



THESE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur es Sciences

UFR : Biologie appliquée
Spécialité : Biotechnologies végétales

Présentée par

Hakim ALILOU

**Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du
Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens subsp. odoratus*
(Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC.**

Soutenue le 28 Avril 2012

Devant la Commission du Jury :

A. HATIMI	Professeur, Faculté des Sciences, Agadir	Président
LM. IDRISSE HASSANI	Professeur, Faculté des Sciences, Agadir	Directeur de thèse
M. AKSSIRA	Professeur, FST Mohammeda	Co Encadrant
R. SALGHI	Professeur, ENSA, Agadir	Rapporteur
A. KAHOUADJI	Professeur, Faculté des Sciences Rabat	Rapporteur
F. MSANDA	Professeur, Faculté des Sciences, Agadir	Rapporteur
F. MELLOUKI	Professeur, FST Mohammeda	Examineur
J. TALBI	Laboratoire National de la Police Scientifique Casablanca	Invité

Remerciements

*Ce travail a été effectué au laboratoire de Biotechnologies Végétales (Equipe Planta Sud) à la Faculté des Sciences de l'Université Ibn Zohr d'Agadir, sous la direction des Professeurs **Lalla Mina Idrissi Hassani et Rachida Rouhi**. Je tiens à les remercier vivement pour m'avoir accueilli et pour m'avoir aidé à réaliser ce travail avec rigueur et patience. Leurs qualités scientifiques et humaines et leurs conseils judicieux m'ont été profitables au plus haut point. Je les remercie également de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats dans différents congrès internationaux et à travers plusieurs publications scientifiques.*

*Une grande part de ma reconnaissance s'adresse à Monsieur le Professeur **Mohamed Akssira** pour m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire de Chimie Bio-Organique et Analytique à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Hassan II de Mohammedia ainsi que pour son aide matérielle et scientifique qui m'a permis de mener à bien la partie phytochimique de ce travail. Je le remercie pour son encadrement très précieux, sa disponibilité, ses conseils, son soutien scientifique et moral et pour la confiance qu'il m'a accordée. Qu'il trouve ici ma reconnaissance et tout mon respect.*

*Il est important de signaler que la partie d'identification des molécules majoritaires de la plante *Asteriscus odorus* de ce travail a été soutenu par PROTARS I (P2T2/07) et Junte d'Andalousie, (Consejería de Presidencia, Programa de Cooperación Andalucía-Marruecos, Proyecto AM 32/05). Nous remercions chaleureusement le **Dr A. Ouyahya** pour l'identification de la plante *Asteriscus odorus*.*

*Monsieur **Jalal Talbi**, Docteur au Laboratoire National de la Police Scientifique : je tenais à te remercier chaleureusement pour ton soutien scientifique et moral et ton amitié. Puisses-tu trouver ici ma plus profonde reconnaissance pour tes conseils et ton aide concernant l'étude statistique de ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Bouchra Chebli**, Professeur à l'Ecole Nationale des Sciences Appliquées et au Professeur **Hassan Boubaker** à la Faculté des Sciences d'Agadir pour leur collaboration dans l'identification des champignons testés et le suivi de l'activité antifongique des plantes étudiées.*

Je remercie également Mr le Professeur Abdelhakim Hatimi de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse

Je tiens vivement à remercier Mr les rapporteurs pour leurs contributions:

- *Fouad Msanda, Professeur à la Faculté des Sciences d'Agadir*
- *Rachid Salghi, Professeur à l'Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir*
- *Azzedine Kahouadji, Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat.*

J'adresse ma gratitude au Professeur Fouad Mellouki de la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les enseignants chercheurs du département de Biologie et spécialement ceux du laboratoire de Biotechnologies Végétales.

Toute ma gratitude va enfin à mes parents pour leur soutien tout au long de mes études et durant cette thèse.

En fin, que toutes les personnes qui y ont contribué de près ou de loin trouvent ici ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

Dédicaces

A mes très chers parents

A ma femme Lamia et mon fils Yassir

A ma sœur Nawal

A mes frères : Hanine, Rabi, Abdelhafid et

Mohammed Rida

*A la mémoire de ma grand mère et mon
grand père*

A toute ma famille

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biotechnologies Végétales (Equipe Planta sud). Il s'inscrit dans le cadre de la préparation d'une thèse de Doctorat national. Une partie de ce travail de recherche a été réalisée d'une part, en collaboration avec le laboratoire de Chimie Bio-organique et Analytique de la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia et d'autre part, avec le Département de Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Valence, Espagne.

Ce travail a été motivé par :

- La valorisation des plantes utilisées en lutte intégrée en vue de la formulation des produits biologiques améliorés à base des huiles essentielles ou des extraits des plantes pour lutter contre quelques champignons qui attaquent les fruits et légumes en post récolte.*
- La contribution des plantes pour l'élimination ou la diminution de la contamination en post récolte par des champignons qui nécessitent un traitement chimique difficile à atteindre avec le respect des normes internationales d'exportation.*
- La rareté sur le plan national et international de travaux phytochimiques, pharmacologiques et botaniques sur Asteriscus graveolens subsp. odorus et Asteriscus imbricatus.*

Communications et publications

Publications

1. **Alilou, H.**, Akssira, M., Idrissi Hassani, LM., Chebli, B., El Hakmoui, A., Mellouki, F., Rouhi, R., Boira, H., Blázquez, MA., 2008. Chemical composition and antifungal activity of *Bubonium imbricatum* volatile oil. *Phytopathologia mediterranea*. 47 (1), 3-10.
2. **Alilou, H.**, Rouhi, R., Idrissi Hassani, LM., Akssira, M., 2007. Activité antifongique de *Bubonium odorum* (Asteracées) sur des champignons pathogènes d'agrumes. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 6 (1), 20-24.
3. Akssira, H., Mellouki, F., Salhi, A., **Alilou, H.**, Saouf, A., El Hanbali, F., Arteaga, JF., Barrero, AF., 2006. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens* subsp. *Odorus*. *Tetrahedron Letters*. 47, 6719–6721.
NB : A signaler que le nom de la plante *Nauplius graveolens* a changé en 2010 et qu'elle s'appelle *Astericus graveolens subsp. odorus*.
4. **Alilou H.**, Idrissi Hassani, LM., Rouhi, R., Akssira, M., 2011. Activité antifongique des extraits de quatre Labiées marocaines. *Reviews in Biology and Biotechnology*. (Soumis).

Acte du congrès

1. **Alilou, H.**, Chebli, B., Idrissi Hassani, LM., Rouhi, R., Akssira, M., 2006. *Bubonium odorum* et *Bubonium imbricatum*, plantes endémiques à potentiel antifongique sur *Penicillium digitatum*. Congrès international de Biochimie. Faculté des Sciences Ibn Zohr Agadir. 09-12 Mai.

Communications

a- Communications Orales

1. **Alilou, H.**, Akssira, M., Mellouki, F., Chebli, B., Rouhi, R., Boira, H., Blazquez, MA., Idrissi Hassani, LM., 2009. Composition chimique et activité antifongique d'*Asteriscus imbricatus*. Symposium sur les composés phénoliques «Nutraceutiques ou médicaments ?». Faculté des Sciences Université Ibn Zohr Agadir. 17-18 Décembre.
2. Idrissi Hassani, LM., **Alilou, H.**, Aghelas, F., Chebli, B., 2009. Composition des huiles essentielles et activité antifongique de quelques plantes du Sud marocain. Symposium sur les composés phénoliques «Nutraceutiques ou médicaments ?». Faculté des Sciences Université Ibn Zohr Agadir. 17-18 Décembre.
3. **Alilou, H.**, Idrissi Hassani, LM., Akssira, M., Mellouki, F., Rouhi, R., Boira H., Blázquez MA., Chebli, B., 2008. Antifungal activity and chemical composition of *Bubonium imbricatum* volatile oil. 3ème Symposium International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (SIPAM3) et Congrès International sur les Molécules Bioactives (CIMB1). Faculté des Sciences Oujda. 28-29 Mai.
4. **Alilou H.**, Akssira M., Idrissi Hassani L.M., Mellouki F., Rouhi R., Boira H., Blázquez MA., Chebli, B., 2008. Valorisation de l'huile essentielle par le biais de la composition chimique et l'activité antifongique de *Bubonium imbricatum*. Deuxième congrès national, Amélioration de la Production Agricole (APA). FST-Settat. 03-04 Avril.
5. **Alilou H.**, Idrissi Hassani, LM., Rouhi, R., Akssira, M., 2007. Valorisation de quatre plantes marocaines par le biais de leur activité antifongique. 3ème Journée Scientifique Nationale « ENVIRONNEMENT et SANTE », FST Mohammedia. 15 Novembre.
6. **Alilou, H.**, Chebli, B., Idrissi Hassani, LM., Rouhi, R., Akssira, M., 2006. *Bubonium odorum* et *Bubonium imbricatum*, plantes endémiques à potentiel antifongique sur *penicillium digitatum*. Congrès International de Biochimie. Agadir. 9-12 Mai.
7. **Alilou, H.**, Idrissi Hassani, LM., Rouhi, R., Chebli, B., Akssira, M., 2006. *Bubonium odorum* : potentialité phytochimique et antifongique sur *penicillium digitatum*. Troisième rencontre scientifique des étudiants chercheurs de la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia. Mohammedia. 21 Avril.

8. **Alilou, H.**, Idrissi Hassani, LM., Rouhi, R., Chebli, B., Akssira M., 2006. Etude phytochimique et antifongique d'une plante endémique : *Bubonium odorum*. Deuxième Journée Scientifique Nationale « Environnement et Santé » Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia. Mohammedia. 29 Novembre.

b- Communications affichées

1. **Alilou, H.**, Idrissi Hassani, LM., Akssira, M., Rouhi, R., 2006. Étude phytochimique de quelques *Asteraceae* caractérisant la région du Sud du Maroc. Deuxième Symposium Internationale Sur Les Plantes Aromatiques et Médicinales. Faculté des Sciences Semlalia. Marrakech. 14-16 Septembre.
2. **Alilou, H.**, Idrissi Hassani, LM., Rouhi, R., Akssira, M., Chebli, B., 2006. Activité antifongique des extraits de feuilles et de fleurs de *Bubonium odorum* contre la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Deuxième Symposium Internationale Sur Les Plantes Aromatiques et Médicinales. Faculté des Sciences Semlalia. Marrakech. 14-16 Septembre.
3. Idrissi Hassani, LM., **Alilou, H.**, Chebli, B., Rouhi, R., Akssira, M. 2006. *Bubonium odorum*, *Bubonium imbricatum* et *Cladanthus arabicus* et leur effet sur la croissance mycélienne du champignon *Penicillium digitatum*. Congrès international de Biochimie. Faculté des Sciences Ibn Zohr Agadir. 09-12 Mai.
4. **Alilou, H.**, El Hanbali, F., Saouf, A., Elhakmaoui, A., Mellouki, F., Akssira, M., 2005. Utilisation des techniques RMN 2d dans la détermination de structure de produits naturel, cas des humulenolides. 1er Congrès International de Modélisation Moléculaire « CIMM 2005 ». « Modélisation Moléculaire à l'Interface de la Chimie, de la Physique et de la Biologie Applications Industrielles. Casablanca. 23-25 Novembre.
5. Akssira, M., Mellouki, F., Aitigri, M., El Hanbali, F., Ait Abdallah Oulmokhtar, S., **Alilou, H.** 2005. Elucidation structurale par RMN du constituant majoritaire de l'huile essentielle de l'*Anvillea radiata* coss et dur. 1er Congrès International de Modélisation Moléculaire « CIMM 2005 ». « Modélisation Moléculaire à l'Interface de la Chimie, de la Physique et de la Biologie Applications Industrielles Casablanca. 23-25 Novembre.

6. **Alilou, H.**, Chebli, B., Rouhi, R., Idrissi Hassani, LM., 2005. Activité antifongique des extraits de quelques *Asteraceae* contre la croissance mycélienne des champignons pathogènes des agrumes en post récolte. Atelier "Les biotechnologies au maroc. État des lieux et domaines prioritaires". Settat, Faculté des sciences et techniques. 6 Mai.
7. **Alilou, H.**, Rouhi, R., Idrissi Hassani, LM., 2005. Les polyphénols du *Bubonium odorum*. Faculté des sciences Ibn Zohr d'Agadir, Semaine de la science. 23-27 Mars.
8. **Alilou, H.**, Boubaker, H., Rouhi, R., Heimeur, N., Chebli, B., Idrissi Hassani, LM., 2005. Effet des extraits de trois plantes médicinales sur la croissance mycélienne du champignon : *Penicillium expansum*. Congrès international sur les plantes médicinales. Errachidia. 16-19 Mars 2005.
9. **Alilou, H.**, Idrissi Hassani, LM., Boubaker, H., Rouhi, R., 2005. Prospection de l'activité antifongique de plantes médicinales de la région sud marocaine. Les journées Biologie et Santé de Casablanca. 15-16 Décembre.
10. **Alilou, H.**, Chebli B., Rouhi R., Idrissi Hassani, LM., 2005. Inhibition of *Penicillium digitatum* mycelial growth by some *Asteraceae* extracts characterizing the region of the south of Morocco. Sixth International Conference of the SFRR-AFRICA. Faculté des Sciences Université Abdelmalek Essaâdi, Tetouan. 26-29 Septembre.

Liste des figures

Figure 1 : Exportations totales des huiles essentielles en poids et en valeurs (Office des Changes, 2006)

Figure 2 : Poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan (Porter, 2001)

Figure 3 : Glande simple d'origan, entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800×) (Sharma et *al.*, 2003)

Figure 4 : Structure de α -santonine

Figure 5 : Structure des Guaianolide chlorojanerin (I) et l'eudesmanolide malacitanolide (II)

Figure 6 : Principaux squelettes de lactones sesquiterpéniques via un germacranolide

Figure 7 : Condensations tête à queue des unités en C₅

Figure 8 : Biosynthèse des germacranolides à partir des unités acétate via l'acide mévalonique

Figure 9 : Différentes voies de biogenèse du cycle γ -lactonique

Figure 10 : Formation des érémodiolides à partir de furanocéramides.

Figure 11 : Synthèse de l'isabeline par Wender et *al.*, (1980)

Figure 12 : Synthèse de la zempoaline A et B par Bartel et Bohlmann (1989)

Figure 13 : Photo d'un buisson d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* prise dans la région d'Agadir

Figure 14 : Photo d'une fleur d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* prise dans la région d'Agadir

Figure 15 : Photo des plantes d'*Asteriscus imbricatus* prise dans la région de Cap Ghir (à 60 km au Nord d'Agadir)

Figure 16 : Photo d'un buisson d'*Asteriscus imbricatus* prise dans la région de Cap Ghir

Figure 17 : Fraises infectées par *Botrytis cinerea* (Ajouz, 2009)

Figure 18 : Cycle biologique de *Botrytis cinerea* (Gindro, 2000).

Figure 19 (A) : Photographies prises au microscope électronique des conidies sur un conidiophore (Gindro, 2000)

Figure 19 (B) : Photographies prises au microscope électronique des Conidiophore ramifié (Gindro, 2000)

Figure 20 : Clémentine infectée par *Penicillium digitatum* (Taqaarort, 2008)

Figure 21 : Différents stades de la pourriture verte sur fruits d'agrumes (Taqaarort, 2008)

Figure 22 : Fruits de pommes infectées par *Penicillium expansum* (Roussel et *al.*, 2007)

Figure 23 : Feuilles et fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*

Figure 24 : Feuilles et fleurs d'*Asteriscus imbricatus*

Figure 25 : Schéma explicatif de l'étude spectroscopique des flavonoïdes, des acides phénols, des anthocyanes et des aglycones majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Figure 26 : Protocole d'extraction des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Figure 27 : Fractionnement de l'extrait organique neutre d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Figure 28: Spectre d'absorption du composé B₁ isolé de l'extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Figure 29 : Structure de l'acide caféique

Figure 30 : Spectre d'absorption du composé B₂ isolé de l'extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*.

Figure 31 : Structure de la névadensine

Figure 32 : Spectre d'absorption du composé B₁ de l'extrait *Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Figure 33 : Structure de la lutéoline

Figure 34 : Spectre d'absorption du composé B₂ de l'extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Figure 35 : Structure d'artémétine

Figure 36 : Spectre d'absorption du composé B₃ de l'extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Figure 37: Spectre d'absorption du composé B₃ de l'extrait d'*Asteriscus imbricatus*

Figure 38 : Cinétique de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*.

Figure 39 : Cinétique de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*

Figure 40 : Cinétique de l'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Figure 41 : Structure partielle et les corrélations HMBC du composé C₁

Figure 42 : Corrélations NOESY du composé C₁

Figure 43 : Structure de naupliolide : 14,15-diméthyl-7,13-dioxotricyclic[6.4.0.0^{9,11}]dodéca-12,13-olide

Figure 44 : Structure de 6,7,9,10-tétrahydroasteriscunolide

Figure 45 : Structure des sesquiterpènes lactones isolés d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

Figure 46: Voies de biosynthèse du composé 1 (C1) : naupliolide

Figure 47 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits des feuilles de *Asteriscus graveolens subsp. odor*

Figure 48 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

Figure 49: Test antifongique de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* contre la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*

Figure 50: Test antifongique de l'extrait éther de pétrole des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* contre la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*

Figure 51 : Efficacité des extraits sur *Penicillium digitatum*, en fonction des organes d'extraction d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* (feuilles et fleurs)

Figure 52 : Efficacité des extraits sur *Penicillium expansum*, en fonction des organes d'extraction d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* (feuilles et fleurs)

Figure 53 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits de l'appareil végétatif d'*Asteriscus imbricatus*

Figure 54 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits de l'appareil végétatif d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* et d'*Asteriscus imbricatus*

Figure 55 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant 7 jours d'incubation

Figure 56 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant 7 jours d'incubation

Figure 57 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant 7 jours d'incubation

Figure 58 : Activité antifongique *in vivo* de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant 3, 5, 7 et 10 jours d'incubation sur *Penicillium digitatum*

Figure 59 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation

Figure 60 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation

Figure 61 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation

Figure 62 : Activité antifongique *in vivo* de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 3, 5, 7 et 10 jours d'incubation sur *Penicillium digitatum*.

Figure 63 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 64 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 65 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 66 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 67 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 68 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 69 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 70 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Figure 71 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation

Figure 72 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation

Figure 73 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation

Figure 74 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau illustrant les composants du marché mondial des huiles essentielles (ANIMA, 2005)

Tableau 2 : Distribution des différents types de sesquiterpènes lactones qui existent dans les différentes tribus de la famille des Composées

Tableau 3 : Hauteur de la mousse pour les extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Tableau 4 : Indices de mousse sur les extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats des tests de caractérisation des quinones libres dans les extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Tableau 6 : Teneurs en flavonoïdes, en anthocyanes et en aglycones des extraits des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Tableau 7 : Caractéristiques chromatographiques de l'extrait des feuilles d'*Asteriscus imbricatus* après migration dans l'acide acétique 2%

Tableau 8 : Caractéristiques chromatographiques de l'extrait des feuilles d'*Asteriscus imbricatus* après migration dans l'acide acétique 60%

Tableau 9 : Différents groupes des métabolites secondaires existants chez les feuilles et les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Tableau 10 : Récapitulation des comportements spectroscopiques des molécules identifiées des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Tableau 11 : Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Tableau 12 : Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Asteriscus imbricatus*

Tableau 13 : Spectres ^1H RMN et ^{13}C RMN DEPT du composé C1 (CDCl_3 , TMS)

Tableau 14 : Spectres ^1H RMN et ^{13}C RMN DEPT du composé C2 (CDCl_3 , TMS)

Tableau 15: Données spectrales ^1H -RMN des asteriscunolides 3a, 3b, 3c et 3d

Tableau 16 : Données spectrales ^{13}C -RMN des asteriscunolides 3a, 3b, 3c et 3d

Tableau 17 : Rendement des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* après extraction par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le méthanol

Tableau 18 : Pourcentage d'inhibition des extraits d'*Asteriscus imbricatus* contre *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*

Tableau 19 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 20 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 21 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jour d'incubation

Tableau 22 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* en utilisant les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*

Tableau 23 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* en utilisant les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*

Tableau 24 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 25 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 26 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 27 : Effet de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* en fonction de l'infection sur des clémentines par les spores de *Penicillium digitatum*

Tableau 28 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en en fonction des différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*

Tableau 29 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 30 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 31 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 32 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en utilisant les différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

Tableau 33 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 34 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 35 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 36 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en utilisant les différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

Tableau 37 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 38 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 39 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 40 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en utilisant les différentes concentrations des produits majoritaires de huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

Tableau 41 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 42 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation

Tableau 43 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Résumé

Introduction générale et objectifs.....1

A- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Introduction.....	4
II- Huiles Essentielles (HE)	5
III- Activités biologiques des extraits des plantes.....	11
IV- Métabolites secondaires.....	12
V- Plantes étudiées.....	25
VI- Champignons étudiés.....	30

B- MATERIEL ET METHODES

I- Matériel végétal.....	39
II- Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des métabolites secondaires d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odorus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i>	40
III- Extraction et analyse des l'huiles essentielles d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odorus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i>	47
IV- Extraction, séparation, purification et identification des lactones sesquiterpéniques majoritaires d' <i>Asteriscus odorus</i>	48
V- Activité antifongique des extraits d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odorus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i> sur la croissance mycélienne de <i>Penicillium digitatum</i> et <i>Penicillium expansum</i>	51
VI- Activité antifongique des huiles essentielles et des produits purs d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odorus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i> sur la croissance mycélienne de <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium expansum</i> et <i>Botrytis cinerea</i>	53

C- RESULTATS ET DISCUSSIONS

C-1- PREMIERE PARTIE : Étude phytochimique d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*

CHAPITRE I : Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*

I- Introduction.....	55
----------------------	----

II- Screening phytochimique des extraits des feuilles et des fleurs d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i>	55
III- Dosage et caractérisation spectroscopique des flavonoïdes des extraits des feuilles d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i>	58
IV- Evaluation des potentialités des plantes étudiées à la lumière des composés révélés suite au screening et à la caractérisation phytochimique.....	64
V- Conclusion.....	67

CHAPITRE II : Composition chimique des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

I- Introduction.....	68
II- Etude de la cinétique d'extraction et de la composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Asteriscus odoratus</i>	68
III- Etude de la cinétique d'extraction et de la composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	72
IV- Comparaison de la cinétique d'extraction et de la composition chimique des huiles essentielles d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i>	75
V- Conclusion.....	77

CHAPITRE III : Extraction, séparation, purification et identification des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

I- Introduction.....	79
II- Identification des lactones sesquiterpéniques majoritaires d' <i>Asteriscus odoratus</i>	79
III- Conclusion.....	87

C-2- DEUXIEME PARTIE : Étude antifongique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

CHAPITRE I : Activité antifongique des extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*

I- Introduction.....	88
II- Rendement des extraits des feuilles et des fleurs d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i>	88
III- Etude de l'activité antifongique des extraits des feuilles et des fleurs d' <i>Asteriscus odoratus</i>	89

IV- Etude de l'activité antifongique des extraits de l'appareil végétatif d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	93
V- Comparaison de l'effet antifongique des extraits d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odor</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i>	95
VI- Conclusion.....	96
CHAPITRE II : Activité antifongique des huiles essentielles d'<i>Asteriscus graveolens subsp. odor</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i> sur la croissance mycélienne de <i>Penicillium digitatum</i>, <i>Penicillium expansum</i> et <i>Botrytis cinerea</i>	
I-Introduction.....	98
II- Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Asteriscus odor</i>	99
III- Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	106
IV- Conclusion.....	112
CHAPITRE III : Activité antifongique des produits purs d'<i>Asteriscus graveolens subsp. odor</i> et <i>Asteriscus imbricatus</i> sur la croissance mycélienne de <i>Penicillium digitatum</i>, <i>Penicillium expansum</i> et <i>Botrytis cinerea</i>	
I- Introduction.....	114
II- Activité antifongique des produits purs d' <i>Asteriscus odor</i>	114
III- Activité antifongique des produits purs des huiles essentielles d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	128
IV- Conclusion.....	133
D- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	135
E- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	149
F- ANNEXES.....	171

Liste des abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince.
COSY : Correlation spectroscopy.
HSQC : Heteronuclear single quantum correlation.
HMBC : Heteronuclear multiple bond correlation.
RMN: Résonance magnétique nucléaire.
UV : Ultra violet
IR : Infra-rouge
PAM : Plantes aromatiques et médicinales
HE : Huile essentielle
FPP : Farnesylpyrophosphate
DPA : Diphenylamine
HCEFLD : Haut commissariat aux eaux et à la lutte contre la désertification
DMSO : Diméthylesulfoxyde
NEU : 2-aminoéthyl-diphénylborate
Rf : Références frontales
GC-MS : Chromatographie couche mince couplée à la spectrométrie de masse
PDA : Potato-Dextrose-Agar
ANOVA : Analyse de variance
PI : Pourcentage d'inhibition
μl : Microlitre
KI : Indices de Kovats
PD : *Penicillium digitatum*
PE : *Penicillium expansum*
BC : *Botrytis cinerea*
AcOEt : Acétate d'éthyle
MeOH : Méthanol
MS : Spectrométrie de masse.
S : Singulet.
d : Doublet.
m : Multiplet.
q : Quadruplet.
t : Triplet.
dd : Doublet de doublet.
ppm : Parties par millions.
Me : Méthyle.
CC : Chromatographie sur colonne.

