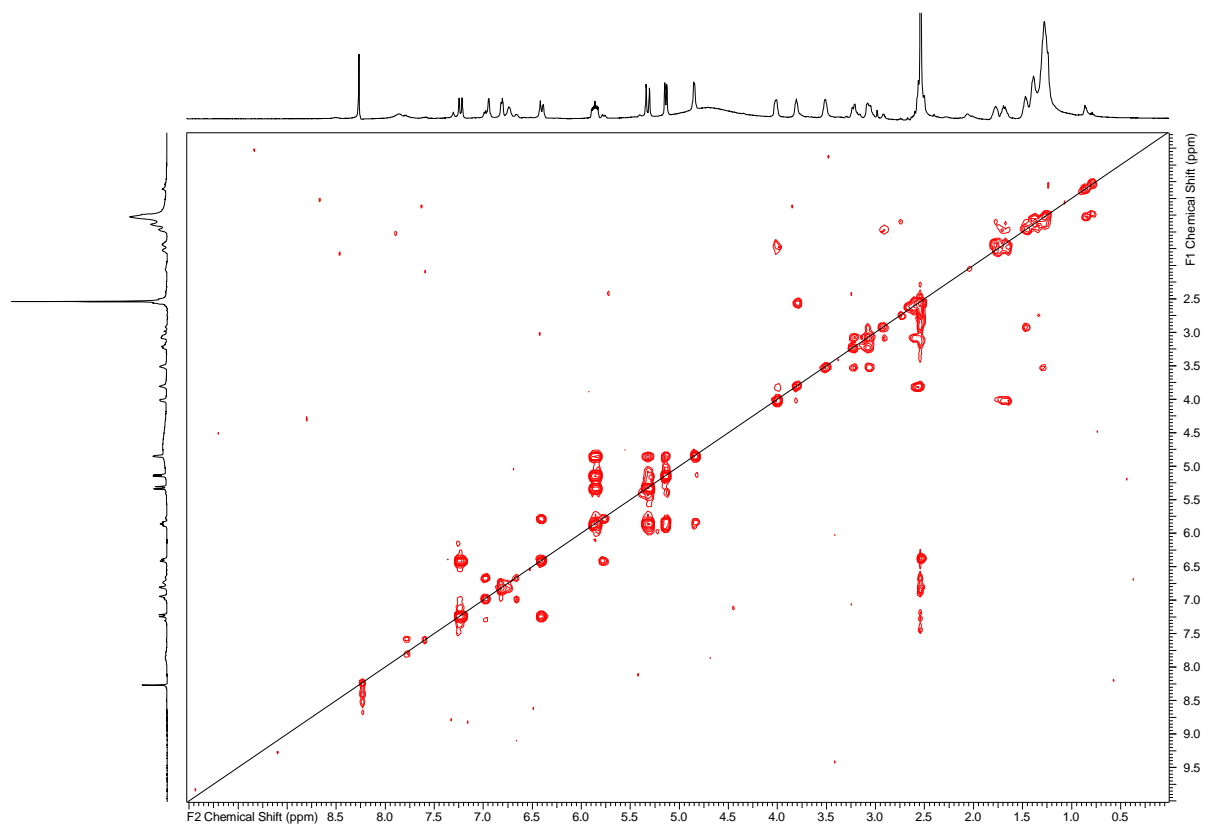
**Figure 72.** HMBC Spectrum of Compound **5** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figure 73.** <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of Compound 6 (500.13 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).