Résumé

Ce travail s'intéresse à l'étude phytochimique et à l'activité antifongique de deux espèces du Sud du Maroc appartenant à la famille des *Asteraceae* : *Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*.

La partie phytochimique effectuée pour la première fois a pour objectif principal l'extraction, la séparation, la purification et la caractérisation par les différentes méthodes spectroscopiques de la structure chimique des flavonoïdes et des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*.

Le screening phytochimique des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* a révélé la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des terpènes, des coumarines et des composés cyanogénétiques. Quand aux saponines et les quinones libres, ils sont présents dans les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* et ils sont absents dans les feuilles des deux plantes. La caractérisation des molécules par spectrophotométrie UV a révélé la présence de l'acide caféique, névadensine, lutéoline et artemétine dans les feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*. Quant aux feuilles d'*Asteriscus imbricatus*, on note la présence de l'artémétine tandis que d'autres molécules sont purifiées et en cours d'identification. L'extraction suivie de séparations et de purifications en combinant diverses techniques chromatographiques et d'analyse spectrale a conduit à une nouvelle lactone sesquiterpène nommée naupliolide (C1) avec un nouveau squelette tétracyclique. Plusieurs composés connus : 6,7,9,10-tetradehydroasteriscanolide (2) et asteriscunolides (3a, 3b, 3c et 3d) ont été identifiés.

L'analyse de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* par GC-MS, effectuée pour la première fois, a montré la présence des produits majoritaires : thymol isobutyrate, 2,5-dimethoxy-*p*-cymène, α -pinène et *cis*-chrysanthenyle acétate. Quant à *Asteriscus graveolens subsp. odorus*, elle présente une quantité très élevée en 6-oxocyclonerolidol et l'épi- α -cadinol et une faible quantité en α -pinène, humulene époxyde II, α -bisabolone oxide, bisabolone, α -humulene, myrtenylacetate et *trans*-chrysanthenyle acétate.

L'étude biologique d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* s'inscrit dans le cadre de la recherche d'une démarche préventive de lutte intégrée visant à la réduction significative de l'utilisation des pesticides et en particulier les fongicides.

L'étude statistique de l'effet antifongique des extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle a montré une spécificité très marquée pour le champignon *Penicillium digitatum* plus que le champignon *Penicillium expansum* aussi bien pour les feuilles que pour les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*. Il est important de noter que le choix de ces champignons est principalement dû aux dégâts causés dans les stations de conditionnements et les serres de la région d'Agadir. Par ailleurs, l'huile essentielle de cette plante a montré un effet fongistatique sur *Penicillium digitatum*, contrairement à l'huile d'*Asteriscus imbricatus* qui présente un effet fongicide sur les champignons *Penicillium digitatum* et *Botrytis cinerea*. Les différentes concentrations de l'acide caféique se sont montrées très efficaces sur *Botrytis cinerea*. Quant aux trois flavones : la névadensine, la lutéoline et l'artémétine, elles semblent avoir un effet contre de *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*, respectivement. Ainsi, nous avons montré que le naupliolide a révélé une forte inhibition sur *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Quant à la molécule asteriscunolide 3c, elle a montré un effet remarquable sur *Botrytis cinerea*. Nous avons noté aussi que l' α -pinène présente le meilleur effet inhibiteur pour les concentrations de 50 jusqu'à 1000 ppm sur *Botrytis cinerea*. Quant au thymol isobutyrate, il est le plus efficace à la concentration 2000 ppm sur le même champignon. Ce même composé avec le 2,5-dimethoxy-*p*-cymène, sont les plus efficaces sur *Penicillium digitatum*.

Mots clés : Activité antifongique, *Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*, champignons pathogènes, phytochimie.

Abstract

This work concern the study of phytochemical and antifungal activities of two species of southern Morocco belonging to the *Asteraceae* family : *Asteriscus graveolens subsp. odor* and *Asteriscus imbricatus*.

Performed for the first time, the aim of the phytochemical analyses was the extraction, separation, purification and characterization by different spectroscopic methods of the chemical structure of flavonoids and sesquiterpene lactones majority of *Asteriscus graveolens subsp. odor* and *Asteriscus imbricatus*.

The phytochemical screening of the leaves and flowers of *Asteriscus graveolens subsp. odor* and *Asteriscus imbricatus*, revealed the presence of alkaloids, flavonoids, catechin tanins, terpenes, coumarins and cyagenetic compounds. While the quinones and saponins, are present in the flowers of *Asteriscus graveolens subsp. odor* and *Asteriscus imbricatus*, they are absent in the leaves of both plants. The identification of molecules using UV spectrophotometry showed the presence of caffeic acid, nevadensine, luteolin and artemetin in leaves of *Asteriscus graveolens subsp. odor*. As for the leaves of *Asteriscus imbricatus*, we note the presence of artemetin while other molecules are purified and bein characterized. The extraction followed by separation and purification by combining various chromatographic methods revealed a new sesquiterpene lactone named naupliolide (C1) with a new tetracyclic skeleton. Thus, several known compounds 6,7,9,10-tetradehydroasteriscanolide (2) and asteriscunolides (3a, 3b, 3c et 3d) were identified.

The analyse of essential oil of *Asteriscus imbricatus* by GC-MS, performed for the first time, showed the presence of products : thymol isobutyrate, 2,5-dimethoxy-p-cymene, α -pinene and cis-chrysanthenyl acetate. As for *Asteriscus graveolens subsp odor*, it has a very amount of 6-oxocyclonerolidol, and epi- α -cadinol and a small amount of α -pinene, humulene epoxyde II, α -bisabolone oxide, bisabolone, α -humulene, myrtenylacetate and trans-chrysanthenyl acetate.

The biological study of *Asteriscus graveolens subsp. odor* and *Asteriscus imbricatus* is part of the search for a preventive approuch of integrated control to reduce significantly the use of pesticides and especially the fungicide ones.

The statistical study of the antifungal effect of extracts of petroleum ether and ethyl acetate showed specificity for the fungus *Penicillium digitatum* than the fungus *Penicillium expansum* as well as for the leaves to the flowers of *Asteriscus graveolens subsp. odor*. It is important to note that the choice of these fungi is mainly due to damage in the packaging stations and greenhouses in the region of Agadir. Moreover, the essential oil of this plant showed a fungistatic effect against *Penicillium digitatum*, contrary to the oil of the plant *Asteriscus imbricatus* that has a fungicidal effect against the fungus *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea*. The different concentrations of caffeic acid were very effective against *Botrytis cinerea*. As for the three flavones: névadensine, luteolin and artemetin, they seem more effective against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*, respectively. Thus, we have shown that the naupliolide revealed a strong inhibition against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. As for the molecule asteriscunolide 3c, it showed a remarkable effect against *Botrytis cinerea*. We also noted that the α -Pinene has the best inhibitory effect for concentrations 50 to 1000 ppm against *Botrytis cinerea*. As for the thymol isobutyrate, it is the most effective at concentration 2000 ppm against the same fungus. This same compound with 2,5-dimethoxy-p-cymene, are most effective against *Penicillium digitatum*.

Keywords : Antifungal activity, *Asteriscus graveolens subsp. odor* and *Asteriscus imbricatus*, pathogenic fungi, phytochemistry.

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

I- Introduction générale

Grâce à sa situation géographique particulière et son climat très varié, le Maroc constitué de l'Est à l'Ouest et du Sud-ouest au Nord-est par quatre rangées de montagnes, bénéficie d'une gamme d'espèces végétales diversifiée et riche en matières actives. Le climat du Maroc est, dans son ensemble, de type méditerranéen, caractérisé par une saison sèche estivale et une saison pluvieuse hivernale. Par ailleurs, avec la présence de la Mer Méditerranée au Nord, de l'Océan Atlantique à l'Ouest et du Sahara au Sud, le pays subit une influence climatique très diversifiée, ce qui le divise en plusieurs étages bioclimatiques. Le pays connaît une diversification de la flore : plus de 4500 espèces et sous-espèces ont été répertoriées (Jahandiez et Maire, 1931 et 1934).

Ces espèces sont réparties dans 920 genres et 130 familles (Département de l'environnement, 1997). Il n'en reste pas moins que le Maroc est parmi les cinq premiers pays floristiquement les plus riches à l'échelle du Bassin méditerranéen (Quezel et Médail, 1994). Les familles les plus importantes, comptant plus de 100 espèces chacune, sont au nombre de neuf seulement (Ibn Tattou et Fennane, 1989) et regroupent ensemble plus de 2000 espèces, soit près de la moitié de la richesse spécifique totale du pays. Au contraire, les plus pauvres, montrant moins de cinq espèces chacune, sont nombreuses, de l'ordre de soixante, dont près de la moitié sont représentées par une seule espèce (Fennane, 2004).

Quant à l'endémisme, le nombre total endémique au Maroc ou partagées avec les territoires riverains : Péninsule Ibérique, Algérie, Mauritanie et les Canaries s'élève à 1441 espèces et sous-espèces, dont 951, soit environ les deux tiers, sont spécifiques au Maroc. Celles communes avec l'Algérie ou avec la Péninsule Ibérique sont relativement nombreuses. En revanche, l'effectif partagé avec la Mauritanie ou avec les îles Canaries est très faible (Ibn Tattou et Fennane, 1989).

Sur le plan taxonomique, la flore endémique du Maroc se répartit entre environ 60 familles, mais sept seulement affichent plus des deux tiers d'espèces et sous-espèces endémiques ; ce sont les suivantes : *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Apiaceae* et *Scrophulariaceae* (Ibn Tattou et Fennane, 1989).

Nombreuses sont les espèces aromatiques et médicinales qui occupent une place importante parmi cette flore à potentiel économique. Cependant, seules quelques dizaines de ces espèces sont effectivement exploitables (Bellakhdar, 1997). En effet, plusieurs espèces ont

été décrites dans la pharmacopée marocaine traditionnelle. Néanmoins, l'exploitation de ce patrimoine souffre d'un manque de connaissances précises aussi bien sur les potentialités en phytomasse de la matière végétale que sur la nature chimique de ses extraits.

La population marocaine a une tradition riche et ancienne dans le domaine de la phytothérapie (Bellakhdar, 1997). En effet, c'est un héritage de la civilisation arabo-berbère largement influencée par la religion islamique et juive; ce qui rend l'utilisation d'un certain nombre de plantes médicinales, dans le traitement de plusieurs maladies, une partie intégrée de la culture marocaine. Cette culture a besoin d'une vaste étude scientifique afin de rationaliser l'utilisation de ces plantes médicinales et d'éliminer toute utilisation non fondée voire même dangereuse.

Dans cette optique d'évaluation scientifique du potentiel médicinal des plantes, nous avons choisi d'étudier deux plantes de la région du Sud du Maroc de la famille des *Asteraceae* : *Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*.

Le choix de ces deux plantes a été dicté par deux facteurs importants :

- Le type de produit recherché : les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques qui sont omniprésents dans le genre *Asteriscus* (Dawidar et al., 2005 ; Mouffok, 2011 ; Ahmed et al., 1991). Ces composés secondaires peuvent contribuer dans la lutte intégrée contre les champignons qui attaquent les fruits et légumes en post récolte (Ribéreau-Gayon et Peynaud., 1968).
- L'étude de ces plantes est encore rare et fragmentaire et elles n'ont jamais été étudiées auparavant du point de vue phytochimique.

Cette étude est une contribution dans l'exploration phytochimique et biologique de la flore du Sud du Maroc qui reste peu exploitée malgré les efforts et l'intérêt du pays.

II- Objectifs

Les principaux objectifs de la présente étude sont :

- Caractérisation phytochimique d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* par le biais d'un screening phytochimique et d'une étude spectroscopique (UV) ;

- Identification de la composition chimique des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* ;
- Identification par les différentes techniques de spectroscopie RMN et IR des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* ;
- Evaluation du potentiel antifongique des extraits, des huiles essentielles et des produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*.

Les résultats du présent travail seront présentés en deux grandes parties :

La première partie consiste en une étude descriptive et caractéristique des deux plantes étudiées. Cette partie est divisée en trois chapitres, dont le premier porte sur le screening phytochimique des plantes étudiées et l'étude spectroscopique ayant pour but le criblage et l'identification des composés secondaires des deux plantes. Le deuxième chapitre porte sur la description de la composition chimique des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*. Dans le troisième chapitre de cette partie, nous décrivons toutes les étapes menant aux lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* : l'extraction, la séparation sur colonne et sur plaques CCM et les autres techniques chromatographiques. Une détermination structurale a été faite pour identifier les substances isolées en interprétant les spectres RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC et NOESY) et les spectres IR.

La deuxième partie portant sur l'étude analytique et comparative de l'effet antifongique des deux plantes étudiées comprend trois chapitres. Ces derniers traitent de l'activité antifongique des extraits, des huiles essentielles et des produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*.

A- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) constituent une richesse naturelle pouvant jouer un rôle important dans le développement socio-économique de certaines régions économiquement défavorisées. Elles pourraient, ainsi offrir une source viable de revenus à la population locale.

Le secteur des PAM ne cesse de se diversifier par ses productions agricoles certes, mais aussi par les technologies qu'il met en oeuvre, les produits élaborés ainsi que les marchés de destination.

Le marché international des PAM, des huiles essentielles et des extraits aromatiques est en croissance continue. 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisés par les sociétés à des fins médicinales et principalement dans l'industrie agro-alimentaire, herboristerie, cosmétique, parfumerie, pharmaceutique et hygiène, avec un chiffre d'affaires d'environ 19 milliards de dollars (Delaveau, 1974 ; Malo, 1991).

Quant au marché mondial des huiles essentielles, selon Anima (2005), les principaux marchés de consommation sont les pays développés (Europe, Japon et Amérique du Nord) qui représentent 80% des débouchés mondiaux (Tableau 1).

Tableau 1 : Tableau illustrant les composants du marché mondial des huiles essentielles (Anima, 2005).

Marché mondial des huiles essentielles			
Marchés	Marché mondial (En Milliards d'Euros)	Part des importations	Part des exportations
Europe de l'Ouest	35	49%	65%
Etats-Unis & Canada	35	-	15%
Japon	14	-	5%
Europe de l'Est	5	8%	2%
Méditerranée	2	3%	1%

Selon l'Office des Changes (2006), l'évolution des exportations marocaines en valeurs des huiles essentielles des PAM spontanées sont en progression. Elles sont passées de 56 millions de Dhs en 2000 à 112,4 millions Dhs en 2003 (Figure 1).

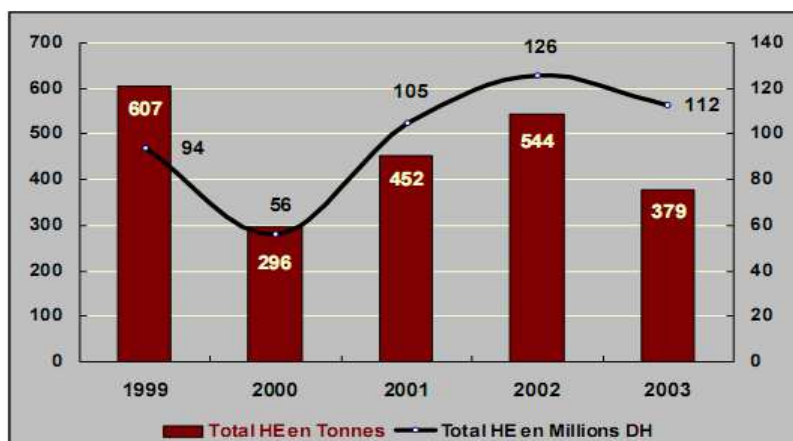


Figure 1 : Exportations totales des huiles essentielles en poids et en valeurs (Office des Changes, 2006)

II- Huiles Essentielles (HE)

II-1- Définition

Ce sont des extraits volatils et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, par pressage ou par incision des végétaux qui les contiennent. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et donnent naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie.

Au point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les huiles essentielles (HE) sont constituées de différents composants : terpènes, esters, cétones, phénols, et d'autres éléments (Bruneton, 1993).

Les constituants des HE doivent leur nom au fait qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsions plus ou moins stables qui tendent à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) (Binet et Brunel, 1967).

II-2- Localisation et caractères chimiques des HE

II-2-1- Localisation des constituants HE dans les tissus (Figures 2 et 3)

Les constituants des HE peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent des cellules banales par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement subérifiées. Elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques (épiderme supérieur des pétales de Rose). Mais généralement les épidermes des pétales de fleurs odorantes ne contiennent pas de grosses réserves d'essences. Les essences sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation (Binet et Brunel, 1967).



Figure 2 : Poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan (Porter, 2001)

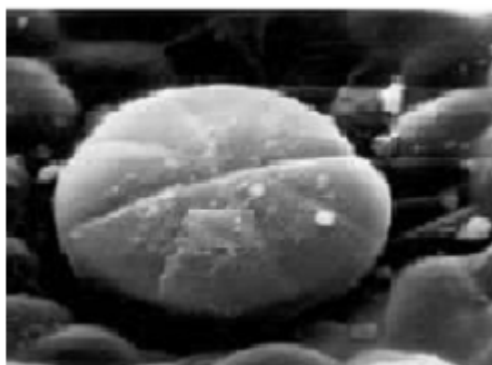
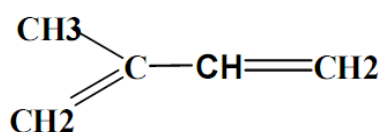


Figure 3 : Glande simple d'origan, entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800×) (Sharma et *al.*, 2003)

II-2-2- Caractères chimiques des HE

Les HE sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule $(C_5H_8)_n$. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Svoboda et Hampson, 1999). Du strict point de vue chimique, les terpènes apparaissent comme des polymères d'un carbure d'hydrogène diéthylénique, l'isoprène.



Isoprène

Selon le nombre de résidus isoprènes que regroupent les composés terpéniques, on distingue :

- Les terpènes simples, formés de deux isoprènes, $C_{10}H_{16}$;
- Les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes, $C_{15}H_{24}$;
- Les diterpènes, formés de quatre isoprènes, $C_{20}H_{32}$.

Ces trois premiers groupes sont à l'origine de très nombreuses essences :

- Les triterpènes (six isoprènes) qui, par oxydation, conduisent à de nombreuses résines ;
- Les tétraterpènes (huit isoprènes) qui conduisent aux caroténoïdes ;
- Les polyterpènes (n isoprènes) qui comprennent, en particulier, le caoutchouc et la gutta-percha.

II-3- Méthodes d'extraction des HE

Selon Bruneton (1993), Sousa et *al.*, (2002) et Adio (2005) les méthodes d'extraction des huiles essentielles sont : l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation simple, la distillation à vapeur saturée, l'hydro-diffusion, l'extraction par CO_2 super critique et l'extraction assistée par micro-ondes.

II-3-1- Entraînement à la vapeur

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau. Le but est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentín de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile [essentielle](#). La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou [hydrolat](#) ou eau florale). On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits (Carnat et *al.*, 1998 ; Hadolin et *al.*, 2004 ; Carvalho et *al.*, 2005 ; Dastmalchi et *al.*, 2008 ; Rozzi et *al.*, 2002 ; Bocevska et Sovova, 2007).

II-3-2- Hydrodistillation simple

La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HE se séparent de l'eau par différence de densité.

II-3-3- Distillation à vapeur saturée

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi.

II-3-4- Hydro-diffusion

L'hydrodiffusion consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes.

II-3-5- Extraction par CO₂ super critique

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂ et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux.

Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Ensuite, il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après, le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Ribeiro et *al.*, 2001 ; Marongiu et *al.*, 2004).

II-3-6- Extraction assistée par micro-ondes

La technique d'extraction par micro-ondes a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé d'extraction est basé sur l'absorption de l'énergie du micro-ondes par les composantes du matériel végétal et qui sont mesurées par une constante diélectrique, cette absorption dépend aussi de la fréquence de l'onde et de la température du matériel végétal (Grigonis et *al.*, 2005 ; Reighard et Olesik, 2006 ; Wang et Waller, 2006). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une

enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante (Mengal et *al.*, 1993). La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (Bendahou et *al.*, 2007 ; Lucchesi et *al.*, 2007). Cette technique présente donc beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Mengal et *al.*, 1993).

L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée (Chemat et *al.*, 2006 ; Flamini et *al.*, 2007; Lucchesi et *al.*, 2007).

II-4- Propriétés et utilisation

Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie, l'industrie alimentaire (les arômes) et l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les HE. Respirer une odeur agréable, celle d'une rose ou d'un fruit bien mûr procure une sensation de bien être (Maach et Jemali, 1986) qui est plus importante si l'odeur agréable respirée est celle d'une HE.

Toutes les huiles ont une ou plusieurs vertu(s) particulière(s). Des mélanges des HE destinés à être diffusés sont conçus par exemple pour créer une synergie entre les huiles et exercer un effet sur l'organisme et le cerveau. Lorsqu'on sait que les odeurs que l'on perçoit sont recueillies dans le cerveau par l'hémisphère relié aux émotions, on comprend mieux l'impact que peuvent avoir ces huiles.

Ces huiles essentielles agissent selon leur tropisme. Ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone particulière. Ces substances volatiles pénètrent, en effet, les tissus et l'organisme. Ainsi, l'huile essentielle de basilic est particulièrement active au niveau de la digestion tandis que celle de cyprès améliore la circulation. D'où l'importance de définir les effets thérapeutiques des huiles essentielles avant leur usage. Par exemple, une huile essentielle de menthe des champs est indiquée pour stimuler les personnes fatiguées, elle soulage les douleurs névralgiques mais ne doit jamais être utilisée dans un bain, sous peine d'irritation sérieuse de la peau.

Outre ces propriétés principales, elles ont toutes au moins une vertu (Maach et Jemali, 1986 ; Blayn, 1980) et on peut citer certaines de leurs propriétés :

- **Antibactérienne** : Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géraniol) (Charchari et *al.*, 1996 ; De Billerbeck, 2007 ; Satrani et *al.*, 2007 ; Amarti et *al.*, 2010).

- **Antivirale** : Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent de sérieux problèmes de nos jours. Les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (Shukla et *al.*, 1989 ; Salah-Fatnassi et *al.*, 2010 ; Tkachenko, 2006).

- **Antifongique** : Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (Kalembe et Kunicka, 2003). D'autres études ont montré l'effet antifongique des huiles essentielles (El Ajjouri et *al.*, 2008 ; Ghfir et Dargent, 1995 ; Garg et Siddiqui, 1992).

- **Antiparasitaire** : Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites. (Tchoumboungang et *al.*, 2009).

- **Antiseptique** : Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (Lacoste et *al.*, 1996 ; Caillard, 2003).

III- Activités biologiques des extraits des plantes

Parmi les ressources naturelles, les plantes médicinales et aromatiques jouent un rôle non négligeable dans l'économie au Maroc. Les extraits de ces plantes ont toujours fait l'objet de plusieurs études vues leur rôle dans l'activité biologique.

Une étude faite par Sibirina (2010) a montré que deux extraits naturels du Poivrier de Guinée (*Xylopia aethiopica*) ont été évalués *in vitro* et *in vivo* pour tester leurs efficacités fongicides sur le mycopathogène *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Les résultats obtenus ont montré que la croissance radiale mycélienne et la reprise de la pastille mycélienne ont été totalement inhibées par la poudre naturelle brute extraite des fruits de *Xylopia aethiopica*.

Dans une autre étude présentée par Dohou et *al.*, (2004), les extraits : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol des racines, des écorces, des feuilles, des fleurs et des fruits de *Thymelaea lythroides*, ont été testés contre *Curvularia lunata*, *Helminthosporium oryzae* et *Pyricularia oryzae*, champignons pathogènes du riz. La croissance mycélienne de *Curvularia lunata* à 1000 ppm a été inhibée respectivement de 76,1 et 73,3 % pour les extraits chloroformiques des fleurs et des fruits. Pour les extraits des autres organes étudiés, l'inhibition est moins importante avec des pourcentages allant jusqu'à 62 %. Ce sont surtout les fleurs, les fruits (extraits à l'acétate d'éthyle) et les feuilles (extraits au chloroforme et à l'acétate d'éthyle) qui présentent le plus d'activité avec des inhibitions dépassant les 40 %.

Les biotests de toxicité de l'extrait méthanolique des feuilles de *Cestrum parqui* L'herit a montré une mortalité totale des jeunes criquets pèlerin (*Schistocerca gregaria*) au stade L5 dans un délai de 2 à 4 jours (Barbouche, 2001). De même les extraits de *Peganum harmala* provoquent une mortalité importante chez les larves des criquets pèlerins due à une lésion de la muqueuse intestinale et un blocage du développement ovarien chez la femelle adulte (Idrissi Hassani et Hermas, 2008 ; Idrissi Hassani 2000). Dans une autre étude présentée par Idrissi Hassani et *al.*, (2002), les extraits de feuilles de la plante *Peganum harmala* provoquent une modification du comportement des larves du criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*) et une diminution de la prise de nourriture menant à une diminution de poids.

Concernant l'activité antibactérienne des extraits des plantes, Moroh et *al.*, (2008) ont évalué *in vitro* le pouvoir antibactérien de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne Redheat (*Rubiaceae*) sur huit souches d'*Escherichia coli* : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* 2361, *Escherichia coli* O26 H6, *Escherichia coli* O142 K86 et *Escherichia coli* O126 B16. Toutes ces souches bactériennes testées se sont révélées sensibles à l'extrait étudié.

Ali-Emmanuel et *al.*, (2002) ont étudié l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits aqueux et alcooliques de *Cassia alata*, de *Lantana camara* et de *Mitracarpus scaber*. Cette activité antibactérienne a été comparée avec celle de loxytétracycline et de la pénicilline procaine sur une bactérie Gram-positif, *Dermatophilus congolensis*, agent de la dermatophilose bovine. Les deux extraits de *M. scaber* ont montré une activité antibactérienne plus élevée sur *D. congolensis* que ceux de *C. alata* et de *L. camara*. L'activité antibactérienne des extraits alcooliques bruts de *M. scaber in vitro* sur *D. congo-lensis*, à 500 mg/ml, a été équivalente à celle de la pénicilline procaine à la concentration de 800 mg/ml et environ 10 à 15 fois moindre que celle de loxytétracycline.

IV- Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont biosynthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique).

IV-1- Les tanins (groupe des polyphénols)

Etant des polymères phénoliques, les tanins sont formés de nombreuses unités flavonoïdes et ne sont hydrolysés qu'en présence d'acides forts. Ils servent de défense contre les micro-organismes et sont utilisés par l'Homme depuis l'antiquité pour le tannage des peaux basé sur leur aptitude à se combiner aux protéines.

Leur intérêt médicinal réside essentiellement dans leur caractère astringent : leur propriété de coaguler les albumines des muqueuses et des tissus, en créant ainsi une couche de

coagulation isolante et protectrice, ayant pour effet de réduire l'irritabilité et la douleur et d'arrêter les petits saignements. Les décoctions et les autres préparations à base de drogues riches en tanins sont employées le plus souvent extérieurement contre les inflammations de la cavité buccale, les catarrhes, la bronchite, les hémorragies locales, sur les brûlures et les engelures, les plaies, les inflammations dermiques, les hémorroïdes et la transpiration excessive (Peeking et *al.*, 1987).

Les tanins sont rangés en deux principaux groupes structuraux (Ribéreau –Gayon, 1968) :

-Tanins galliques

Ce sont des tanins hydrolysables résultant de l'estérification d'un ose par l'acide gallique ou l'un de ces dérivés. A ce groupe on rattache les tanins résultant de la condensation de l'acide gallique comme les acides ellagiques et chébuliques.

-Tanins catéchiques

Ce sont des tanins non hydrolysables (Dits condensés et proanthocyaniques) . Ils sont plus complexes que les tanins galliques, ils possèdent un squelette phényl-2-chromane de flavonoïdes. Il est admis aujourd'hui que ces tanins sont constitués par le mélange de produits de polymérisation oxydative de catéchines (flavan-3-ols) et de proanthocyanes (flavan-3,4-dioles), on peut les qualifier encore de tanins flavaniques.

IV-2- Les composés cyanogénétiques

Ils sont caractérisés par leur toxicité vis-à-vis du bétail, des insectes et même de l'Homme. Cette toxicité est due au groupe cyanure qui forme un complexe avec cytochrome q3 qui se trouve dans la chaîne respiratoire.

IV-3- Les flavonoïdes (groupe des polyphénols)

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires végétaux. Ils constituent un des plus vastes groupes de polyphénols naturels et présentent un large champ d'activité biologique aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (Richter, 1993 ; Syevens et *al.*, 2007). Ce sont des substances colorées (Guinard, 1979) responsables de la coloration de nombreux fruits, légumes et fleurs.

D'un point de vue biochimique, les flavonoïdes appartiennent à la famille des benzopyrones, sous-classe des gamma-benzopyrones. Les flavonoïdes sont des composés phénoliques dont le squelette de base est composé de quinze carbones avec deux cycles aromatiques reliés par un pont de trois carbones. On regroupe dans cette classe les anthocyanes et les aglycones qui sont très voisins chimiquement.

Il y a quelques années, les flavonoïdes étaient soupçonnés comme étant des substances nocives puisqu'ils se sont révélés mutagènes pour les bactéries et génotoxiques pour les cultures de foie de rat (Nugon-baudon, 1994) ; mais aujourd'hui, des études montrent qu'ils présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines : industrie agroalimentaire, pharmaceutique (antioxydants), cosmétique (antivieillessement), etc. (Diallo, 2003).

Aujourd'hui, on ne dénombre pas moins de 4000 composés et ils sont présents partout dans la plante : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus ; les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales de fleurs (Adrian et *al.*, 1995).

-Propriétés biologiques

Les flavonoïdes constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés anti-oxydante, inhibitrice, antivirale, anti-bactérienne, tinctoriale, ... les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques, etc. (Harborne et *al.*, 2000 ; Pietta, 2000).

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse ; leurs actions se situent au niveau des petites veines ou des capillaires provoquant une diminution de la perméabilité et augmentation de la résistance des capillaires (action de la vitamine P). Ce sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires (Diallo, 2003).

Les anthocyanes induisent une augmentation de la régénération physiologique du pourpre rétinien. Par électrorétinographie, des chercheurs ont montré qu'ils accélèrent l'adaptation de la rétine à la vision nocturne (Paris et Hurabielle, 1981).

Les flavonoïdes comme la quercétine du vin et du thé, inhibent l'agrégation plaquettaire *in vitro* (Blache, 2001). Les flavonols et les catéchols confèrent au thé des

propriétés vitaminiques P. Certains flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des particules lipoprotéines ; ce qui permet de réduire les risques coronariens (Gibault, 2001).

Une étude épidémiologique indique une relation inverse entre le niveau de consommation de flavonoïdes et le taux de cancer (Kneki et *al.*, 1997).

Les flavonoïdes sont des molécules atoxiques, elles sont donc bien tolérées chez l'Homme mais leur action est lente (Paris et Hurabeille, 1981). Elles ne sont absorbées par la muqueuse intestinale qu'en faible proportion (Adrian et *al.*, 1995).

Les isoflavones possèdent une activité oestrogénique, insecticide et fongicide. Certaines d'entre elles sont des poisons potentiels pour les poissons (Ikan, 1969).

Dans l'industrie alimentaire, les flavonoïdes sont utilisés comme colorants et édulcorants, certains anthocyanes sont des colorants végétaux autorisés à usage pharmaceutique et alimentaire (E163). Ils sont utilisés dans les produits de charcuterie, dans les produits laitiers, glaces et crèmes glacées, conserves de fruit et légumes (Moll M et Moll N, 1998).

En phytogéographie, les flavonoïdes sont utilisés pour séparer partiellement des populations en groupes géographiques (Shiv et *al.*, 1998), et pour délimiter des taxons (Idrissi Hassani, 1985 ; Min-Ha et *al.*, 2000).

En agriculture, des expériences ont montré que certains représentants de la famille des flavonoïdes, notamment le flavonol et la flavone, sont efficaces pour la lutte contre les champignons pathogènes des grains de céréales (Kalt, 2000).

IV-4- Les terpènes

Ces substances appelées également terpénoïdes, constituent une importante classe de produits secondaires, hydrophobes quelquefois volatils et unis par une origine commune. Ils sont formés d'unités de cinq carbones, unité isoprène, libérée à haute température.

Les lactones sesquiterpéniques sont des métabolites présents chez de nombreuses familles de plantes, de champignons et de bryophytes, elles ont été mises en évidence chez les Angiospermes (*Apiaceae*, *Lauraceae*, *Menispermaceae*, ...) et très abondamment chez les *Asteraceae* d'où l'intérêt de ce travail.

IV-4-1- Les saponines (groupe des stéroïdes)

Les saponines sont sous forme d'hétérosides à l'état naturel, dont l'aglycone peut être de nature triterpénique ou stéroïdique. Les propriétés physico-chimiques les plus caractéristiques des saponines sont les modifications de la tension superficielle et le pouvoir moussant. Elles sont largement répandues dans le monde végétal, ces composés assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique.

IV-4-2- Les sesquiterpènes lactones

Les sesquiterpènes lactones représentent un ensemble important en nombre de substances naturelles avec plus de 3000 structures ont été isolées. Différents composés de type sesquiterpènes lactones peuvent être distribués dans les différentes tribus de la famille des *Asteraceae* (Tableau 2) (Seaman, 1982). L'isolation et l'établissement de leurs structures remontent à plus d'un siècle. En effet, l' α -santonine a été isolé pour la première fois en 1930 (Kahlek, 1830) (Figure 4).

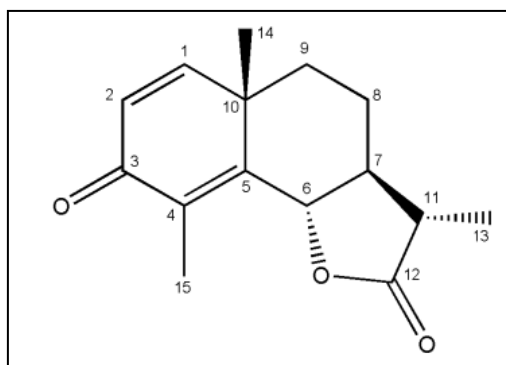


Figure 4 : Structure de α -santonine

Les lactones sesquiterpéniques sont en général issues des parties aériennes et localisées dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence. Elles sont par contre rares dans les parties souterraines d'où quelques rares structures ont été isolées, notamment la lactucine des racines de chicorée et l'hélénaline de l'aunée.

La particularité structurale des sesquiterpènes lactones leur confère des possibilités de réactivité biologique incontestables compte tenu de l'enchaînement α -méthylène γ -lactone et des fonctions époxydes fréquentes dans les majeures parties de ces molécules. Ces fonctions constituent des sites réactifs vis-à-vis des nucléophiles biologiques principalement le groupe

thiol des amines de diverses enzymes (glycogène synthase, ADN polymérase, thymidylate synthase, ...) donnant ainsi des alkylations irréversibles d'où une gamme très importante d'activité biologique (Bruneton, 1993).

Tableau 2 : Distribution des différents types de sesquiterpènes lactones dans les différentes tribus de la famille des *Asteraceae* (Seaman, 1982).

Tribu (nombre de genre)	Nombre de genres des sesquiterpènes lactones	Types de lactones présentes
<i>Eupatorieae</i> (50)	4	Germacranolides Elemmanolides Guaianolides Ambrosanolides Seco-Ambrosanolides
<i>Vernonieae</i> (50)	4	Germacranolides Elemmanolides Guaianolides
<i>Asteraceae</i> (100)	1	Germacranolides Guaianolides Elemmanolides
<i>Inuleae</i> (100)	5	Guaianolides Xanthanolides Ambrosanolides Helenanolides Sesco-Eudesanolides Seco-Ambrosanolides Germacranolides
<i>Heliantheae</i>	24	Elemmanolides Guaianolides Eudesmanolides Xanthanolides Ambrosanolides Helenanolides Seco-Eudesmanolides Seco-Ambrosanolides Seco-Helenanolides
<i>Senecioneae</i> (50)		Germacranolides Xanthanolides Eremophilanolides Helenanolides Bakkenolides
<i>Anthemideae</i> (50)	10	Germacranolides Elemmanolides Guaianolides Helenanolides Cadinanolides Chrymoranolides
<i>Arcototeae-Calenduleae</i> (50)	1	Guaianolides
<i>Cyanareae</i> (50)	8	Germacranolides Elemmanolides Guaianolides Eudesmanolides
<i>Mutisieae</i> (55)	1	Eudesmanolides
<i>Lactuceae</i> (75)	7	Germacranolides Eudesmanolides Guaianolides

a- Nomenclature des lactones sesquiterpéniques

Elle consiste à ajouter le suffixe « olide » au nom du squelette sesquiterpénique indiquant le caractère lactonique, ou un nom trivial le plus souvent inspiré par l'origine botanique de la structure. On peut citer à titre d'exemple le guaianolide chlorojanerin (I) extrait de *Centaurea janeri* et l'eudesmanolide malacitanolide (II) extrait de *Centaurea malacitana* (Figure 5).

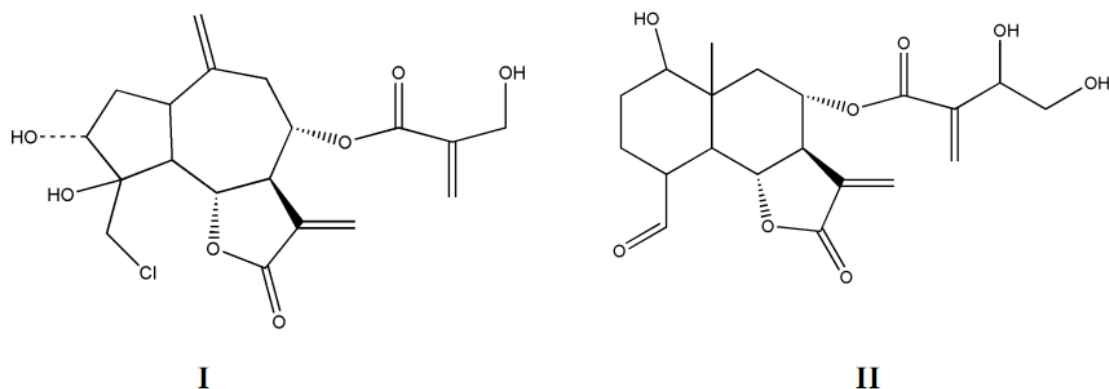


Figure 5 : Structure des Guaianolides chlorojanerins (I) et l'eudesmanolide malacitanolide (II)

b- Structures des sesquiterpènes lactones

Les structures des lactones sesquiterpéniques sont variées mais, dérivent toutes du produit de cyclisation cyclodécadiénylique du 2E, 6E, farnésyl pyrophosphate. Bien que les preuves expérimentales soient rares, il est admis que les principaux squelettes sesquiterpéniques se forment via les germacranolides eux mêmes issus de la cyclisation du cation cyclodécadiénylique. Logiquement, la structure du produit de cyclisation dépend de la conformation initiale adoptée par le macrocycle et la position des doubles liaisons qui permettent des cyclisations intramoléculaire variées. En fait, l'enzyme impliqué dans cette réaction doit en principe conditionner la stéréospécificité du processus (Bruneton, 1993) (Figure 6).

Les variations structurales secondaires sont nombreuses et portent :

- Sur le cycle lactonique, en général de type α -méthylène γ -lactone et dans tous les cas (sauf chez les lactones issues des bryophytes) ;
- Sur les groupes méthyles (C_{14} et C_{15}) souvent fonctionnalisés (alcool, acide carboxylique, époxyde, ester...) ;

- Sur les instaurations qui peuvent être réduites ou oxydées (époxydes, hydroxyles et fréquemment esters).

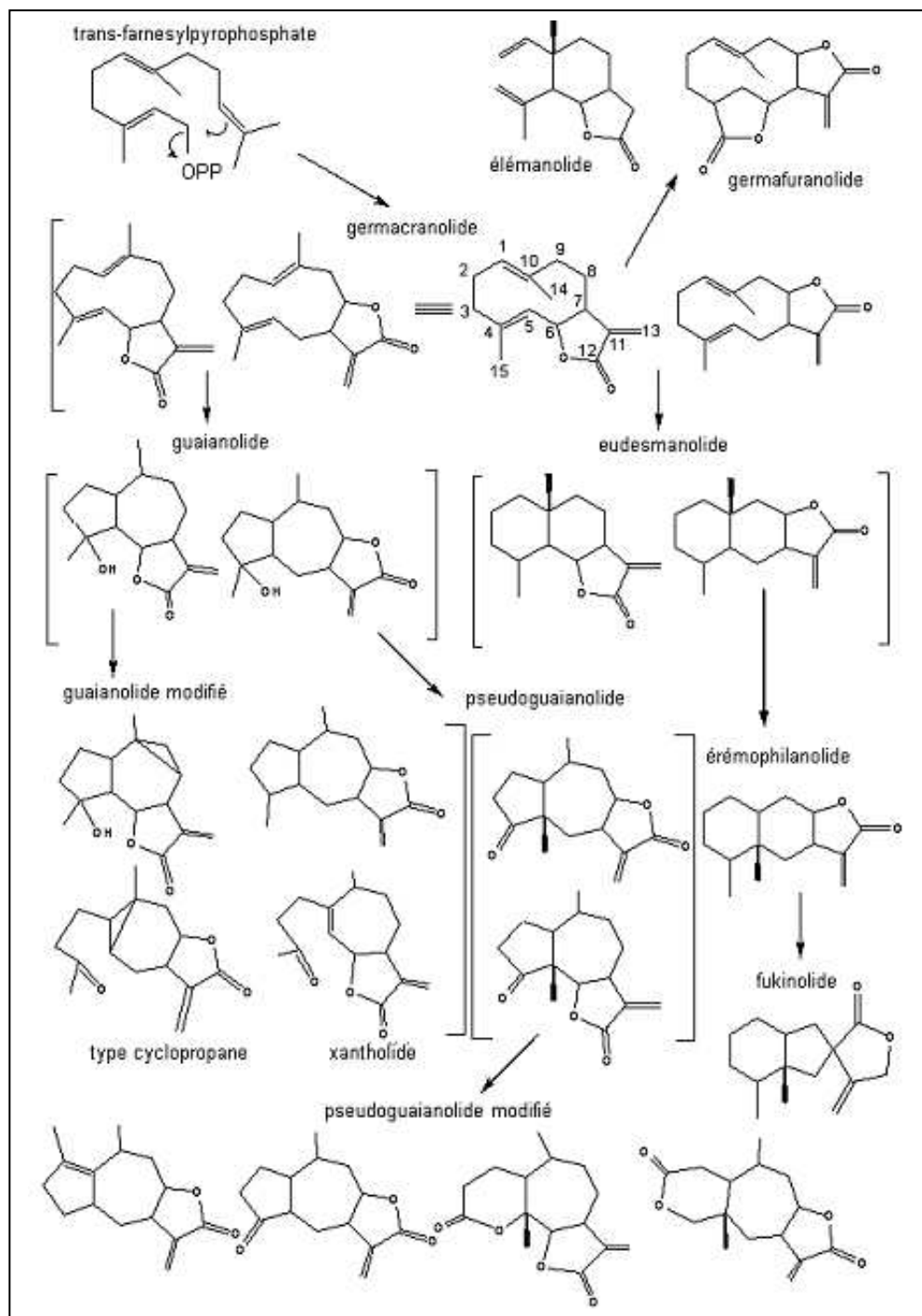


Figure 6 : Principaux squelettes de lactones sesquiterpéniques via un germacranolide

c- Origine biogénétique des sesquiterpènes lactones

En 1887, Wallach envisageait la construction des terpènes à partir de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isopréniques (Figure 7).

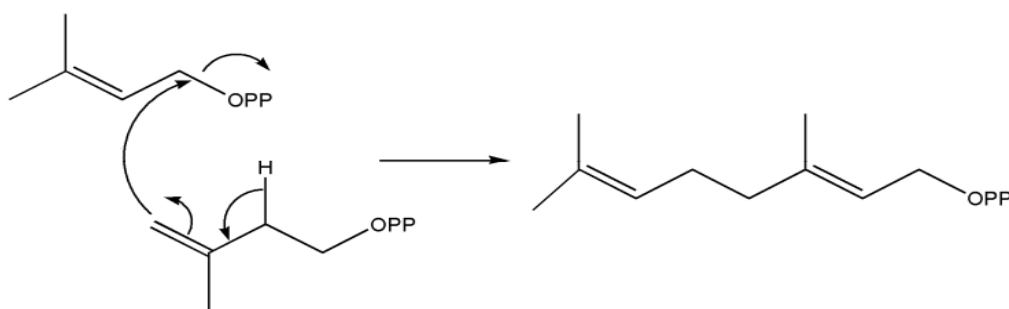


Figure 7 : Condensations tête à queue des unités en C₅ (Wallach, 1887).

Cette hypothèse sur la biogenèse des composés terpéniques a été transformée en règle générale par Ruzicka (1953) puis, plus tard par Hendrickson (1959) qui avait envisagé toutes les étapes possibles de la biosynthèse, notamment à partir des unités acétates :

- Initialement, le marquage isotopique permet de montrer que le squelette carboné des terpènes provenait de l'acétate ;
- Ultérieurement, il fut démontré que l'acide mévalonique était un précurseur universel de ces composés terpéniques (Figure 8).

Le farnesylpyrophosphate (FPP), précurseur universel des sesquiterpènes lactones peut exister sous quatre isomères géométriques. Ces isomères formés à la base de germacra, 1(10),4(5)-diène6, 12-olide ont une structure qui peut être déduite de l'isomère géométrique de FPP correspondant, après cyclisation, oxydation d'un groupe méthyle de l'isopropyle, oxydation du carbone 6 et fermeture sur l'oxygène de la fonction hydroxyle.

Un grand nombre de sesquiterpènes lactones caractérisées par le groupe γ -lactonique en 6 et 8 proviennent de la cyclisation du FPP. Il existe d'autres groupes de lactones sesquiterpéniques dont les drimanolides et les tutimanolides où la fonction oxo du groupe γ -lactonique est formée à partir des autres groupes méthyliques du squelette sesquiterpéniques. Les autres structures sesquiterpéniques sont formées par des réactions intra moléculaires de cyclisation, ruptures de liaisons, de réarrangements etc...