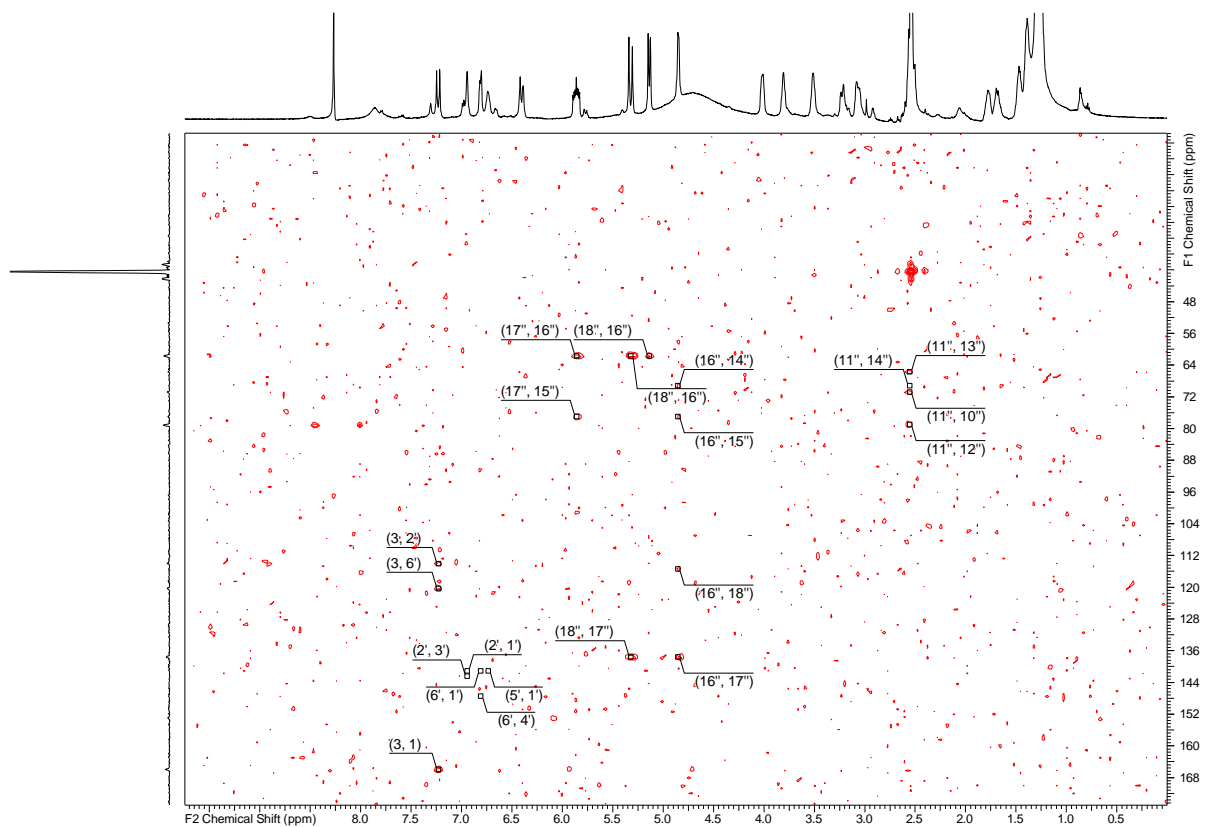


**Figure 74.** HSQC-DEPT Spectrum of Compound **6** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ).



**Figure 75.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY Spectrum of Compound **6** (500.13 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).





**Figure 76.** HMBC Spectrum of Compound **6** (500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ ).

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation de la flore endémique de l'Afrique du Nord, une étude phytochimique sur l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. a conduit à la caractérisation de six nouveaux dérivés d'amide d'acide caféique, cinq flavones connues et quatre lignanes connus. Pour la première fois, notre étude a rapporté l'isolement de composés d'acide caféique attachés à une chaîne acétylénique par une liaison amide.

Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir des fruits des deux espèces : *Cuminum cyminum* L. et *Ammodaucus leucotrichus* L. peuvent être considérées comme une bonne source de monoterpénoïdes, en particulier du  $\gamma$ -terpinen-7-al, du cuminaldéhyde et de la perrilla aldéhyde. En plus, les deux huiles ont montré des caractéristiques antioxydantes et antimicrobienne significatives.

Pour évaluer l'influence de l'origine géographique sur la qualité de l'huile fixe du cumin (*Cuminum cyminum* L.), nous avons étudié la variabilité chimique de six huiles produites dans différentes régions du Maroc. Les résultats obtenus ont montré que la teneur en huile et la composition en tocophérol varient significativement en fonction du lieu de récolte, alors que la teneur en acide pétrosélinique n'a montré aucune variation significative.

L'analyse de la fraction lipidique des fruits de l'espèce *Ammodaucus leucotrichus* L. a montré que cette fraction peut être considérée comme une source importante d'acides gras (acide pétrosélinique), de stérols et de tocophérols.

L'étude de l'huile de grenade (*Punica granatum* L.) a montré que la variété marocaine 'Sefri' contient une forte teneur en huile, avec l'acide punique comme acide gras prédominant. De plus, une teneur considérable en tocophérols et en stérols a été révélée.

**Mots-clés :** Cumin, cumin essoufi, grenade, lipide, huile essentielle, amides de caffeoyle.

## Abstract

As part of the enhancement of endemic flora of north Africa, the present phytochemical study on *Ammodaucus leucotrichus* L. fruits ethyl acetate extract led to the characterization of six new caffeic acid amide derivatives, five known flavones and four known lignans. To our knowledge, this study is the first to report the isolation of caffeic acid compounds attached to an acetylenic chain by an amide band.

Hydrodistilled essential oils obtained from the fruits of *Cuminum cyminum* L. and *Ammodaucus leucotrichus* L., could be considered as an interesting source of monoterpénoid. In addition, both oils have shown significant antioxidant and antimicrobial characteristics.

To assess the impact of geographical origin on the fixed oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.), we studied the chemical variability of six oil produced from different regions in Morocco. Outcomes of this study revealed that the oil content and tocopherol composition varied significantly according to the harvest location.

Analysis of lipid fraction of *Ammodaucus leucotrichus* L. specie fruits, showed that the fruits oil might be considered as an important source of fatty acids (petroselinic acid), sterols and tocopherols.

Pomegranate oil (*Punica granatum* L.) study, showed that the Moroccan variety 'Sefri' contained a high oil content, with punicic acid as the predominant fatty acid. Moreover, a considerable content of tocopherols and sterols has been also revealed.

**Keywords:** Cumin, cumin essoufi, pomegranate, lipid, essential oil, caffeoyl amides.