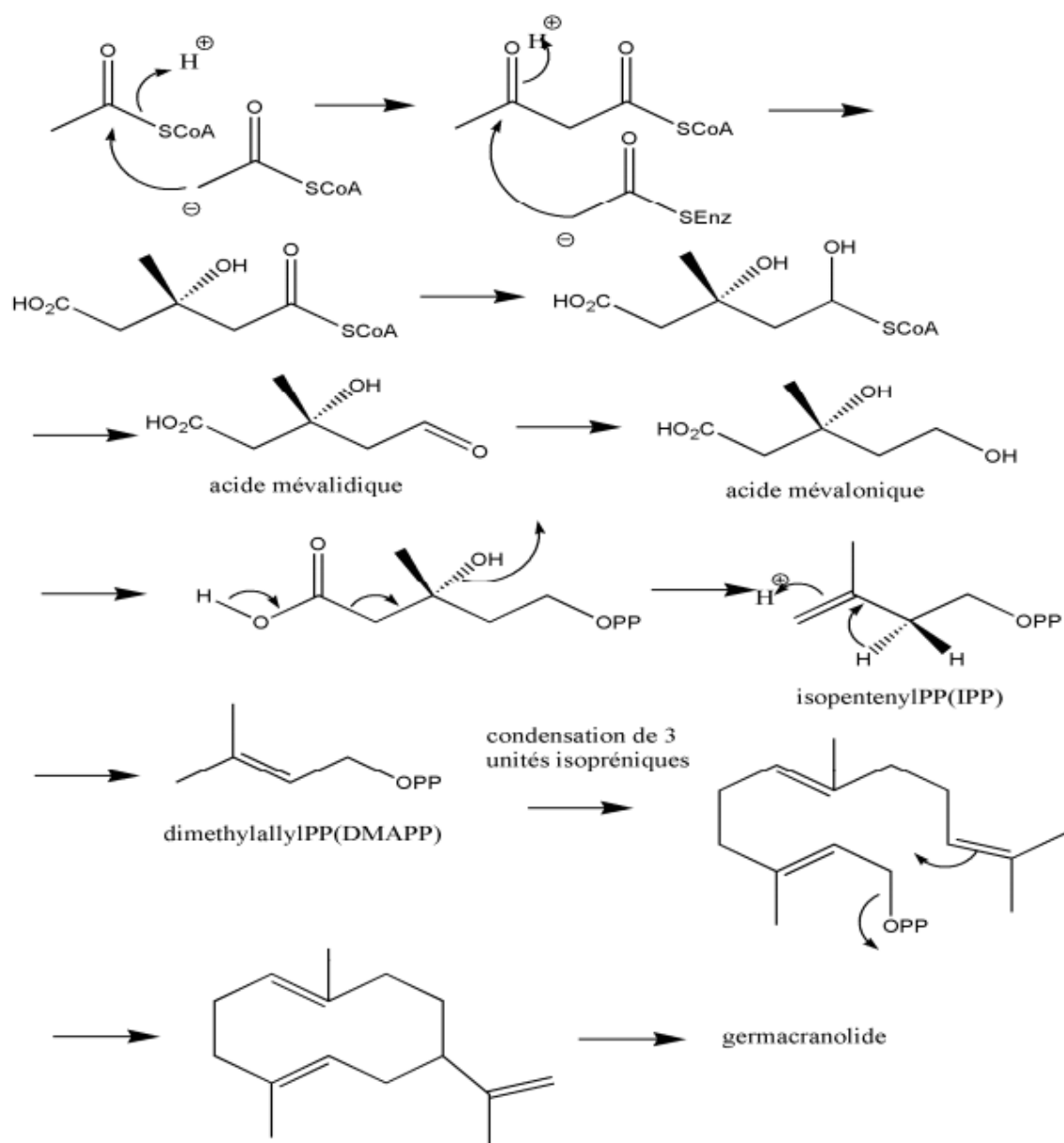


Figure 8 : Biosynthèse des germacranolides à partir des unités acétate via l'acide mévalonique

La biogenèse du cycle γ -lactonique renferme plusieurs possibilités (Herz, 1977). L'une d'elles montre l'oxydation sur C_{11} par l'intermédiaire de la fonction époxyde, une autre par l'hydroxyperoxyde, les dernières font apparaître un groupe aldéhyde ou carboxyle qui se lactonisent dans les positions 6 ou 8 où était déjà présent le groupe hydroxyle par oxydation enzymatique (Figure 9).

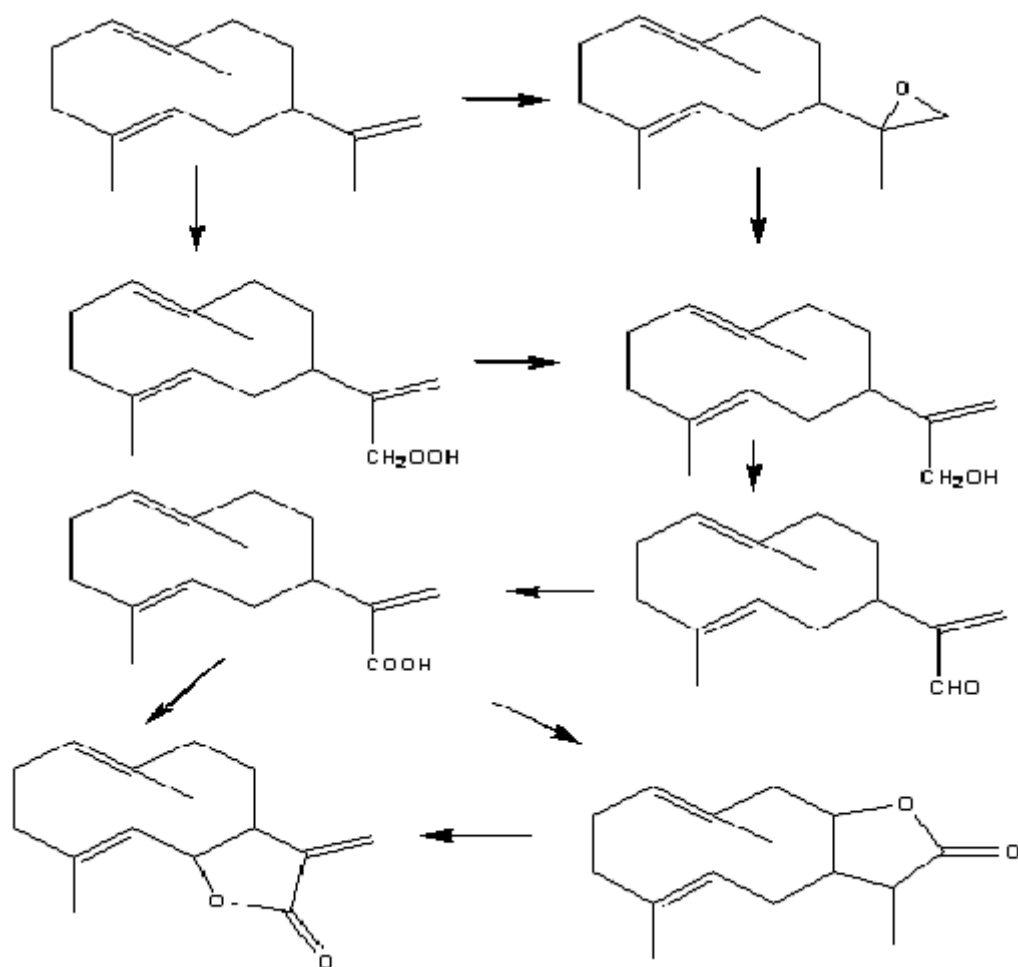


Figure 9 : Différentes voies de biogenèse du cycle γ -lactonique.

Une autre hypothèse concerne le groupe furanique qui par oxydation donne le groupe γ -actonique α, β insaturé (Figure 10) (Dorskotch et *al.*, 1957).

Cette hypothèse est confirmée par le fait que les furanoerémofilanes sont facilement oxydés par l'oxygène de l'air pour former les érémofilanolides (Elferaly et *al.*, 1977).

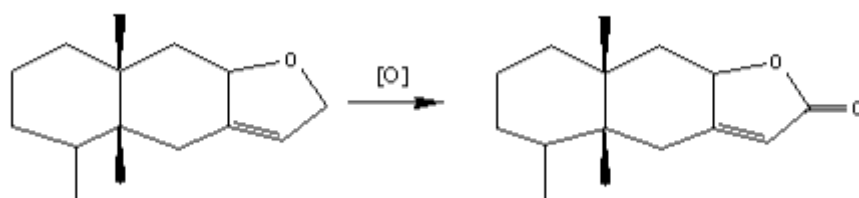


Figure 10 : Formation des érémofilanolides à partir de furanoerémofilanes.

Les composés intermédiaires très importants dans la biosynthèse sont surtout des composés avec des groupes époxydes. Ils donnent des réactions de cyclisation et des hydroperoxydes.

d- Synthèse totale des sesquiterpènes lactones

Ces dernières années, les sesquiterpènes lactones ont fait l'objet de réelles études synthétiques. En effet, les travaux antérieurs ont été consacrés à la synthèse des squelettes typiques ou analogues simples. Actuellement, des travaux de synthèse totale de ces produits utilisant des réactifs sélectifs et stéréospécifiques sont mis au point (Marchal et Wuts, 1978).

On peut citer à titre d'exemple la synthèse du germacranolide « isabeline » (Wender et Lechleiter, 1980) et de l'élémanolide « zempoaline A et B » (Bartel et Bohlmann, 1989) (Figures 11 et 12).

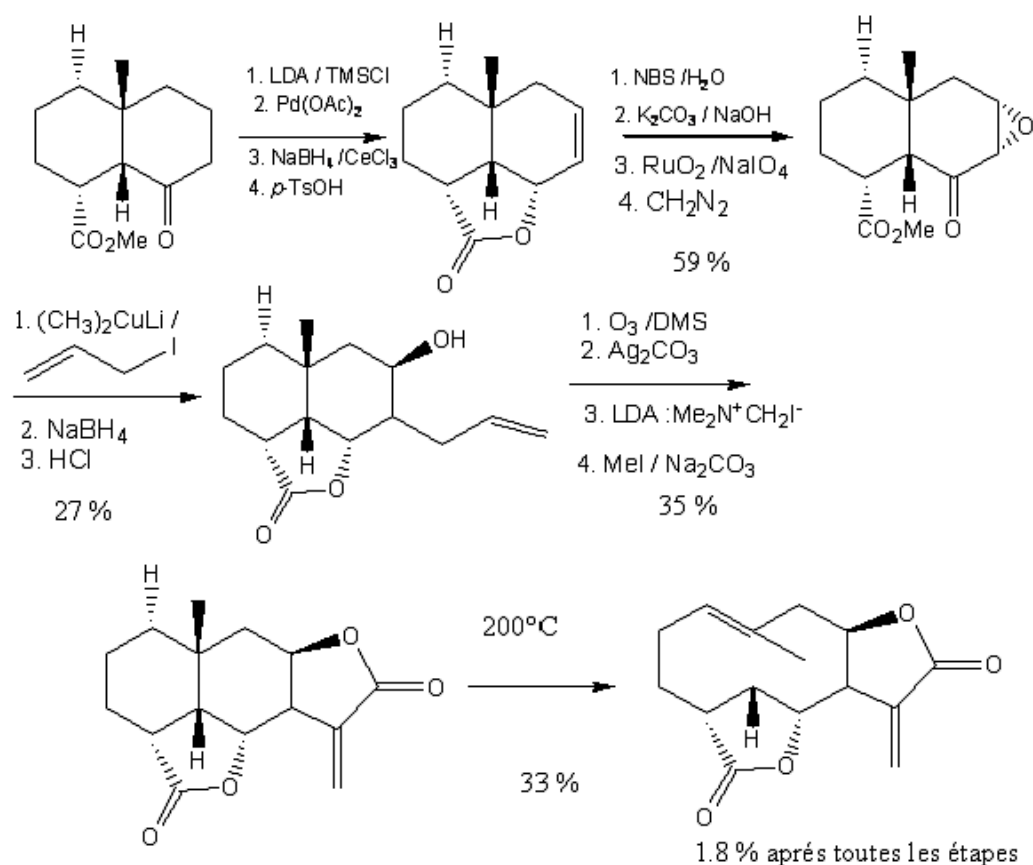


Figure 11 : Synthèse de l'isabeline par Wender et Lechleiter (1980).

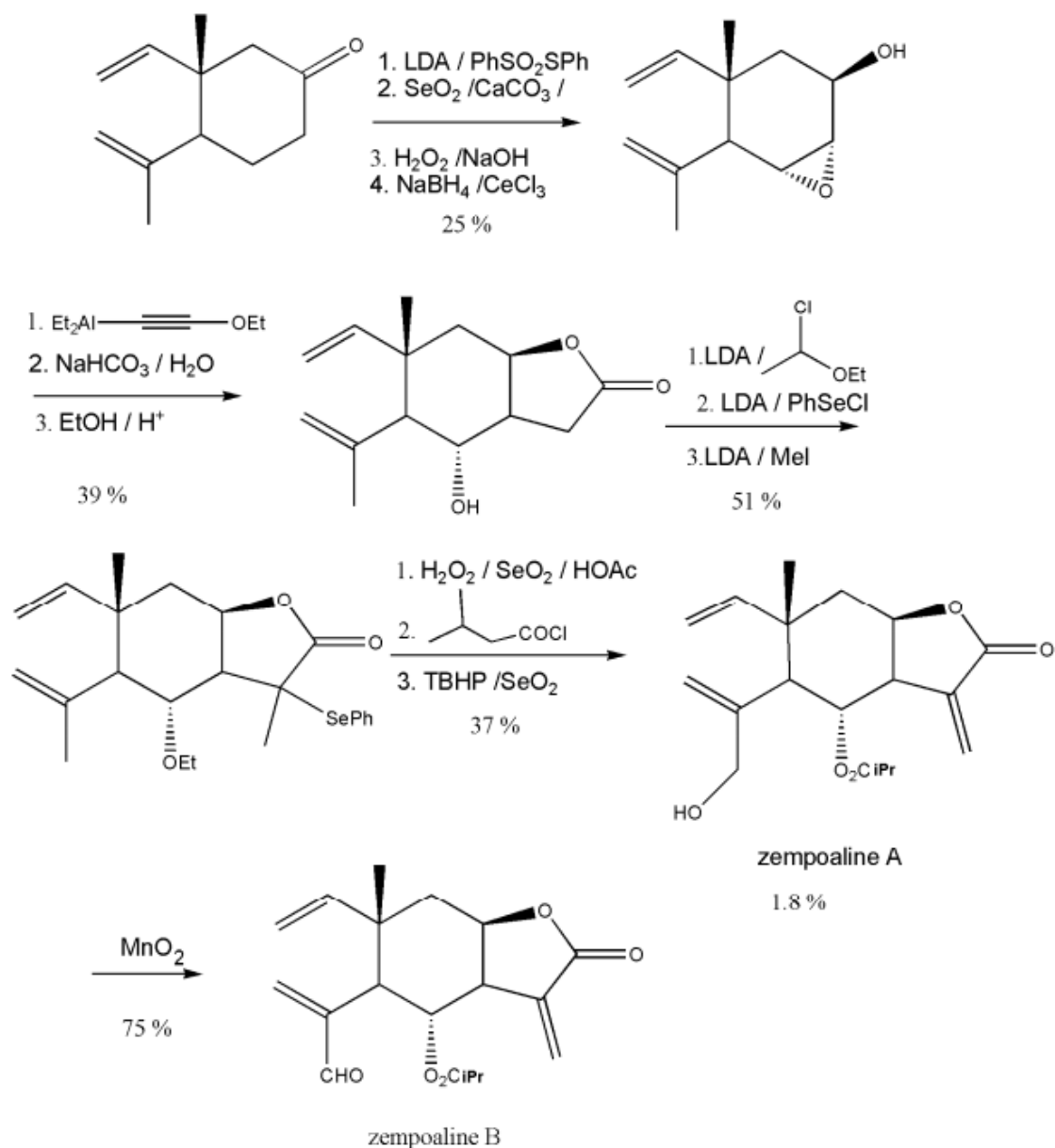


Figure 12 : Synthèse de la zempoaline A et B par Bartel et Bohlmann (1989).

e- Intérêt médical et biologique

Une grande attention est donnée à l'activité anti tumorale des lactones sesquiterpéniques (Goetz, 2004 ; Zheng et *al.*, 1992). Cette activité est liée au groupe α -méthylène γ -lactone (Kupchan et *al.*, 1970). La recherche de l'activité biologique des lactones sesquiterpéniques a toujours été d'actualité. Ainsi les propriétés inhibitrices des germacranolides sur la croissance des tissus animaux ont fait dès 1948 l'objet de revues (Kupchan et *al.*, 1971).

Dans ce domaine, la recherche a été axée principalement sur la chimiothérapie du cancer. Certains de ces produits y jouent un rôle important (Barluenga et *al.*, 2008), on peut citer à titre d'exemple les résultats sur le méthacrylate d'acétate d'érioiflorine (Hartwell et Abbott, 1969).

Des travaux de recherche systématique d'activité biologique de lactones sesquiterpéniques, ont montré que 52 produits natifs provenant de la famille des *Astéracées* sont des allergènes forts (Kupchan et *al.*, 1971). D'après ces auteurs, cette activité est liée aux mêmes facteurs structuraux conditionnant l'activité cytotoxique. D'autres études d'activité biologique ont montré que certaines lactones sesquiterpéniques sont antibactériennes à l'encontre des germes Gram positif. C'est le cas de l'hénélanine de l'aunée (*Inula helenium L.*) et de la cnicine du chardon béni (*Cnicus beniductus L.*) (Bruneton, 1993). De même, il a été prouvé que certaines lactones sesquiterpéniques sont antifongiques et d'autres antiparasitaires. L'artémisinine est un anti malarique qui a donné d'excellents résultats sur l'Homme, tandis que l'ambrosine, un pseudoguaianolide d'*Ambrosia maritima L.* est anthelminthique et molluscide.

V- Plantes étudiées

V-1- *Asteriscus graveolens Subsp. odorus*

a- Aspect botanique :

Asteriscus graveolens subsp. odorus est un buisson de la région du Sud du Maroc (Figure 13 et 14). C'est une plante et médicinale vivace à odeur forte (Benabid, 2000 ; Chebli, 2003), pouvant atteindre 60 cm et formant des touffes bien étalées sur le sol. Les feuilles sont à pilosité très canescente soyeuse comme *Inula conyza* (Deysson, 1954) avec des nervures saillantes à la face inférieure et un parenchyme hétérogène. Les feuilles florales sont plus larges que les caulinaires. Les inflorescences sont allongées plus au moins espacées à la base et les fleurs jaunâtres sont de petites tailles. Cette plante est abondante dans les pâturages rocailloux, en particulier dans les dépressions argilosablonneuses.



Figure 13 : Photo d'un buisson d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* prise dans la région d'Agadir



Figure 14 : Photo d'une fleur d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* prise dans la région d'Agadir

L'anatomie des tiges et des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* montre une structure classique des dicotylédones. En effet, au niveau de la tige, on observe un suber, un collenchyme suivi de parenchyme et de faisceaux vasculaires superposés en pachytes continu au niveau du parenchyme cortical. On observe quelques cellules sécrétrices ce qui est en concordance avec l'anatomie des tiges de certaines composées comme *Helianthus tuberosum* (Deysson, 1954). Il est important de noter que la tige contient des poils tecteurs qui pourraient être des poils sécrétrices.

b- Synonymes d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*

Les synonymes acceptés d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* dans la base de données des Plantes Africaines de la famille des *Asteraceae* sont (Dobignard et Chatelain, 2010-11) :

- *Asteriscus cavanillesi* Caball ;
- *Bubonium odorum* (Schousb.) Maire var. *eriactinum* Maire ;
- *Bubonium odorum* (Schousb.) Maire var. *pau* (Caball.) Maire ;
- *Bubonium odorum* (Schousb.) Maire var. *fruticosus* Maire ;
- *Asteriscus pau* Caball ;
- *Odontospermum odorum* (Schousb.) Sch.Bip. var. *angustifolium* Ball;
- *Bubonium odorum* (Schousb.) Maire ;

- *Asteriscus graveolens subsp. odor* (Schousb.) DC ;
- *Bupthalmum odorum* Schousb ;
- *Nauplius graveolens* (Forssk.) Wiklund subsp. *odorum* (Schousb.) Wiklund ;
- *Bubonium graveolens* (Forssk.) Maire subsp. *odorum* (Schousb.) Wiklund ;
- *Odontospermum odorum* (Schousb.) Sch.Bip;
- *Asteriscus stenophyllus* (Link) Kuntze var. *villososericeus* Kuntze ;
- *Bubonium odorum* (Schousb.) Maire forma *forma condensatum* Maire ;
- *Bubonium odorum* (Schousb.) Maire var. *cavanillesi* (Caball.) Maire.

c- Systématique

Domaine: Eukaryota

Uni: Plantae

Règne: Viridaeplantae

Embranchement: Tracheophyta

Sous-embranchement: Euphyllophytina

Infraphylum : *Radiatopses*

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe: Asteridae

Super-classe : Asteranae

Ordre: Asterales

Famille: Asteraceae

Genre: Asteriscus

Épithète spécifique: *graveolens subsp. odor*

Nom botanique: *Asteriscus graveolens subsp. odor*.

d- Noms vernaculaires

tâffsa (!) (Sahara occidental), (Monteil, 1953) ;

kerkaba (Souss), (Boulet et al., 1991) ;

taûgut (Tissint), (Bellakhdar et al., 1987) ;

âmayô, tamayont (Sahara central) : c'est aussi le nom de diverses pulcaires, (Bellakhdar et al., 1987) .

e- Usages en médecine traditionnelle

A Tissint, l'infusion (une poignée de plante dans un verre d'eau) de la plante entière est utilisée, en gargarisme, pour calmer les maux de dents et de gencives, dans le même but, on mastique des feuilles fraîches. La poudre de feuilles, prise par le nez, est indiquée contre les migraines. La décoction (une poignée de plante dans une théière) de la plante est employée par les femmes pour combattre la stérilité (Bellakhdar et *al.*, 1987) .

Cette plante a été utilisée dans la médecine traditionnelle au Sahara pour traiter la fièvre, les déséquilibres des tractus gastro-intestinaux, les douleurs céphaliques, la bronchite et comme anti-inflammatoire (Cheriti, 2000).

Selon Le Floc'H (1983), la plante est utilisée dans le traitement de la blennorragie et dans le traitement des coliques et des gastralgies. Cette espèce est très appréciée des ovins et des dromadaires.

V-2- *Asteriscus imbricatus*

a- Aspect botanique:

Asteriscus imbricatus est un buisson (Figure 15 et 16) endémique de la côte marocaine austro-occidentale depuis Essaouira jusqu'au sud de l'oued Noun. C'est une espèce vivace hémisphérique, elle peut atteindre jusqu'à 30 à 50 cm de longueur. C'est une plante ligneuse à feuilles denticulées luisantes et persistantes de petite taille avec des fleurs de couleur jaune. Cette espèce végétale est très répandue dans les dunes, sables et falaises maritimes du littoral atlantique (Benabid, 2000).

L'anatomie des tiges et des feuilles d'*Asteriscus imbricatus* montre une structure similaire d'*Asteriscus odoratus*, tout comme l'anatomie des dicotylédones. Sauf qu'au niveau de la feuille, on observe des nervures moins saillantes avec un épiderme sans poils. Elle est caractérisée par un mésophile avec un parenchyme à méat qui ne présente presque pas de lacune et un faisceau criblo vasculaire rappelant celui des dicotylédones.



Figure 15 : Photo des plantes d'*Asteriscus imbricatus* prise dans la région de Cap Ghir (à 60 km au Nord d'Agadir)



Figure 16 : Photo d'un buisson d'*Asteriscus imbricatus* prise dans la région de Cap Ghir

b- Synonymes d'*Asteriscus imbricatus*

Bupthalmum imbricatum Cav.

Bupthalmum chrysanthemoides

Bubonium imbricatum (Cav.) Litard.

Nauplius imbricatus (Cav.) Wiklund.

c- Systématique

Domaine : Eukaryota

Uni : Plantae

Règne : Viridaeplantae

Embranchement : Tracheophyta

Sous-embranchement : Euphyllophytina

Infraphylum : Radiatopses

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Super-classe : Asteranae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : Asteriscus

Nom botanique : *Asteriscus imbricatus*

VI- Champignons étudiés

VI-1- *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un champignon phytopathogène capable d'infecter une très large gamme d'hôtes (polyphagie) et ainsi de s'attaquer à diverses plantes dès que les conditions climatiques lui sont favorables (Elad et *al.*, 2004). La maladie se développe principalement sur les grappes de raisins, les petits fruits rouges, certains légumes (concombres, tomates) et les fleurs d'ornement (Coley-smith et *al.*, 1980).

a- Pathologie causée par *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est l'agent causal de la pourriture grise (Figure 17). Ce pathogène est connu par l'importance de dégâts économiques qu'il occasionne, son cosmopolistique, sa polyphagie, sa variabilité génétique et le développement rapide de souches résistantes. L'acquisition de cette résistance entraîne dans la pratique des pertes importantes de productivité et peut, ainsi, être à l'origine de difficultés économiques et sociales (Schwinn, 1982 ; Köller et Scheinpflug, 1987).

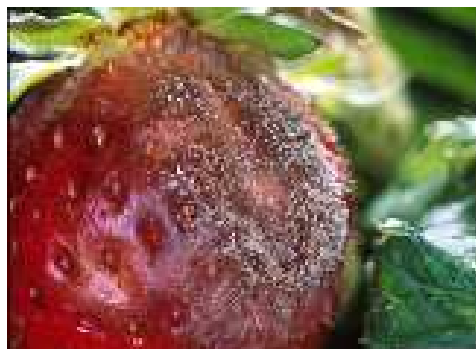


Figure 17 : Fraises infectées par *Botrytis cinerea* (Ajouz, 2009)

b- Position systématique de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea se classe comme suit :

- Règne : Fungi
- Division : Ascomycota
- Classe : Leotiomycetes
- Ordre : Helotiales
- Famille : *Sclerotiniaceae*
- Genre : *Botrytis*
- Espèce : *Botrytis cinerea*

c- Cycle biologique de *Botrytis cinerea* :

Ce champignon se manifeste dans la nature sous plusieurs formes différentes (Figure 18) : mycélium, conidies (macro et microconidies), sclérotes et apothécies (forme ascosporées).

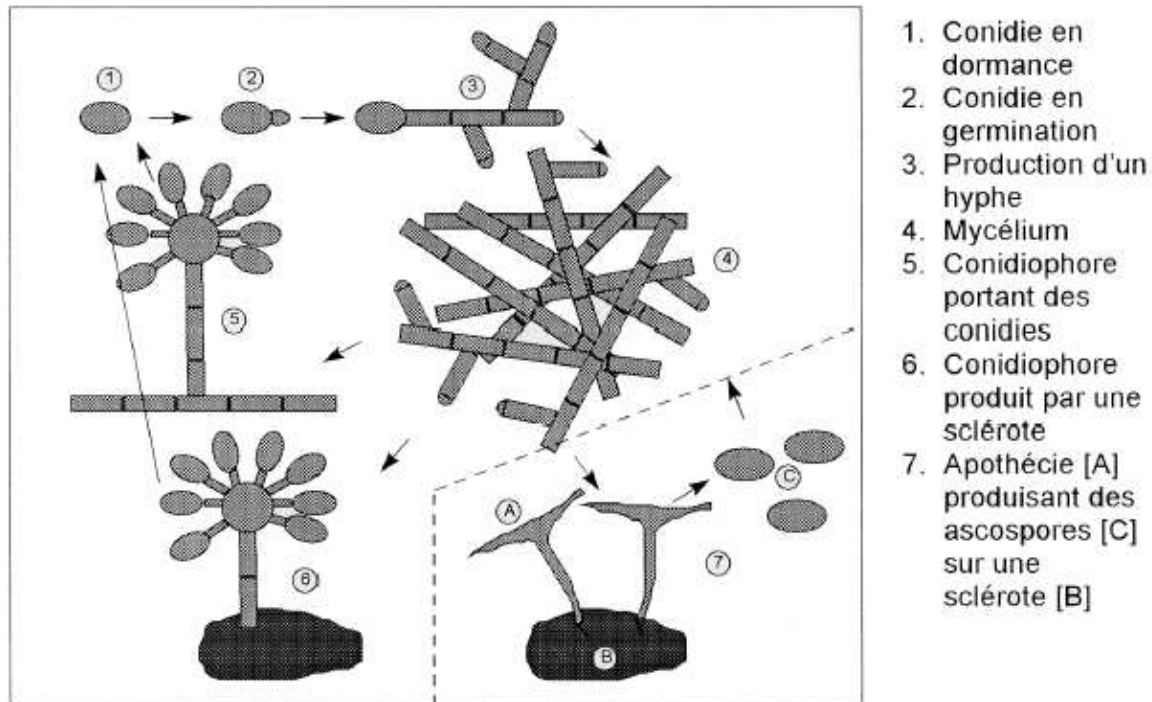


Figure 18 : Cycle biologique de *Botrytis cinerea* (Gindro, 2000)

La forme asexuée est la plus fréquente dans la nature. Le mycélium se présente sous forme d'une toile blanchâtre et grisâtre comprenant des filaments articulés dont le diamètre varie en fonction des conditions de développement des hyphes. Quand ce mycélium devient fructifère (au bout d'un certain temps d'incubation (>7j) sur milieu nutritif, il développe des touffes de conidiophores dressés grisâtres (gris brunâtre ou gris cendré) et présentant des ramifications à leur sommet. L'émission de conidies débute sur la partie terminale puis sur les rameaux latéraux du conidiophore. Les macroconidies sont ovoïdes contrairement aux microconidies (encore appelées spermaties) qui, elles, se présentent sous forme sphérique et de plus petite taille (2 à 4µm). La production de ces dernières, sur des microconidiophores, est un phénomène concomitant à la production des macroconidies. Ayant perdu totalement leur pouvoir germinatif, ces structures ne joueraient donc aucun rôle dans la vie des champignons si ce n'est qu'un rôle de cellules mâles lors de la reproduction sexuée (Ghaleb, 1990). Dans certaines conditions de son développement, le champignon est capable de produire des sclérotas. La taille et la formation de ces structures dans la nature dépendent de la

température, du milieu et du pH (Coley-Smith et *al.*, 1980). Les sclérotes assurent la survie du champignon pendant l'hiver et leur activité se manifeste naturellement au printemps par la réapparition du mycélium fructifère (conidiophores + conidies) (Figures 19 (A) et 19 (B)). De plus, ils jouent un rôle fondamental dans la reproduction sexuée.

L'apparition de la forme sexuée est assez rare dans la nature (Polach et Abawi, 1975) car elle a besoin de conditions climatiques précises qui ne sont pas toujours réalisées au moment opportun.

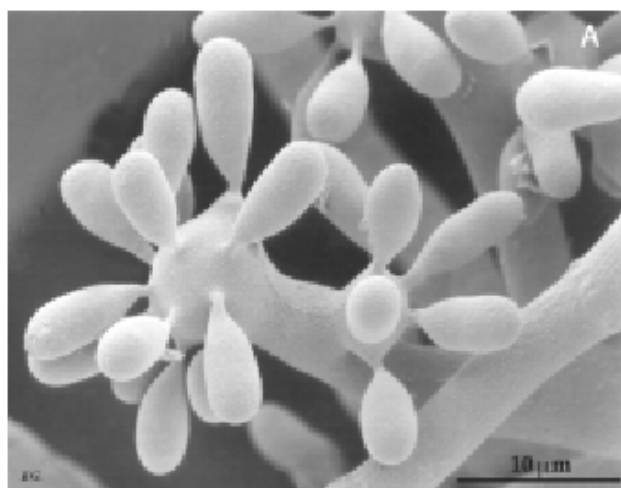


Figure 19 (A) : Photographies prises au microscope électronique des conidies sur un conidiophore (Gindro, 2000)

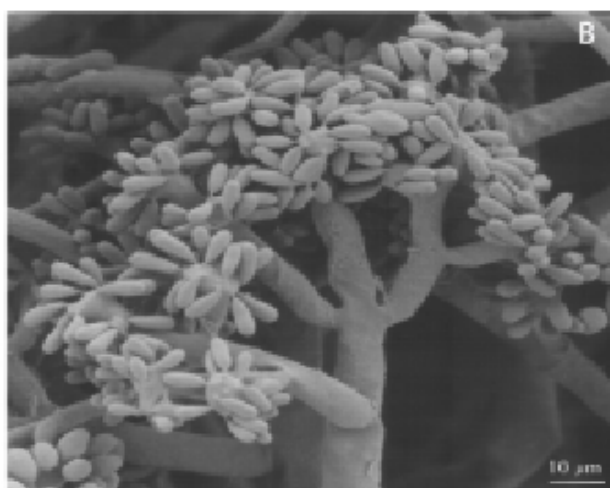


Figure 19 (B) : Photographies prises au microscope électronique des conidiophore ramifié (Gindro, 2000)

Les conidiophores ramifiés sont des conidies à un stade de développement homogène (Gindro, 2000).

d- Moyens de lutte contre *Botrytis cinerea*

Le contrôle de la maladie de la pourriture grise, principalement basé sur l'utilisation des fongicides, soulève, de nos jours, beaucoup de questions quant à l'efficacité des produits utilisés, les risques de développement de souches résistantes, les dommages portés à l'environnement ou encore le taux de résidus toxiques dans les denrées alimentaires. L'application de mesures plus saines semble alors s'imposer. Les épidémies causées par *Botrytis cinerea* sont initiées en grande partie par les conidies produites localement à l'intérieur de la culture (Miller et Jeves, 1979). Le champignon infecte ainsi les différentes parties de la plante y compris les fruits (Bristow et *al.*, 1986). L'élimination des restes végétaux est une pratique culturale de base qui pourrait réduire l'importance de l'inoculum (Sutton, 1990). Outre cela, l'application de certains agents antagonistes, utilisés comme

moyen de lutte biologique, a permis de réduire le potentiel d'infection et de sporulation de ce pathogène sur plusieurs plantes hôtes (Peng et Sutton, 1991 ; Elad et *al.*, 1994 a et b). Les résultats obtenus sont certes prometteurs mais restent d'une efficacité pratique inférieure à celle des fongicides.

d-1- Lutte chimique contre *Botrytis cinerea*

Différents types de fongicides ont été utilisés pour combattre la pourriture grise ; les fongicides de contact, les fongicides translaminaires et les fongicides systémiques.

L'action multisite et multicible de fongicides de contact perturbe de nombreux mécanismes cellulaires chez le champignon. De ce fait, l'efficacité de ces produits est potentiellement peu sujette à des résistances (Pommer et Lorenz, 1987). En revanche, les fongicides de surface ont parfois des effets indésirables (Carlile, 1988 ; Hassall, 1990). De ce fait, l'usage de ces molécules dans la pratique est souvent restreint. De plus, étant donné l'absence d'effet curatif, ils ont été rapidement détrônés par les fongicides systémiques.

Actuellement, les fongicides restent des outils indispensables pour lutter contre *B. cinerea* en pré- et post-récolte et assurer une production suffisante (Leroux, 2004). L'utilisation de produits phytopharmaceutiques peut, cependant, entraîner le développement de souches résistantes à ces fongicides (Latorre et *al.*, 2002 ; Leroux, 2004 ; Sergeeva et *al.*, 2002).

d-2- Lutte biologique contre *Botrytis cinerea*

En ce moment, la lutte contre la pourriture grise due au *Botrytis cinerea* demeure difficile et le contrôle, même partiel, de ce pathogène ne se fait souvent que par l'utilisation répétée de fongicides. Toutefois, nombreux sont les travaux faisant état des possibilités de lutte biologique contre cette maladie à l'aide d'organismes antagonistes (Tronsmo, 1980 ; Janisiewicz et Roitman, 1988 ; Peng et Sutton, 1991 ; Robert, 1990). L'application pratique d'agent de biocontrôle contre la pourriture grise, comme pour presque toutes les maladies foliaires, n'a pas donné des résultats escomptés (Andrews, 1992). Ceci est probablement lié à la méconnaissance des modes d'action et des facteurs externes influençant l'efficacité de ces agents (Blakeman et Fokkema, 1982).

VI-2- *Penicillium digitatum*

La pourriture verte causée par *Penicillium digitatum* est la maladie des agrumes la plus fréquente en post-récolte dans plusieurs pays agrumicoles (Palou et *al.*, 2002) (Figure 20). Généralement cette maladie est contrôlée par des fongicides synthétiques comme l'Imazalil et le Thiabendazole (Holmes et Echert, 1999).



Figure 20 : Clémentine infectée par *Penicillium digitatum* (Taqaarort, 2008)

a- Pathologie causée par *Penicillium digitatum*

Penicillium digitatum est un parasite de blessure très ubiquiste qui se trouve dans le sol et dans l'eau et infecte principalement les fruits d'agrumes et les jus de fruits (Domsch et *al.*, 1980).

Les colonies de *Penicillium digitatum* sur le milieu de culture artificiel (PDA) sont similaires à la pourriture développée sur un fruit infecté (Brown et Eckert, 1988). La couleur des spores est verte d'où le nom de la pourriture verte donnée à la maladie (Figure 21).

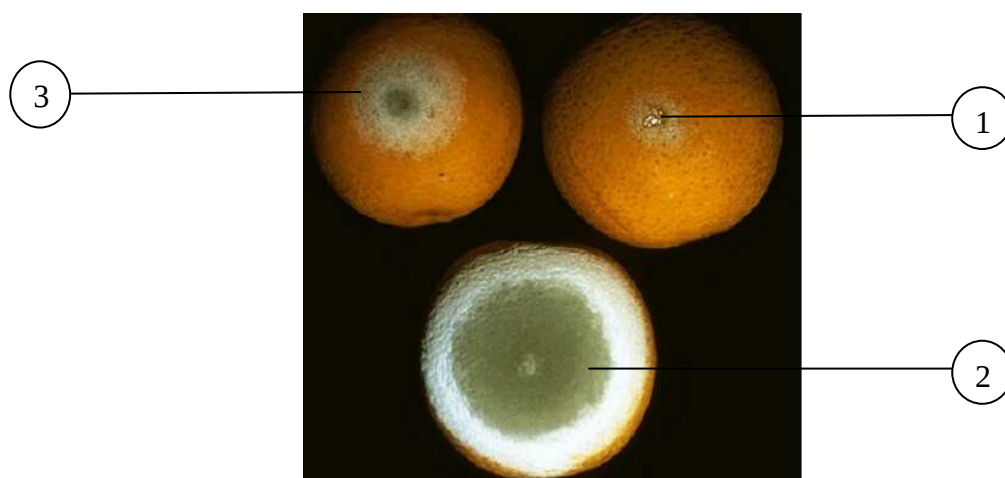


Figure 21 : Différents stades de la pourriture verte sur fruits d'agrumes (Taqaarort, 2008)

b- Position systématique de *Penicillium digitatum*

Penicillium digitatum appartient à la subdivision des Deuteryomycetes, classe des Hyphomycetes et à la série des Phialidospores. Le mycélium est constitué d'hyphes ramifiés (3 à 7µm de diamètre) inter et intracellulaires (Domsch et *al.*, 1980).

c- Symptômes de la pourriture verte

Les étapes préliminaires du cycle de croissance de la pourriture verte c'est-à-dire les symptômes apparus sont identiques à celles de la pourriture bleue (*Penicillium italicum*) et de la pourriture amère (*Geothrichum candidum*). Dans les étapes avancées, le site infecté se tache en surface et devient mou et humide avec un diamètre de 6 à 12 mm. Après 24 à 36 heures et à une température de 24°C, la tache devient de 2 à 4 cm de diamètre. Un mycélium blanc se développe et le diamètre devient alors de l'ordre de 2,5 cm tandis que des spores de couleur vert-olive sont produites. La zone verdâtre de la pourriture, correspondant à une forte sporulation, est entourée d'une large zone composée de mycélium blanc et d'une surface molle de l'extérieur. Sur le fruit entier, une masse de spores vertes est étalée sur toute la surface qui se disperse facilement si le fruit est déplacé, agité ou exposé à un courant d'air (Brown et Eckert, 1988).

d- Cycle biologique et épidémiologie

Penicillium digitatum se conserve sous forme de spores (xérospores) formés sur les fruits pourris à la surface du sol des vergers ou dans les stations de conditionnement. Le déplacement de ces spores se fait par des courants d'air ainsi que par les caisses de ramassage contaminées vers les fruits sains. Après un contact direct sur les blessures causées au cours du transport, les spores pénètrent dans l'albédo et donne naissance à une irréversible infection dans les 48 heures qui suivent la pénétration. Une température de 20 à 25°C et une humidité relative saturée sont des conditions nécessaires pour la croissance du champignon. La croissance est faible lors de l'entreposage à froid (Brown et Eckert, 1988). Le champignon envahit la peau du fruit dans les jours qui suivent, puis la sporulation a lieu aboutissant à la formation d'une masse poudreuse de couleur vert-olive. Pour prévenir ce type de pourriture, les traitements doivent être appliqués avant l'accomplissement du processus infectieux (24-48h à 20-25°C) (Eckert, 1982).

e- Méthodes de lutte

La lutte chimique en post-récolte est couramment utilisée dans les stations de conditionnement, on peut citer : les benzimidazoles (benomyl, thiabendazoles et méthyl-thiophanate), l'imazalil et la guazatine. En effet, les benzimidazoles et l'imazalil sont spécifiques et efficaces contre *Penicillium* spp (Prusky, 1985).

L'intervention au champ consiste à réduire les contaminations, à éviter toute sorte de blessures (Tuset et *al.*, 2003) et à récolter par temps sec en éliminant les fruits chutés ou blessés (Castro-Lopez et *al.*, 1981).

VI-3- *Penicillium expansum*

a- Pathologie causée par *Penicillium expansum*

La pourriture bleue causée par *P. expansum* est la maladie la plus répandue des pommes en post-récolte (Janisiewicz et *al.*, 2003 ; Sholberg et Conway, 2004) (Figure 22). Ce champignon ne cause pas seulement des pourritures mais peut également produire une mycotoxine « la patuline » qui est dangereuse pour la santé humaine (Immunotoxique, neurotoxique, néfaste sur l'appareil gastro-intestinal) (Roussel et *al.*, 2007). Cette mycotoxine peut réduire considérablement la valeur des fruits atteints et les rend inacceptables au commerce.

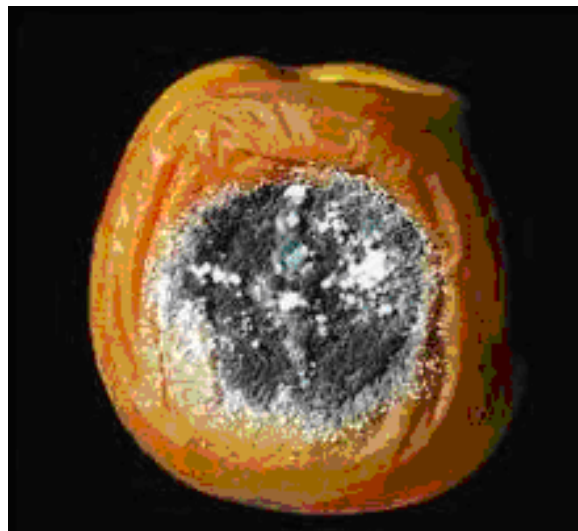


Figure 22 : Fruits de pommes infectées par *Penicillium expansum* (Roussel et *al.*, 2007)

b- Position systématique de *Penicillium expansum*

- ✓ Règne : Fungi
- ✓ Division : [*Ascomycota*](#)
- ✓ Classe : *Eurotiomycetes*
- ✓ Sous-classe : *Eurotiomycetidae*
- ✓ Ordre : *Eurotiales*
- ✓ Famille : *Trichocomaceae*
- ✓ Genre : *Penicillium*
- ✓ Espèce : *P. expansum*

c- Symptômes de la pourriture bleue

Les symptômes typiques de la pourriture bleue sont des lésions humides de forme généralement circulaire avec un contour net et de couleur brun-claire. La surface des pourritures âgées peut être couverte par des spores blanchâtres qui deviennent vert-bleuâtres, d'où le nom de la maladie. Cette pourriture est à évolution rapide sur les fruits mûrs et elle est plus lente sur ceux qui n'ont pas encore atteint le pic climactérique. Elle est généralement distinguée par une odeur de moisi (Janisiewicz et Roitman, 1998).

d- Cycle biologique et épidémiologie

Les spores de *Penicillium expansum* peuvent se conserver d'une saison à l'autre dans les caisses de stockage où le champignon peut croître et se multiplier. La contamination de celles-ci par les spores peut se faire par différentes sources à savoir le sol des vergers, les fruits infestés ou via l'air (Janisiewicz et Roitman, 1998 ; Sanderson, 2000). Il est remarqué que la contamination des fruits destinés au stockage se produit principalement lors du traitement au drencher avec l'antioxydant diphenylamine (DPA) qui est utilisé pour la protection contre l'échaudure superficiel (aux USA par exemple). Ainsi, la concentration en spores dans la solution augmente successivement avec chaque caisse et peut atteindre des taux élevés si la solution n'est pas changée régulièrement. L'inoculation peut également se produire par les eaux utilisées pour le traitement des fruits contre les maladies de post-récolte avant leur stockage. Les spores produites sur les lésions de pourriture des fruits peuvent être disséminées dans les chambres de stockage par les ventilateurs de réfrigération et peuvent contaminer de nouveaux fruits (Sanderson, 2000).

Penicillium expansum est nécrotrophe et présente une phase saprophytique à la surface des fruits avant de développer une structure infectieuse. Cette phase est possible grâce à la présence de nutriments libérés par les fruits ou se trouvant à leur surface (Blakeman et Brodie, 1977). Ainsi, l'infection primaire de la maladie commence par les blessures qui constituent la porte d'entrée du pathogène. Ces blessures sont causées principalement par des accidents lors de la cueillette ou par les piqûres d'insectes. Parfois, l'infection peut se produire à travers les lenticelles, particulièrement quand elles sont éclatées par un hydrocraquage pendant une période humide qui suit directement une période sèche ou quand les fruits deviennent très mûrs (Janisiewicz et Roitman, 1988).

e- Méthodes de lutte

Actuellement la lutte chimique reste la principale mesure de contrôle existante pour combattre les maladies des pommes en conservation. Néanmoins, plusieurs facteurs ont conduit à rechercher d'autres méthodes de lutte. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer entre autres l'apparition de phénomène de résistance chez les pathogènes, la détection de résidus sur les denrées alimentaires, les exigences du consommateur et le retrait de l'agrément de certains fongicides efficaces destinés à cet usage comme le Benomyl et le Carbendazime (Fitter, 1986).

Parmi les alternatives développées en vue de compléter ou de remplacer partiellement l'usage des fongicides synthétiques, la lutte biologique s'avère une mesure très prometteuse, spécialement dans le domaine de post-récolte. Un grand nombre de levures et de bactéries ont été rapportées comme des agents biologiques efficaces contre les maladies de post-récolte (Jijakli et Lepoivre, 1998 ; Punja et Utkhede, 2003 ; Spadaro et Gullino, 2003 ; Fravel, 2005 ; Yu et *al.*, 2008 ; Mikani et *al.*, 2008). Parmi ces agents biologiques, plusieurs souches de la pseudo-levure *Aureobasidium pullulans* ont montré un niveau élevé de protection vis-à-vis de plusieurs pathogènes de post-récolte (et notamment *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*) chez plusieurs cultures importantes comme les pommes, les raisins et les fraises (Lima et *al.*, 1999, 2003 ; Ippolito et *al.*, 2000, 2005 ; Castoria et *al.*, 2001 ; Adikaram et *al.*, 2002). Récemment, une nouvelle souche potentielle d'*A. pullulans* (Ach1-1) a été isolée à partir de la surface des pommes et a été sélectionnée pour ses propriétés antagonistes vis-à-vis des pathogènes *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* (Achbani et *al.*, 2005).

B- MATERIEL ET METHODES

I- Matériel végétal

Les feuilles et les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et d'*Asteriscus imbricatus* ont été récoltées respectivement des régions d'Agadir et de Cap Ghir (à 60 km au Nord d'Agadir) durant le mois d'Avril (2004) de manière aléatoire (Figures 23 et 24). Ces plantes constituent un patrimoine local floristique très important qui n'est en grande partie décrit que d'un point de vue botanique. *Asteriscus graveolens subsp. odorus* a été identifiée par le Professeur Ouyahya A. à l'Institut Scientifique (Rabat, Maroc). Quant à *Asteriscus imbricatus*, elle a été identifiée par le Professeur Chebli B. de l'ENSA (Agadir, Maroc). Un spécimen de chaque plante a été déposé à l'herbier de la Faculté des Sciences d'Agadir (Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc).

Une partie du matériel végétal a été conservée à 4°C quelques heures après la récolte pour l'analyse des composés cyanogénétiques et pour d'éventuelles études ultérieures. L'autre partie a été séchée à l'ombre, à l'abri de l'humidité et stockée soigneusement. Les plantes ont été ensuite broyées au moulin électrique jusqu'à obtention d'une poudre.



Figure 23 : Feuilles et fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*



Figure 24 : Feuilles et fleurs d'*Asteriscus imbricatus*

II- Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des métabolites secondaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*

1- Les alcaloïdes

La présence des alcaloïdes a été mise en évidence par trois tests différents : les tests d'Iodoplatinate*, de Mayer* et de Dragendorff* (Randerath, 1971) car certains alcaloïdes peuvent être sensibles à certains tests et non détectables par d'autres.

❖ Test d'Iodoplatinate :

L'extrait à tester est déposé sur couche mince (plaque de silice) le chromatogramme est développé dans le solvant suivant : (AcEt / MeOH / NH₄OH) (9/1/1), puis séché sous la hotte. Les bandes de migration sont repérées et délimitées sous lumière UV à 365nm.

L'application du réactif d'Iodoplatinate par pulvérisation permet de révéler la présence d'alcaloïdes. Ceux-ci se révèlent par une couleur bleue sur le chromatogramme.

❖ Test de Mayer :

A une quantité de 0,5 g du matériel végétal sec broyé, on ajoute 15 mL d'éthanol (70%) et dans le but de détruire les parois cellulaires et libérer toutes les constituants qui baignent dans la vacuole, une sonication est effectuée pendant 15 mn. Ensuite, les extraits sont laissés en agitation magnétique pendant toute la nuit. Après une décantation complète on filtre sur papier filtre. L'extrait est évaporé à sec dans le rotavapor. Le résidu récupéré dans quelques mL de HCl (50%) est ensuite transvasé dans deux tubes à essai ; l'un est utilisé comme témoin et à l'autre on ajoute le réactif de Mayer. L'apparition de précipité blanc traduit la présence des alcaloïdes.

* Voir annexe

❖ Test de Dragendorff :

Il repose sur le même principe que le test d'Iodoplatinate sauf que la révélation se fait par la pulvérisation au réactif de Dragendorff. La présence d'alcaloïdes se révèle par une couleur orange vive sur le chromatogramme.

2- Les coumarines

Les coumarines sont détectées par deux tests différents :

❖ Le premier test :

Une quantité de 2 g de matériel végétal sec broyé est placé dans 10 mL de CH_2Cl_2 . Le tout est chauffé pendant quelques minutes puis filtré à l'aide du papier filtre. La migration de cette solution a été faite sur couche mince dans le solvant : toluène /acétate d'éthyle (93/7). Après un séchage sous hotte ventilée, la révélation a été faite à l'aide de NH_3 sous UV à 365nm (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1968).

❖ Le deuxième test :

On pèse 1 g de matériel végétal sec broyé et on le place dans un tube à essai, couvert par du papier filtre imbibé avec NaOH dilué. Le tube est ensuite placé dans un bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le papier filtre est ensuite examiné sous lumière UV. Une fluorescence jaune indique la présence des coumarines (Rizk, 1982).

3- Les saponosides

Dans un bécher, on ajoute 100 mL d'eau distillée a une quantité de 2 g de matériel végétal sec, puis la solution est portée à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement, on filtre la solution sur papier filtre, et on ajuste le filtrat à 100 mL avec de l'eau distillée. Une série de 1 à 10 mL de filtrat est placée dans 10 tubes à essai et additionnée de 10 mL d'eau distillée. Une agitation violente et horizontale a été faite pendant 15 secondes pour chaque tube. Après 15 mn de repos on mesure la hauteur de mousse résiduelle (en cm) dans chaque tube.

La présence des saponines est indiquée par un indice de mousse supérieur à 100. Ce dernier est calculé selon la relation suivante :

$$I = \text{La hauteur de la mousse dans le 9ème tube} \times 10/0,09$$

Remarque : *Saponaria officinalis* est utilisée comme témoin positif.

4- Les tanins

Une quantité de 1,5 g du matériel végétal sec a été placée dans 10 mL de méthanol 80% est agitée durant 15 mn puis filtrée sur papier filtre.

On ajoute quelques gouttes du chlorure ferrique (FeCl_3) 1% à l'extrait méthanolique déjà préparé. En présence de tanins galliques et ellagiques, on observe une coloration bleue noire, alors qu'en présence de tanins catéchiques cette coloration est brune verdâtre (Rizk, 1982).

5- Les terpénoïdes

A une quantité de 1 g du matériel végétal broyé on ajoute 5 ml d'hexane, puis une sonication pendant quelques minutes a été faite. Après une agitation de 30 min et une filtration, la migration du filtrat a été effectuée sur une plaque préparative de gel de silice, le solvant utilisé est le benzène. Après migration, la plaque est pulvérisée avec le chlorure d'antimoine puis mise à l'étuve à 110°C pendant 10 min. Toute fluorescence décelée après ce traitement prouve que le matériel testé contient des terpénoïdes (Randerath, 1971).

6- Les composés cyanogénétiques

Une quantité de 1 g de matériel végétal frais est mouillé avec quelques gouttes de CHCl_3 dans un tube à essai où est insérée une bandelette de papier filtre imprégnée avec du picrate de sodium. L'ensemble est chauffé dans un bain marie à 35°C pendant 3 heures.

Le papier vire au rouge après production de HCN témoignant de la présence des composés cyanogénétiques (Al-Yahya, 1986).

7- Les quinones libres

Une quantité de 0,5 g du matériel végétal sec est placé dans 5 mL d'éther de pétrole. Après quelques minutes d'agitation, le mélange est laissé au repos pendant toute la journée. Après la filtration de ce mélange, il est concentré au rotavapor.

Le virage de la couleur de la phase aqueuse au jaune, rouge ou violet après ajout de quelques gouttes de NaOH (1/10), témoigne de la présence des quinones (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1968).

8- Les flavonoïdes

a- Dosage des flavonoïdes totaux

A 1 g du matériel végétal sec sont ajoutés 100 mL de méthanol 80%. L'ensemble est agité pendant 15 mn, puis porté au sonicateur durant 15 mn. La quantification des flavonoïdes dans les parties aériennes par spectrophotométrie est réalisée en mélangeant 2 mL de cet extrait méthanolique avec 100 µl du réactif (NEU* à 1% dans le méthanol). La lecture des résultats a été faite à 409 nm. L'absorption de l'extrait a été comparée à celle de la quercétine (0,05 mg/mL) traitée avec le même réactif dans les mêmes conditions. Les flavonoïdes totaux sont calculés selon la formule suivante (Hariri et *al.*, 1991) :

$$F\% = A_{\text{ext}} \times 0,05 \times 100 / A_{\text{q}} \times C_{\text{ext}}$$

A_{ext} : Absorption de l'extrait.

A_q : Absorption de la quercétine (à concentration de 0,05 mg/mL).

C_{ext} : Concentration de l'extrait en mg/mL.

b- Extraction des aglycones et anthocyanes

L'extraction des aglycones et des anthocyanes est présentée dans la figure 23 :

- Hydrolyse acide

2 g de poudre de matériel végétal ont été ajoutés à 200 mL de HCl 2N froid, puis portés au bain marie bouillant pendant 40 mn avec insufflation d'air et agitation régulière toutes les 10 minutes. Après refroidissement et filtration, la solution acide est transférée en ampoule à décanter. L'hydrolyse acide permet la transformation des proanthocyanes en anthocyanes et la libération des aglycones de flavonoïdes de leurs formes O-hétérosidiques. L'extraction est faite selon le protocole de Lebreton et *al.*, (1967).

- Extraction

Elle se fait successivement :

- Par l'éther éthylique (2 fois 20 mL) : les composés phénoliques, sauf les anthocyanes et les C-glucosides quittent l'hypophase acide au profit de l'épiphase éthérée. Les extraits réunis et évaporés sous hotte ventilée sont repris par 10 mL d'éthanol 95°;

- Par le n-butanol (2 fois 20 mL) : cette phase extrait les anthocyanes et les C-glycoflavones. Ce solvant entraîne les anthocyanes colorés en rouge provenant de l'oxydation des proanthocyanes.

c- Examen chromatographique

Après récupération des aglycones par 10 mL d'éthanol 95° dans une fiole jaugée de 10 ml, la séparation des molécules est effectuée à l'aide d'une chromatographie sur papier Whatman n°1. Le solvant utilisé est l'acide acétique 2% qui permet la migration des acides phénols vers le front. Les chromatogrammes sont ensuite examinés sous UV (356 nm) et les bandes observées ont été entourées. La couleur des bandes sous UV est notée et le front servira pour calculer les R_f (rapport frontale).

Les bandes observées sont découpées et éluées dans le méthanol afin de les identifier au spectrophotomètre UV-visible (HP Vectra, programme Chemstation software). Les mesures sont effectuées entre les longueurs d'ondes 260 et 600 nm.

Quand aux flavonoïdes, la migration est effectuée dans l'acide acétique 60% pour la séparation des molécules et une chromatographie sur papier Wattman n°1 est effectuée pour leur purification.

d- Dosage des flavones-flavonols

Le dosage différentiel des flavones et flavonols est basé sur la chélation spécifique des flavonoïdes par les ions Al³⁺.

- Dans la cuve de référence est placée la solution alcoolique convenablement diluée.
- Dans la cuve de mesure est placée la solution alcoolique amenée à la même dilution mais avec une solution alcoolique d'AlCl₃ à 1%. Après 10 mn de contact, le spectre est enregistré au spectrophotomètre UV-visible entre 380 et 460 nm pour les aglycones. La présence des flavonols est indiquée par un pic entre 420 et 440 nm et celle des flavones par un maximum d'absorption entre 390 nm et 415 nm. La hauteur du pic différentiel est proportionnelle à la concentration en aglycones flavoniques (Jay et *al.*, 1975). Ainsi la teneur en aglycones exprimée comme quercétine (flavonol témoin) est calculée selon la formule suivante :

$$T_{\text{aglycones}} = (DO / \epsilon) \cdot M \cdot V \cdot d / p$$

T aglycones : teneur en aglycones (en % ou en mg/g) ;

DO : Densité optique du pic différentiel ;

ϵ : Coefficient d'absorption molaire de la quercétine (= 23000) ;
M : Masse molaire de la quercétine (= 302) ;
V : Volume de la solution éthanolique d'aglycones ;
d : Facteur de dilution ;
p : Poids sec de matériel végétal hydrolysé.

Pour les anthocyanes, la phase aqueuse acide résiduelle est extraite 2 fois par le n-butanol. Ce solvant entraîne les anthocyanes colorés en rouge provenant de l'oxydation des proanthocyanes. Ces anthocyanes sont dosées par spectrophotométrie entre 480 et 600 nm (Lebreton et *al.*, 1967 ; Porter, 2001). La teneur en proanthocyanes (le rendement de la transformation des proanthocyanes en anthocyanes étant pratiquement constant dans des conditions standardisées) exprimée comme procyanidine est donnée par la formule suivante :

$$T_{\text{anthocyanes}} = (DO / \epsilon) \cdot M \cdot V \cdot d / p$$

T anthocyanes : teneur en anthocyanes (en % ou en mg/g) ;
DO : Densité optique à la longueur d'onde d'absorption maximale ;
 ϵ : Coefficient d'absorption molaire de la cyanidine (=34700) ;
M : Masse molaire de la procyanidine (=306) ;
V : Volume de la solution butanolique ;
d : Facteur de dilution ;
p : Poids sec de matériel végétal hydrolysé.

e- Analyse par CCM

Chromatographie sur couches minces (CCM) :

Nous avons utilisé le papier Wathman n°1 pour la séparation des aglycones flavoniques dans les solvants acide acétique 2 % et 60 %.

Les flavonols et flavones sont visibles sous UV, ce qui permet d'en relever les Rf. Les spots sont récupérés et élués par le MeOH. Des cochromatographies avec des substances témoins sont réalisées. Les comportements chromatographiques notés pour l'identification des molécules majoritaires des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* sont :

- ✓ Les fluorescences visualisées à l'oeil nu ;
- ✓ Les fluorescences visualisées et après pulvérisation par le NEU ;

- ✓ Les colorations des bandes révélées sont visualisées sous lumière ultra violette (UV).

Les relevés de Rf, ont été faits sur papier Whatman n°1 et sur gel de silice. L'identification a nécessité une comparaison avec les données de la littérature.

La figure 25 résume les différentes étapes du dosage et de l'étude spectroscopique des flavonoïdes, des acides phénols, des anthocyanes et des aglycones majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*.

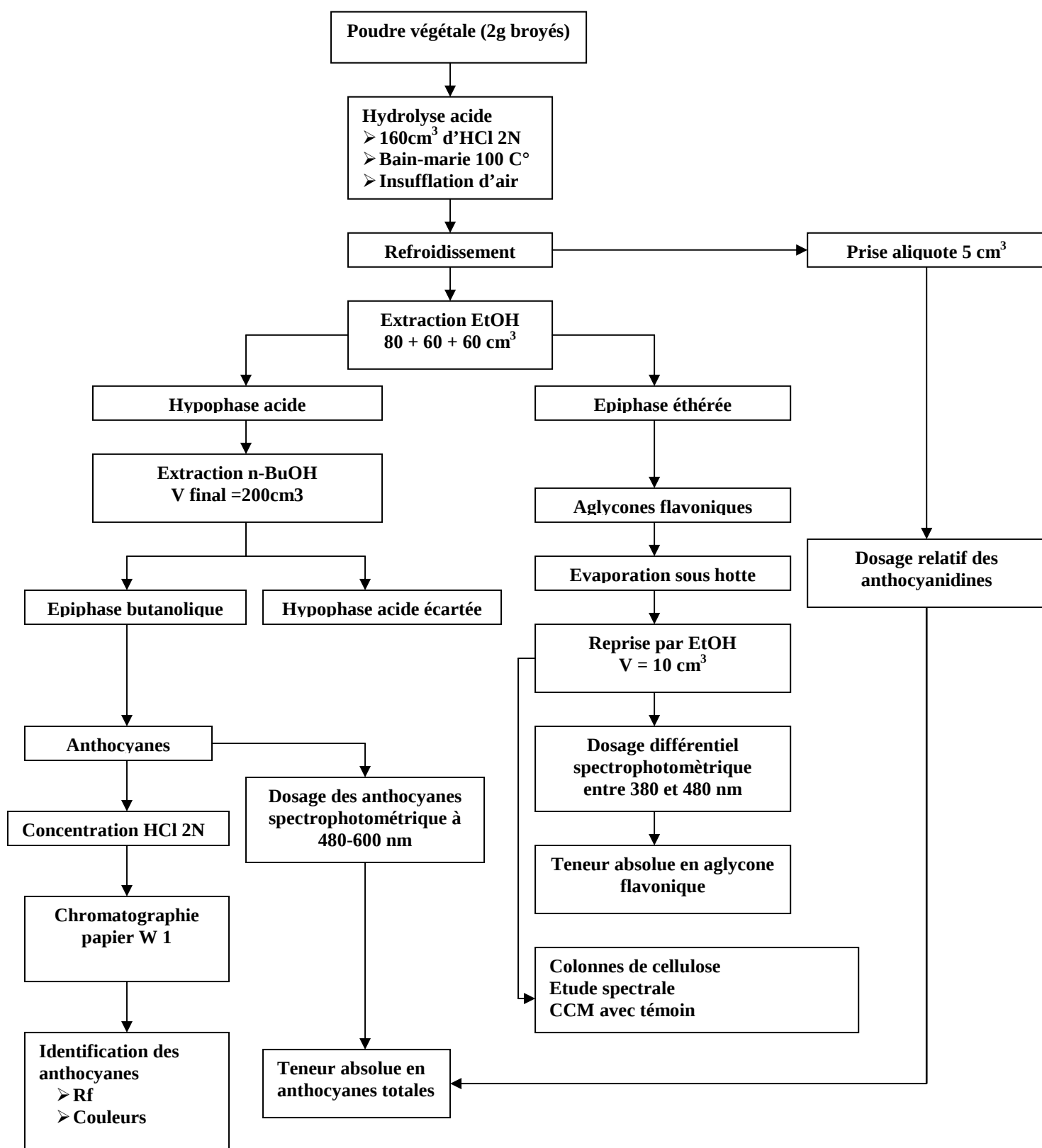


Figure 25 : Schéma explicatif de l'étude spectroscopique des flavonoïdes, des acides phénols, des anthocyanes et des aglycones majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

III- Extraction et analyse des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*

III-1- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles des parties aériennes (séchées et découpées) de l'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* a été réalisée à l'aide d'un appareil appelée Clevenger décrit à la pharmacopée française (1984). Il s'agit d'une hydrodistillation des parties aériennes effectuée par entraînement à la vapeur d'eau. La distillation est conduite en utilisant 300 g de la partie aérienne de chaque plante et 1000 mL d'eau distillée pendant un temps bien défini estimé après une étude cinétique de la durée de l'extraction par hydrodistillation.

III-2- Analyse par GC-MS des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*

L'analyse des huiles essentielles des plantes étudiées a été effectuée par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS au Département de Pharmacologie de la Faculté de Pharmacie de Valence, Espagne.

L'analyse GC-MS a été faite sur un spectromètre du thermomass (modele trio 1000) couplé à un chromatographe en phase gazeuse (modèle 8000). L'appareillage utilisé est de marque Hewlett-Packard. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire (25 m long $\times$ 0,25 mm). La colonne est programmée à une température de 60°C pendant 6 min, avec 5 °C d'augmentation par min puis porté à 150 °C; il a été maintenu pour 10 min. Le gaz vecteur est l'hélium pulsé à la vitesse de 2 mL/mn. Les températures de détecteur et de l'injecteur ont été maintenues respectivement à 250 et 225 °C. Le spectromètre de masse a été réalisé en utilisant la gamme 28-400 amu.s⁻¹, avec un voltage ionisant de 70 eV et un courant de l'ionisation de 150μA.

Les composés ont été identifiés par MS et leurs identités ont été confirmées en comparant leurs indices de rétention relative à C8-C32 n-alkanes selon Kovats (1958) et en comparant leurs spectres de masse et le temps de rétention avec ceux de produits de différences ou avec les données déjà décrites dans la bibliothèque NIST ou la banque de donnée informatisée (Adams, 2001).

IV- Extraction, séparation, purification et identification des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

IV-1- Extraction de la plante

a- Extraction par soxhlet

1 kg de matériel végétal sec finement broyé d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* a été mis dans une cartouche et extrait à l'aide du chloroforme en utilisant le soxhlet comme matériel d'extraction. Nous avons utilisé le soxhlet pour l'extraction d'une quantité plus importante de poudre sèche en vue de fractionnement phytochimique. La durée d'extraction est estimée à 16 h.

b- Décirage de l'extrait

Après extraction par soxhlet, une évaporation du chloroforme a été faite à l'aide du rotavapor (Heidolph VV 2000) pour calculer le rendement de l'extrait obtenu. L'ajout de 150 mL de chloroforme (CHCl_3) et de 650 mL de méthanol bouillant de l'extrait a permis d'éliminer les cires. Le décirage a été effectué à une température de -20°C pendant une nuit.

c- Extraction du produit de décirage

L'extrait a été filtré, évaporé, pesé et solubilisé dans le dichlorométhane. Ensuite, un lavage de (3×20 mL) a été effectué en utilisant une solution de Na_2CO_3 à 10%. L'extraction a été faite à l'aide d'une ampoule à décanter pour obtenir une phase organique et une phase aqueuse.

La phase aqueuse a été acidifiée jusqu'à $\text{pH}=2$ en utilisant une solution de HCl à 50% puis, extraite par CH_2Cl_2 (3×20 mL) pour avoir une phase aqueuse et une phase organique. Cette dernière a été lavée avec $\text{NaCl}/\text{H}_2\text{O}$, séchée avec Na_2SO_4 et évaporée pour avoir une phase organique acide. La phase organique a été aussi le résultat du lavage par Na_2CO_3 à 10%. Cette phase a subi le même protocole de la phase organique acide. La phase organique neutre obtenue de cette dernière extraction à l'aide du dichlorométhane a été pesée avant de passer au fractionnement par chromatographie sur colonne.

La figure 26 résume les différentes étapes d'extraction des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*.

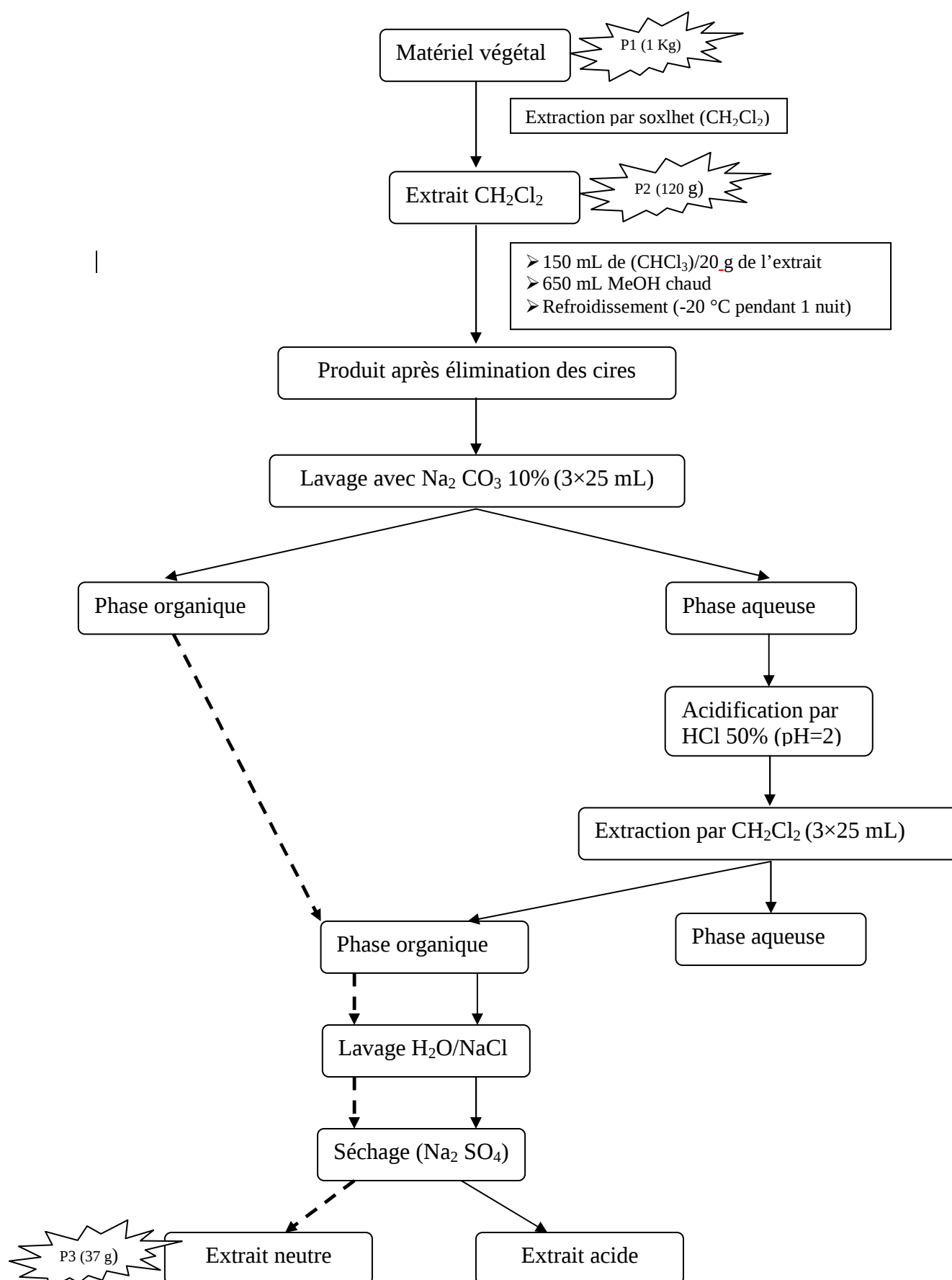


Figure 26 : Protocole d'extraction des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*.

IV-2- Séparation de l'extrait organique neutre

a- Chromatographie sur couches minces

Une étape préliminaire a été effectuée en utilisant la CCM à base de silice d'une épaisseur de 0,25 mm dans le but de choisir le ou les meilleurs solvants de séparation de l'extrait neutre.

La CCM a été aussi utilisée lors de la séparation par colonne afin de rassembler les fractions obtenues. La visualisation de ces plaques a été faite sous lampe UV (365 nm et 254 nm) après un chauffage à une température de 100°C. Le réactif utilisé pour la révélation des bandes est une solution de l'acide phosphomolybdate.

b- Fractionnement par chromatographie sur colonne

L'extrait neutre (37 g) a été fractionné sur une colonne ouverte de gel de silice après élution par un mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante. La chromatographie sur colonne a donné quatre fractions importantes : la fraction 1 (1,37 g) a été éluée avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (9:1), donnant le composé C1 (20 mg) et le composé C3b (11,6 mg). De la fraction 2 (1,5 g), les composés C2 (62,9 mg) et C3a (59,3 mg) ont été isolés après CC avec l'éther de pétrole/ Et_2O (3:2). La fraction 3 (3,5 g) éluée avec l'hexane/ Et_2O (1:1) a donné le composé C3c (345,4 mg). Enfin, la fraction 4 (0,85 g) a été séparée avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (4.95:0.05) pour donner le composé C3d (111,7 mg) (Figure 27).

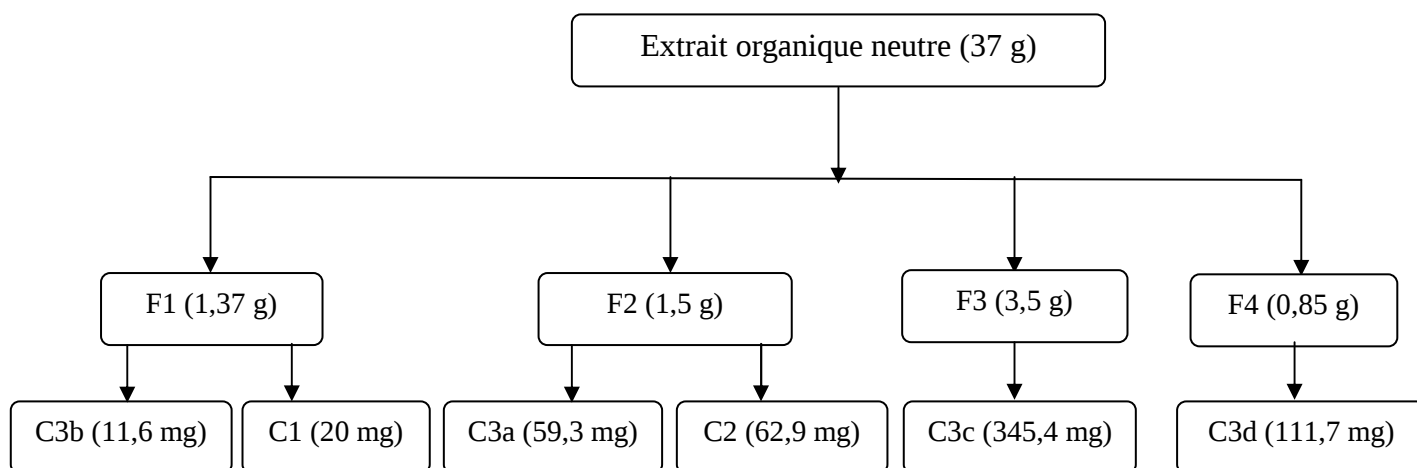


Figure 27 : Fractionnement de l'extrait organique neutre d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

IV-3- Identification spectrale des produits isolés

a- Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres infrarouges ont été effectués après avoir mélangé les produits purifiés dans des plaques de NaCl, par un spectrophotomètre de type Génisis Series FTIR de Mattson.

b- Spectroscopie de masse (MS)

Les caractéristiques de MS sont déjà présentées dans la partie de la composition chimique des huiles essentielles.

c- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur Varian Gemini 300 et Varian Inova 400. Les déplacements chimiques sont référencés au signal résiduel CHCl_3 à δ 7,26 ppm. Les spectres RMN ^{13}C ont été référencés à la crête centrale de CDCl_3 à δ 77,0 ppm. Les spectres HMBC et COSY ont été enregistrés avec des séquences Varian standard gradient d'impulsion.

V- Activité antifongique des extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*

Il est important de noter que le choix de ces champignons est principalement dû aux dégâts causés dans les stations de conditionnements et les serres de la région d'Agadir.

a- Préparation des extraits des plantes

Une quantité de 50 g de matière sèche des feuilles et des fleurs de chaque plante a été finement broyée et extraite par soxhlet selon la méthode préconisée par la Pharmacopée française (1984). En utilisant trois solvants de polarité croissante : l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Chaque solvant permet d'extraire un ensemble de composés secondaires (Cowan, 1999).

Après évaporation des solvants d'extraction, des solutions mères de 1000 mg/L pour chaque extrait ont été préparées en utilisant l'eau distillée stérile (Khalil et *al.*, 2003).

b- Isolement de l'agent pathogène

L'isolement de l'agent pathogène a été effectué à partir des fruits d'agrumes présentant les pourritures causées par *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Ces derniers ont été isolés à partir des fruits infectés de la station Soussia (Tassila, Agadir). Des morceaux d'écorce infectés sont détachés à l'aide d'une aiguille stérilisée par flambage et après trempage dans l'alcool. Chaque morceau est placé au centre d'une boîte de pétri contenant le milieu de culture Potato-Dextrose-Agar (PDA^{*}). Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 25°C pendant sept jours. Après purification par des repiquages successifs sur PDA, le champignon est isolé puis conservé à 4°C sur le même milieu de culture.

c- Tests d'activité antifongique des extraits

L'étude de l'activité antifongique des extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* a été effectuée sur un milieu solide en prenant 2 ml de la solution mère de chaque extrait. Après autoclavage à une température de 120°C pendant 20 min d'une solution de 39 g de PDA dans 1 l d'eau distillé, une agitation pendant quelques minutes a été effectuée pour homogénéiser la solution. Les extraits ont été pesés et dilués avec le DMSO (Dimethylsulfoxide) et ajoutés au milieu de culture PDA déjà acidifié (en utilisant HCl et NaOH pour avoir le pH souhaité). Après refroidissement de ce dernier, un disque de 0,5 cm de chaque champignon testé a été déposé sur le milieu de culture pour suivre la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. L'incubation a été faite à une température de 25°C pendant 7 jours. Les manipulations ont été faites dans des conditions d'asepsie. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque test.

d- Calcul de pourcentage d'inhibition

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour comparer l'efficacité des extraits en utilisant la formule suivante :

$$PI = [(A-B)/A] \times 100$$

PI : Pourcentage d'inhibition des champignons testés (*Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*) ;

A : Diamètre moyen de la croissance mycélienne estimé du champignon sur milieu témoin ;

B : Diamètre moyen de la croissance mycélienne estimé du champignon en présence de l'extrait à tester.

^{*} Voir annexe

e- Etude statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Statistica 6.0. Lors de ces analyses nous avons fait appel à l'analyse multivariée de variance ANOVA 2 et ANOVA 3 pour étudier les différentes interactions entre les paramètres étudiés. La plus petite différence significative a été déterminée en utilisant le test de Duncan.

VI- Activité antifongique des huiles essentielles et des produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* et *Asteriscus imbricatus* sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*

VI-1- Tests *in vitro*

Après l'hydrodistillation de la partie aérienne d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* et *Asteriscus imbricatus*, des essais préliminaires ont été effectués dans le but de chercher les concentrations des huiles essentielles à étudier. Les produits purs ont subi des tests similaires après leurs séparations, purifications et identifications. En effet, l'acide caféique, la névadensine, la lutéoline, l'artémétine, le naupliolide et l'asteriscunolide 3c ont été purifiées, identifiées et testées pour leur activité antifongique sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. Quant aux molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* (le thymol isobutyrate, le 2,5-dimethoxy-*p*-cymène, l' α -pinène et le *cis*-chrysanthényle acétate), elles ont été achetées chez Fluka (France). Une série de dilutions de ces concentrations a été effectuée dans l'eau distillée stérile en utilisant 2% de Tween 80 pour la dissolution de ces composés. Le mélange est ensuite soumis à une ultrasonication pendant 5 secondes en maintenant chaque tube dans la glace. Le PDA a été autoclavé, refroidi et acidifié.

Une solution mère des huiles essentielles et des produits purs a été préparée pour obtenir les concentrations finales 0, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 1000 et 2000 ppm qui ont été ajoutées au milieu PDA stérile. 20 ml de la solution a été coulée, sous agitation magnétique, dans les boîtes de pétri. Un disque de 6 mm de diamètre de culture jeune de 7 jours de chaque champignon a été déposé au centre de la boîte de pétri contenant le milieu de culture et les différentes concentrations des huiles essentielles et des produits purs. L'incubation a été effectuée à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 7 jours. Le diamètre de disque des champignons utilisés : *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis*

cinerea reflète la croissance mycélienne du champignon pendant les 7 jours d'incubation. En effet, le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$PI = \frac{(C-T)}{C} \times 100$$

C : Diamètre moyen de 3 répétitions de la croissance mycélienne estimé du champignon testé ou de colonie des spores sur milieu témoin (Cm)

T : Diamètre moyen de 3 répétitions de la croissance mycélienne ou de colonie des spores de boîte, traitées avec l'une des concentrations de l'huile essentielle (Cm).

Pour distinguer entre l'effet fongistatique et fongicide de l'huile essentielle sur l'organisme cible, un transfert de disque de champignon, totalement inhibé, a été fait. L'objectif est d'évaluer la viabilité de ces champignons après une exposition à l'huile à 25 °C pendant 1, 3, 6 et 12 jours.

VI-2- Tests *in vivo*

La méthode utilisée est celle décrite par Wilson et *al.*, (1977) légèrement modifiée. L'huile essentielle extraite de la partie aérienne des plantes étudiées a été testée sur les Clémentines (*Citrus reticulata* cv Blanco. Nules), provenant du verger de la Gazelle à Taroudant, contre la sporulation du *Penicillium digitatum*. Le choix de ce dernier est dû à l'efficacité remarquable de l'huile essentielle sur la croissance mycélienne de ce champignon. Ainsi, on a jugé important de chercher son effet sur un autre stade de développement du champignon qui est la sporulation. Les fruits ont été choisis de même calibre et uniformes, dépourvus des symptômes de maladies et jamais traités par des pesticides. Les fruits ont été trempés dans une solution d'eau de javel 10 % pendant 2 min, rincés trois fois avec de l'eau de robinet et séchés à l'air libre. Des tests préliminaires ont été effectués pour déterminer les conditions de travail et les concentrations à utiliser. Les fruits ont été blessés à l'aide d'une aiguille stérile au niveau de quatre sites équatoriaux équidistants sur le fruit à une profondeur de 2 mm et une largeur de 4 mm. Une solution mère a été préparée pour avoir des concentrations finales de 500, 1000 et 2000 ppm de l'huile essentielle de la plante étudiée. 20 µL de chaque concentration de l'huile essentielle a été déposé dans chaque emplacement de la blessure en utilisant l'eau distillée stérile pour les fruits témoins. Après 30 mn, 20 µL de suspension des spores de *Penicillium digitatum* (10^5 spores ml⁻¹) a été ajouté dans chaque blessure. La concentration des spores a été déterminée en utilisant une cellule de Thoma. Les

fruits ont été incubés à une température de 25°C pendant 10 jours (10 répétitions par traitement). Le nombre de sites inoculés à lésion active est dénombré quotidiennement sur une période de 10 jours et ceci à partir du troisième jour d'incubation.

C- RESULTATS ET DISCUSSIONS

C-1- PREMIERE PARTIE

**Étude phytochimique d'*Asteriscus*
graveolens subsp. *odorus* et *Asteriscus*
*imbricatus***

CHAPITRE I

**Screening phytochimique et caractérisation
spectroscopique des extraits d'*Asteriscus*
graveolens subsp. odorus et *Asteriscus*
*imbricatus***

I- Introduction

Dans le but de rechercher les différentes classes des substances secondaires dans les extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*, nous avons effectué un screening phytochimique par la mise en place d'un ensemble de réactions de caractérisation de différents composés chimiques à savoir : les flavonoïdes, les saponines, les tanins, les alcaloïdes, les anthocyanes, les terpènes et les composés cyanogénétiques.

Le screening phytochimique a porté sur les feuilles et les fleurs des deux plantes afin d'identifier le maximum de composés phénoliques en utilisant le spectrophotomètre UV ainsi que différentes techniques d'analyse.

De plus, une étude qualitative et quantitative (aglycones, anthocyanes et flavonoïdes totaux) ayant pour but principal de définir les types des polyphénols existant dans les feuilles des deux plantes étudiées a été effectuée.

II- Screening phytochimique des extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

II-1- Alcaloïdes :

❖ Test d'Iodoplatinate :

On note la présence des taches bleues après pulvérisation du réactif Iodoplatinate, ce qui traduit la présence des alcaloïdes dans les feuilles et les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

❖ Test de Mayer :

La présence de précipité blanc révèle la présence des alcaloïdes dans les feuilles et les fleurs des deux plantes.

❖ Test de Dragendorff :

Après pulvérisation de la plaque au réactif de Dragendorff et visualisation en lumière naturelle on a obtenu des taches marron orangé dans les feuilles et les fleurs des deux plantes : on confirme ainsi la présence des alcaloïdes.

Les résultats des trois tests confirment la présence des alcaloïdes dans les feuilles et les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

II-2- Coumarines :

❖ Premier test :

L'exposition du chromatogramme à la vapeur de l'ammoniaque et sa visualisation sous UV nous a donné des taches fluorescentes violettes et jaunâtres qui sont caractéristiques de la présence des coumarines chez les feuilles et les fleurs des deux plantes.

❖ Test confirmatif :

L'apparition de la fluorescence jaune sur le filtre prouve que les feuilles et les fleurs des deux plantes contiennent les coumarines.

II-3- Saponines :

Au cours de l'expérience, on a mesuré la hauteur de mousse (Tableau 3) pour calculer l'indice de mousse (Tableau 4). Les résultats obtenus ont montré la présence des saponines chez les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*. En outre, les feuilles des deux plantes sont dépourvues des saponines.

Tableau 3 : Hauteur de la mousse pour les extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

Tubes	Hauteur de la mousse en (Cm)			
	<i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>		<i>Asteriscus imbricatus</i>	
	Fleurs	Feuilles	Fleurs	Feuilles
Tube n° 1	0,6	0,5	0,7	0,6
Tube n° 2	0,5	1,2	0,5	0,6
Tube n° 3	0,7	1,2	0,7	0,9
Tube n° 4	0,6	1,6	1	1,8
Tube n° 5	0,7	1,9	0,9	1,6
Tube n° 6	1,2	1,8	1	2
Tube n° 7	0,8	1,6	1,3	2,2
Tube n° 8	0,4	1,3	1,2	2
Tube n° 9	0,8	2,1	0,7	2,4
Tube n° 10	0,2	1,3	2	2,3

L'indice de mousse est calculé à partir de la formule suivante :

$$I = \text{Hauteur de mousse dans le 9}^{\text{ème}} \text{ tube} \times 10 / 0.09$$

Exemple de calcul :

Hauteur de mousse dans le 9^{ème} tube des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*
= 0,8 cm

$$I = 0,8 \times 10 / 0,09 = 233,33$$

$$I = 88,88 < 100 \longrightarrow \text{Absence des saponines.}$$

Tableau 4 : Indices de mousse sur les extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

Parties des plantes étudiées	Indices de mousse	Présence/absence des saponines
Feuilles d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	88,88	Absence
Fleurs d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	233,33	Présence
Feuilles d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	77,77	Absence
Fleurs d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	266,66	Présence

II-4- Tanins :

Le test des tanins a montré la présence d'une coloration brune verdâtre, ce qui signifie que les feuilles et les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* contiennent les tanins catéchiques.

II-5- Terpènes :

Après pulvérisation de la plaque CCM au chlorure d'antimoine et chauffage à l'étuve (110°C/10 min), on a obtenu une fluorescence bleue ciel, donc on note la présence des terpènes dans les feuilles et les fleurs des deux plantes étudiées.

II-6- Composés cyanogénétiques :

Pour ce test et en comparaison avec des extraits de graines d'abricots qui sont de bons témoins riches en composés cyanogénétiques, on a constaté l'apparition d'une coloration rouge sur le papier filtre. Les parties des plantes étudiées se sont révélées contenir ce type de composés avec des quantités variables selon l'organe analysé.

II-7- Quinones libres :

Le virage de la couleur au jaune de la phase aqueuse révèle la présence des quinones libres dans les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*. Quant aux feuilles, les quinones libres ne sont pas détectées dans les deux plantes (Tableau 5).

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats des tests de caractérisation des quinones libres dans les extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus*

Parties des plantes étudiées	Couleur	Présence/absence des quinones
Feuille d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	Phase aqueuse claire	Absence
Fleur d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	Phase aqueuse qui vire au jaune	Présence
Feuille d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	Phase aqueuse claire	Absence
Fleur d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	Phase aqueuse qui vire au jaune	Présence

imbricatus.

III- Dosage et caractérisation spectroscopique des flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

III-1- Dosage des flavonoïdes totaux, des aglycones flavoniques et des anthocyanes

Le dosage de différents composés phénoliques des feuilles des deux plantes a révélé une teneur importante en aglycones flavoniques estimée à 3,34 mg/g pour *Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et à 2,75 mg/g pour *Asteriscus imbricatus*.

On note que les flavonoïdes sont abondants dans les extraits des feuilles d'*Asteriscus imbricatus* plus que chez celles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*. En outre, le taux des flavonoïdes des deux plantes reste minime par rapport aux feuilles de l'arganier qui est riche en flavonoïdes (Tahrouch, 2000), surtout la quercétine (utilisées comme témoin). Quant aux anthocyanes, elles présentent une très faible teneur chez les deux plantes (Tableau 6).

Tableau 6 : Teneurs en flavonoïdes, en anthocyanes et en aglycones des extraits des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

	Teneur en mg/g	
	<i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	<i>Asteriscus imbricatus</i>
Aglycones	3,34	2,75
Anthocyanes	0,02	0,1
Flavonoïdes	1,62	2,05

III-2- Fractionnement de l'extrait étheré et caractérisation des acides phénols et des flavonoïdes aglycones des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et d'*Asteriscus imbricatus*

L'étude qualitative a permis de caractériser les principaux composés phénoliques des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et d'*Asteriscus imbricatus*. Une diversité du pool phénolique a été observée chez les deux plantes. Pour cette raison, une étude spectrophotométrique basée sur les caractéristiques spectrales et chromatographiques a été nécessaire pour l'identification des différentes molécules phénoliques. Deux grandes familles des composés phénoliques ont été mises en évidence : les acides phénols et les aglycones flavoniques en utilisant les solvants : acide acétique 2% et 60%.

Les analyses effectuées ont montré différentes fluorescences sous UV correspondant à des hétérosides flavoniques, entre autres les flavones et les acides phénols. En présence des témoins on pourrait caractériser les fractions obtenues, et ce en comparant leur comportements chromatographiques.

III-2-1- Caractérisation des molécules majoritaires des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

a- Groupe des acides phénols

Après une première séparation par CCM de l'extrait étheré dans l'acide acétique à 2%, les bandes ont été découpées et mises dans le méthanol. Deux composés ont été isolés (B₁ et B₂). Une chromatographie bidimensionnelle a été nécessaire pour la vérification de la pureté des fractions.

Le premier composé B₁ est incolore à l'œil nu, il se présente sur le chromatogramme sous forme d'une tache bleue sous UV, d'une couleur jaune verdâtre après pulvérisation par le NEU, son R_f est de 0,30 et son spectre d'absorption une longueur d'onde λ_{max} de : 234nm – 298nm – 325nm (Figure 28). D'après la littérature (Lebreton *et al.*, 1967; Voirin, 1983; Jay *et al.*, 1975 ; Idrissi-Hassani, 1985; Touati, 1985), les données du composé B₁ sont les mêmes que celle de l'acide caféique (Figure 29).

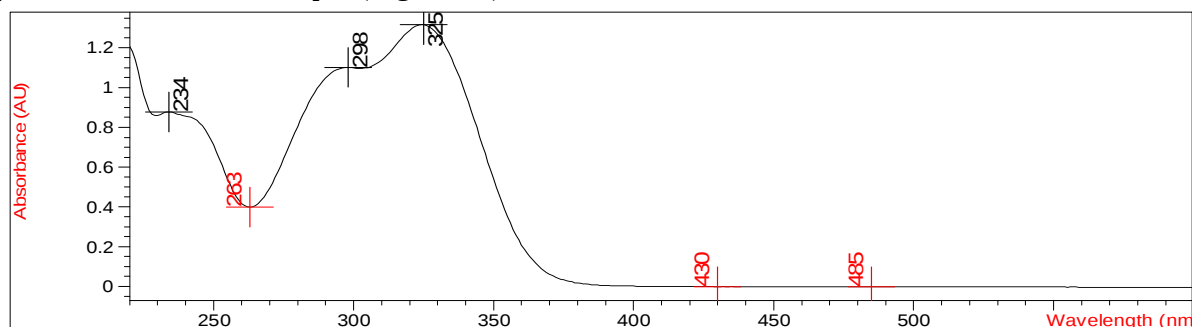


Figure 28: Spectre d'absorption du composé B₁ isolé de l'extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

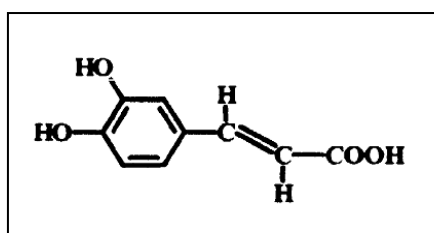


Figure 29 : Structure de l'acide caféique.

Le deuxième composé B₂ pourrait être un acide benzoïque puisqu'il présente les caractéristiques suivantes (Figure 30) :

- Incolore à l'œil nu, de couleur jaune sous UV et jaune claire après la pulvérisation par le réactif du NEU
- R_f = 0,84
- λ_{max} : 222nm – 279nm

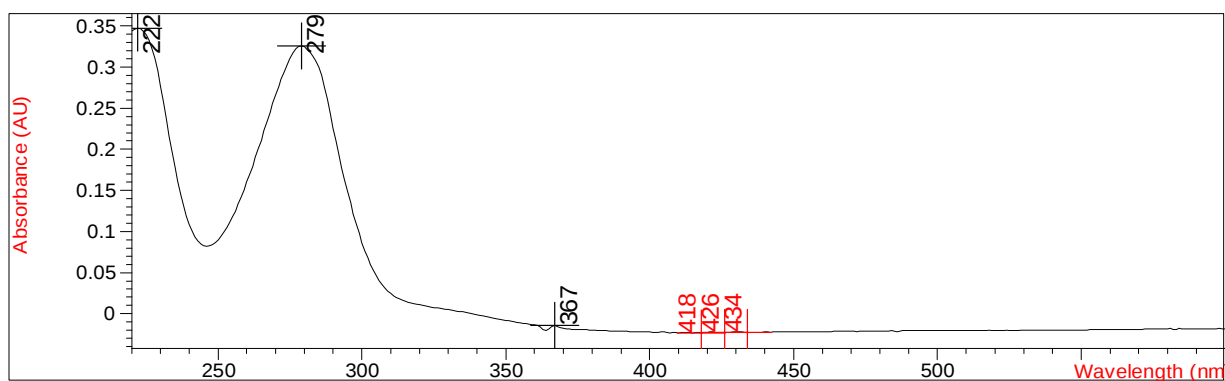


Figure 30 : Spectre d'absorption du composé B₂ isolé de l'extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

b- Groupe des aglycones flavoniques

Dans notre étude, la purification des aglycones flavoniques sur papier Whatman n°1 en utilisant comme solvant de migration : l'acide acétique 60% nous a permis d'isoler différentes molécules. Ainsi, en comparant leurs différentes propriétés physiques et spectroscopiques avec celles de la littérature, nous avons pu identifier trois flavones. La bande B1 correspondrait à la névadensine (Figure 31) avec une longueur d'onde de λ_{max} : 286nm-328nm (Figure 32), incolore à l'œil nu, de couleur mauve sous UV et un R_f = 0,74. La bande B2 correspondrait à la lutéoline (Figure 33) avec une longueur d'onde de λ_{max} : 254nm-267nm-347nm (Figure 34), incolore à l'œil nu, de couleur brune foncée sous UV et un R_f = 0,59. Quant à la bande B3, il représenterait l'artémétine (Figure 34) avec un λ_{max} : 274nm-339nm (Figure 35), de couleur jaune claire à l'œil nu et brune sous UV et un R_f = 0,69.

On note que les feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* sont dépourvues des proanthocyanes. Cela est confirmé par l'absence de cette famille des composés secondaires lors du dosage de cette plante par le spectrophotomètre UV.

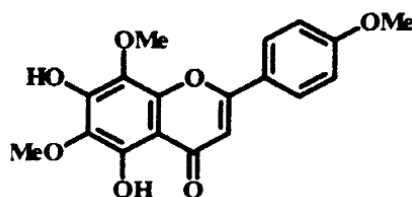


Figure 31 : Structure de névadensine .

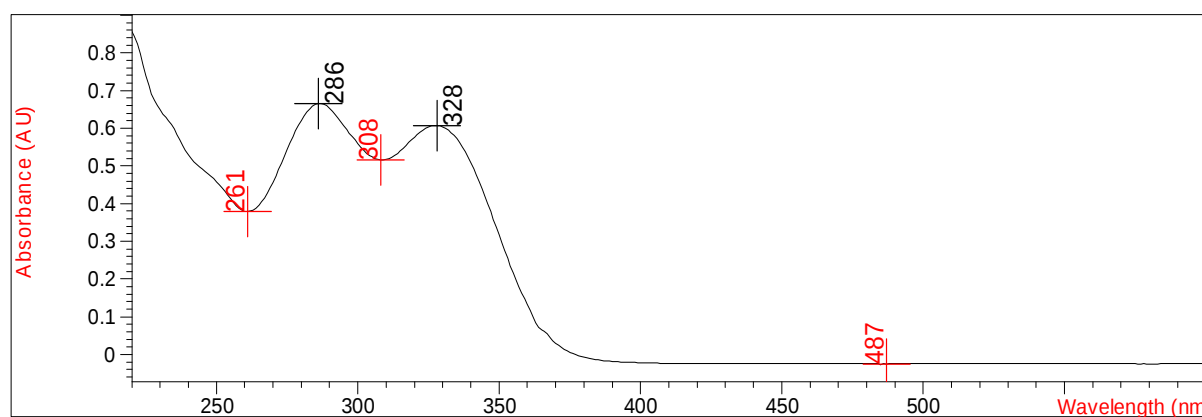


Figure 32 : Spectre d'absorption du composé B1 de l'extrait *Asteriscus graveolens subsp. odorus*

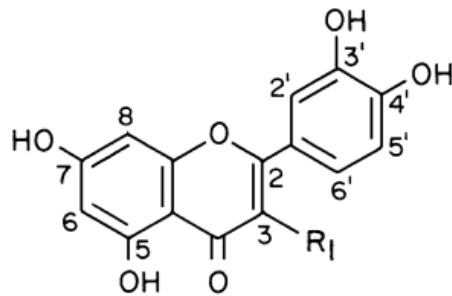
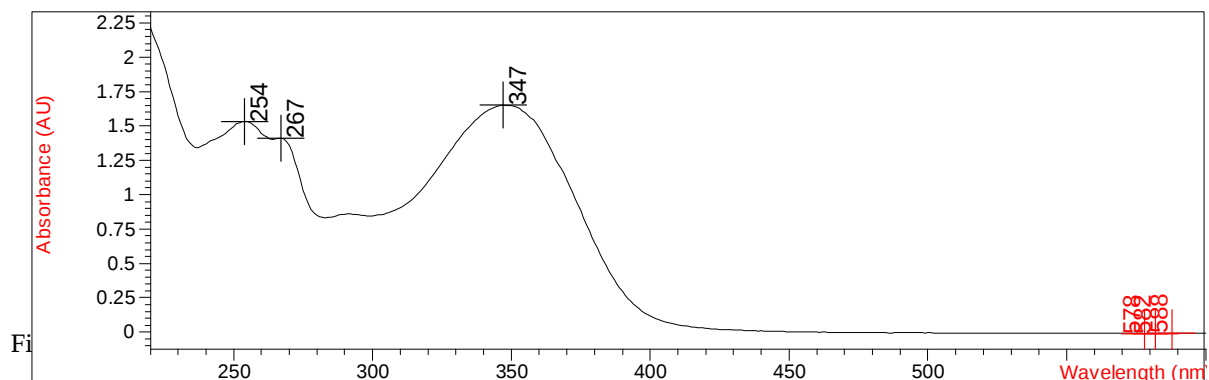


Figure 33 : Structure de lutéoline .



Une CCM bidimensionnelle a montré que la bande brune foncée migre en un seul spot : la molécule est supposée être pure.

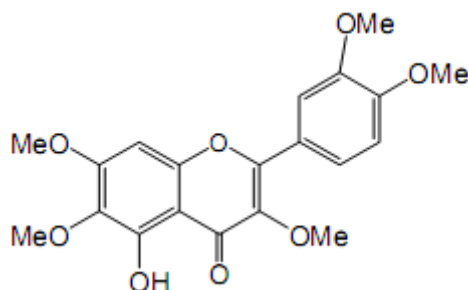


Figure 35 : Structure d'artémétine .

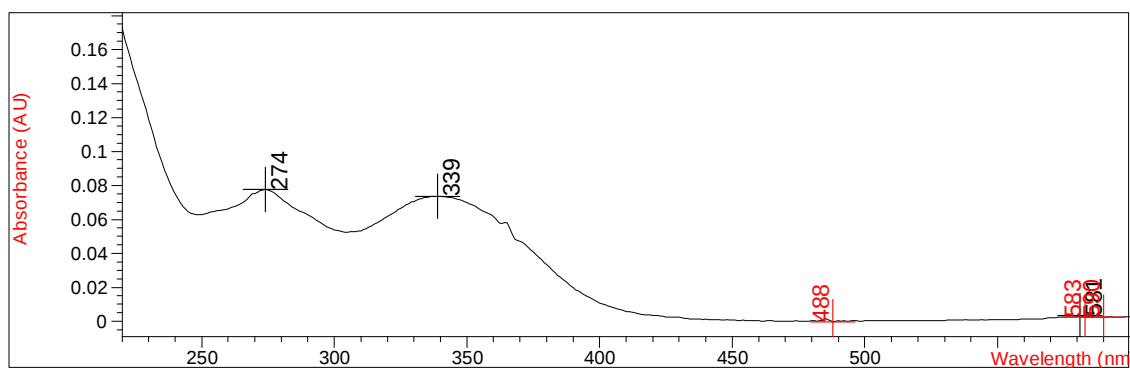


Figure 36 : Spectre d'absorption du composé B3 de l'extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*
Après une CCM bidimensionnelle on a trouvé que la bande brune migre toute seule : la molécule est supposée être pure.

III-2-2- caractérisation des molécules majoritaires des extraits des feuilles d'*Asteriscus imbricatus*

Il est important de noter qu'une seule molécule a été identifiée pour *Asteriscus imbricatus* (artémétine). Quant aux autres molécules, elles sont purifiées et en cours d'identification. Ainsi, nous avons obtenu 5 bandes des acides phénols et 3 bandes des aglycones flavoniques avec ces caractéristiques chromatographiques (Rf, couleur à l'œil nu et couleur en utilisant l'UV). Ces caractéristiques sont présentées dans les tableaux 7 et 8. Quant à leurs spectres d'absorption, ils sont transférés aux annexes.

Tableau 7 : Caractéristiques chromatographiques de l'extrait des feuilles d'*Asteriscus imbricatus* après migration dans l'acide acétique 2%.

Bandes	Rf	Couleur à l'œil nu	Fluorescence sous UV	Longueur d'onde des pics maxima en nm
B1	0,75	Jaune	Jaune verdâtre	291-342
B2	0,48	Incolore	Verdâtre claire	289-369
B3	0,42	Jaune	Vert foncé	290-265
B4	0,37	Incolore	Bleu à marron	293-429-485
B5 (artémétine)	0,24	Jaune	bleu	324-296-432

Tableau 8 : Caractéristiques chromatographiques de l'extrait des feuilles d'*Asteriscus imbricatus* après migration dans l'acide acétique 60%.

Bandes	Rf	Couleur à l'œil nu	Fluorescence sous UV	Longueur d'onde des pics maxima en nm
B1	0,53	Incolore	Jaune à incolore	274-332
B2	0,45	Incolore	Bleu	271-340
B3	0,69	Jaune clair	Brune	275-338

On note la présence de l'artémétine dans les extraits des feuilles d'*Asteriscus imbricatus* (Figure 37), tout comme chez les extraits des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*. Ceci pourrait être expliqué par le rapprochement botanique des deux plantes constituant le genre *Asteriscus*.

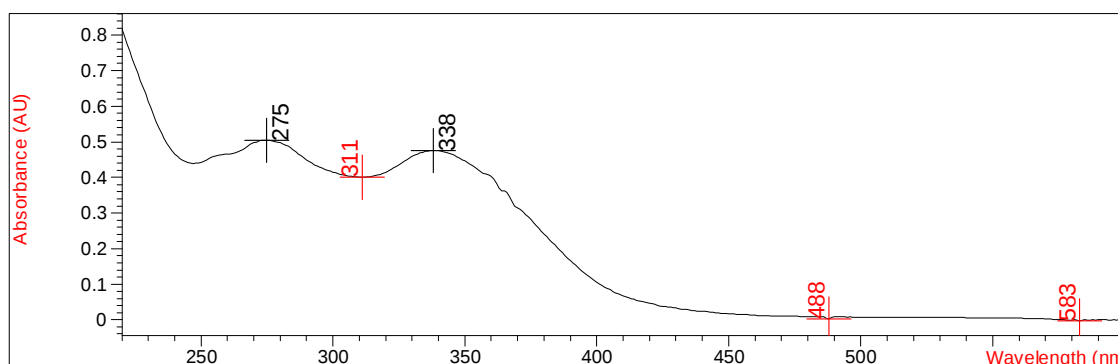


Figure 37: Spectre d'absorption du composé B3 de l'extrait d'*Asteriscus imbricatus*

IV- Evaluation des potentialités des plantes étudiées à la lumière des composés révélés suite au screening et à la caractérisation phytochimique

Le screening phytochimique des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* a montré la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des terpènes, des coumarines et des composés cyanogénétiques. Quand aux saponines et les quinones libres, ils sont absents dans les feuilles et se sont révélées présents dans les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*.

Cette étude a été effectuée pour la première fois afin de prospector les différents métabolites secondaires existants chez ces deux plantes du Sud du Maroc. En effet, les flavonoïdes jouent un rôle important dans la coloration des végétaux (Ribéreau-Gayon et Reynaud, 1968). Ils sont utilisés dans la chimiotaxonomie végétale (Idrissi Hassani, 1985 ; Swain, 1963 ; Alston et Turner, 1963 ; Lebreton et Meneret, 1964). Ils jouent le rôle des marqueurs de la maturation des fruits (Macheix et Fleurit, 1993). Les polyphénols ont aussi le rôle de la protection contre les agressions biotiques et abiotiques, de l'activité antifongique (Swiader et Lamer-Zarawska, 1996), de l'activité antivirale (Ono et *al.*, 1990 ; Ono et Nakane, 1990), de l'activité anti-oxydante (De Whally et *al.*, 1990 ; Oyama et *al.*, 1994 ; Wedworth et Lych, 1995 ; Morel et *al.*, 1998 ; Miura et *al.*, 1995, 1998 ; Duthie et Dobson, 1999) et de l'activité anti-inflammatoire (Hiermann et *al.*, 1991, 1998).

Le groupe des acides phénols a un rôle très important dans la pigmentation des fleurs et des fruits et la protection des plantes contre les herbivores et les radiations UV. De plus, ce sont des antihépatotoxiques, anti-allergiques, antioxydants, anti-inflammatoires, anti-virales, anti-tumorales, anticancéreuses et anti-spasmodiques (Bate-Smith, 1954 ; Asad et *al.*, 1998 ; Di Carlo et *al.*, 1999).

La présence des alcaloïdes peut expliquer des activités biologiques diverses (Milcent et Chau, 2003). Quant aux terpènes, ils servent comme des additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques (Tsao et Coats, 1995) et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques: antimicrobienne, insecticide, anti-carcinogénique, anti-inflammatoire (Murakami et *al.*, 2004 ; Griffin et *al.*, 1999), anesthésique et antihistaminique (des mono et sesquiterpènes), diurétique (β -eudesmol) (Velickovic et *al.*, 2003 ; Hsiou et *al.*, 2000), neuroprotective (α -terpinène, γ -terpinène, et trans-caryophyllène) (Hyun et *al.*, 2007).

On peut citer également les propriétés anti-tumorales et cytotoxiques des diterpènes (taxol), et des activités anti-oxydantes attribuées surtout aux diterpènes phénoliques (Hill, 1993).

La présence des coumarines explique l'effet antifongique (Sardari et *al.*, 1999), antibactérien (Kwon et *al.*, 1997, Kayser et Kolodziej, 1997), antiviral (Fuller et *al.*, 1994), antimalarial (Yang et *al.*, 1992), anti-inflammatoire (Chen et *al.*, 1995 ; Okada et *al.*, 1995 ; Lino et *al.*, 1997 ; Hiermann et Schlantl, 1998 ; Garcia-argaez et *al.*, 2000), anti-tumoral (Seliger, 1997 ; Kofinas et *al.*, 1998 ; Fujioka et *al.*, 1999) et anticoagulant (Egan et *al.*, 1990).

Cliniquement parlant, la lutéoline est reconnue pour sa capacité de stimuler certaines hormones estrogènes (Zand et *al.*, 2000), d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses (Matsukawa et *al.*, 1993) et la tumorigénèse (Elangovan et *al.*, 1994) et également de piéger l'action nocive des radicaux libre au niveau de l'ADN (Qiuyin et *al.*, 1997).

La lutéoline est une substance antibactérienne importante (Askun et *al.*, 2009) et elle pourrait aussi être responsables de l'effet antioxydant (Vagi et Rapavi, 2005).

Dans d'autres études présentées par Lee et *al.*, (1995) et Materska et *al.*, (2003), les flavonoïdes extraites des fruits de *Capsicum* sont constitués principalement de quercétine et de lutéoline.

Quant à la névadensine, elle a été isolée pour la première fois à partir de l'espèce *Iva ajuga* par Farkas et *al.*, (1966). Cette molécule a été aussi le sujet de plusieurs études (Du et Gao, 1992; Chidiak et *al.*, 2007; Feresin et *al.*, 2003; Greenham et *al.*, 2001; Barros-Filho et *al.*, 2007; Kukongviriyapan et *al.*, 2007; Brahmachari et *al.*, 2006).

La névadensine présente une large activité biologique. En effet, elle a été connue par son activité antioxydante (Ganapaty et *al.*, 2008), antitumorale (Chung et Geahlen, 1992), anticancéreuse, antiinflammatoire (Reddy et *al.*, 1991), Hypotensive (Song et *al.*, 1985) et antimicrobienne (Brahmachari, 2008).

Une étude présentée par Bayeux et *al.*, (2002) a montré que l'artémétine, isolée de *Cordia curassavica* (*Boraginaceae*) et testée chez les souris mâles, présente une importante activité antiedématogénique.

Les tableaux 9 et 10 récapitulent les résultats obtenus après le screening phytochimique et l'identification spectroscopique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

Tableau 9 : Différents groupes des métabolites secondaires existants chez les feuilles et les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

	Alcaloïdes	Coumarines	Saponines	Tanins catéchiques	Terpènes	Composés cyanogénétiques	Quinones libres
Feuilles d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	+	+	-	+	+	+	-
Fleurs d' <i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	+	+	+	+	+	+	+
Feuilles d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	+	+	-	+	+	+	-
Fleurs d' <i>Asteriscus imbricatus</i>	+	+	+	+	+	+	+

+ : Présence ; - : Absence

Tableau 10 : Récapitulation des comportements spectroscopiques des molécules identifiées des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

Classe des polyphénols	Molécules	Rf	Lumière naturelle	Fluorescence sous UV	Couleur après NEU	Pics λ max (nm)
Acides phénols	Acide caféique	0,30	Incolore	Bleue	Jaune verdâtre	234-298-325
	Acide benzoïque	0,84	Incolore	Jaune	Jaune claire	222-279
Flavone	5,7-dihydroxy-6,8,4'-méthoxy Névadensine	0,74	Incolore	Mauve	Jaune verdâtre	286-328
Flavone	Ttr-5,7,3',4'-hydroxy-3',4',5'-méthoxy Lutéoline	0,59	Incolore	Brune	Jaune	254-267-349
Flavone	5-hydroxy-3,3',4',6,7-pentaméthoxy Artemétine	0,69	jaune clair	Brune	Jaune claire	274-339

V- Conclusion

Malgré l'importance biologique et médicinale d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*, ces espèces n'ont auparavant été étudiées que du point de vue botanique et écologique. Pourtant, la présente étude a démontré la grande richesse de la plante en polyphénols, produits naturels à intérêt considérable dans le domaine pharmacologique.

Ce travail apporte, donc, une contribution phytochimique à la connaissance d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* et permet ainsi, de mieux comprendre les propriétés pharmacodynamiques des extraits de deux plantes précitées. Il serait, donc, très intéressant d'exploiter ces plantes pour la recherche de leurs principes actifs, responsables de leurs propriétés pharmacologiques.

Le screening phytochimique a montré la présence des alcaloïdes, des coumarines, des tanins, des terpènes et des composés cyanogénétiques. En outre, les saponines et les quinones libres sont présentes chez les fleurs des deux plantes étudiées et absentes chez les feuilles de ces deux plantes.

Quant à l'étude spectrophotométrique de la fraction éthérée, elle nous a permis d'identifier les différents composés phytochimiques à savoir : un acide phénol (acide caféique), un acide benzoïque et trois flavones (névadensine, lutéoline et artemétine) chez les feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

Il est important de noter qu'on a identifié la molécule d'artémétine chez les feuilles d'*Asteriscus imbricatus* et que le reste des molécules est en cours d'identification.

CHAPITRE II

**Composition chimique des huiles
essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp.*
odorus et *Asteriscus imbricatus***

I- Introduction

La valorisation des huiles essentielles, considérées comme des ressources naturelles importantes, peut avoir des retombées économiques considérables pour notre pays. En effet, différentes plantes contiennent des huiles essentielles composées de molécules ayant des activités biologiques et ayant de fortes valeurs ajoutées.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont 300 environ sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (Essawi et Srouf, 2000).

Ce chapitre résume l'étude qualitative et quantitative des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*. En effet, une analyse par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS) a été faite pour la première fois sur les huiles essentielles de ces deux plantes dans le but de déterminer la nature et les quantités des composés.

II- Etude de la la cinétique d'extraction et de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

II-1- Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

Après hydrodistillation de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* à l'aide du clevenger, le rendement d'extraction de la partie aérienne a été estimé à 0,3 mL pour 100 g du matériel végétal. L'huile essentielle de cette plante présente une couleur jaune verdâtre et une odeur agréable et forte.

Dans un premier temps et dans le but d'optimiser la durée d'extraction, nous avons étudié la cinétique du rendement en huile essentielle par rapport à la matière sèche. La figure 38 montre que le rendement d'extraction augmente progressivement jusqu'à 4 heures pour atteindre un plateau. Le temps optimum de cette hydrodistillation est d'environ 4 heures. Ainsi, nous proposons de fixer la durée d'hydrodistillation d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* à 4 heures.

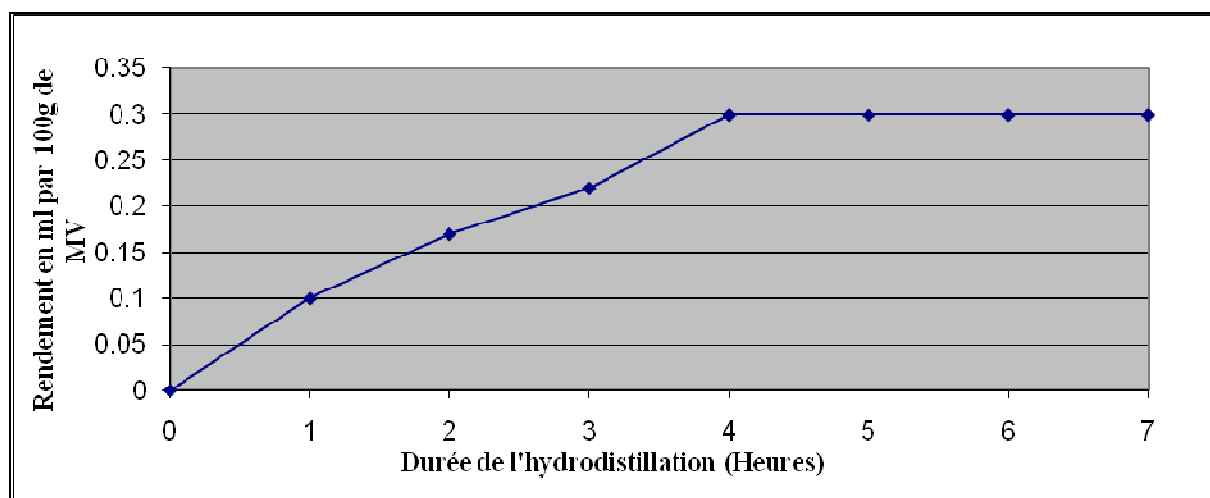


Figure 38 : Cinétique de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*.

II-2- Analyse chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* a été réalisée pour la première fois en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette analyse a révélé la présence de 28 composés chimiques, soit 69,14% de la composition chimique totale de l'huile essentielle de cette plante (Tableau 11).

Tableau 11 : Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

Composés	RT	RI	Pourcentage (%)
α -pinène	939	7.04	4.22
Camphene	954	7.60	0.03
Sabinene	975	8.65	tr
β -Pinene	979	8.69	0.03
6-Methyl-5-Hepten-2-One	979	9.36	0.03
Myrcene	991	9.51	0.11
p-Cymene	1025	11.04	0.04
Limonene	1029	11.23	0.02
1,8-Cineole	1031	11.33	0.02
Benzenacetaldehyde	1042	12.01	0.04
α -Camphenol	1122	15.99	0.04
Trans-Verbenol	1145	16.88	0.09
Myrtenol	1196	19.39	0.30
trans-Chrysanthenyl acetate	1238	22.52	2.00
Myrtenylacetate	1327	25.41	2.54
β -Caryophyllene	1419	29.37	0.25
α -Ionone	1428	30.27	0.06
α -Humulene	1452	30.86	2.41
allo-aromadendrene	1460	31.11	0.14
dehydro-aromadendrane	1462	31.26	0.03
γ -Cadinene	1514	33.30	0.35
δ -Cadinene	1523	33.69	0.40
6-oxocyclonerolidol	-	35.91	30.72
Humulene epoxyde II	1604	37.15	3.50
epi- α -Cadinol	-	38.40	14.50
α -Bisabolone oxide	-	41.14	3.56
Zerumbone	-	41.58	0.21
Bisabolone	1742	42.21	3.50
Total			69.14

tr : trace <0.01. RI : Indices de Rétention. RT: Temps de Rétention

Les sesquiterpènes de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* se sont révélés très abondants, soit 59,63% du total des composés identifiés de l'huile. Le 6-oxocyclonerolidol et l'epi- α -cadinol constituent les composés majoritaires de l'huile essentielle de cette plante, soient respectivement de 30,72% et 14,50%. D'autres sesquiterpènes sont considérés comme des produits minoritaires : bisabolone, α -bisabolone oxide, humulene epoxyde II et α -humulene, représentant respectivement 3,50%, 3,56%, 3,50% et 2,41%. Quant aux monoterpènes, ils ne représentent que 9,51% dont 7,42% de monoterpènes hydrocarbures et 2,09% de monoterpènes oxygénés. L' α -pinène est considéré comme le produit majoritaire des monoterpènes (4,22%). Le myrtenylacetate et le trans-chrysanthényle acétate présentent des quantités faibles de monoterpènes, soient respectivement 2,54% et 2%.

Le 6-oxocyclonerolidol est aussi présent chez *Asteriscus graveolens* avec une quantité importante estimée à 66,7% de la quantité totale de l'huile essentielle de cette plante (Znini et *al.*, 2011). Quant à Jakupovic et *al.*, (1987), ils ont identifié le même composé par RMN chez *Asteriscus sericeus*.

L' α -pinène est le produit majoritaire de l'huile essentielle de plusieurs plantes comme : *Cinnamomum brenesii* et *Cinnamomum costaricanum* (soit respectivement de 14,7% et 8,7%), *Pleurothyrium palmanum* (39,7%), les feuilles et les racines d'*Espeletiopsis angustifolia* (soient respectivement de 29,9% et 27,9%) (Meccia et *al.*, 2007), *Cupressus dupreziana* (11,2%) (Ramdani et *al.*, 2011) et *Ferulago Bernardii* (17%) (Khalighi-Sigaroudi et *al.*, 2005).

Des quantités similaires de l' α -humulene ont été retrouvées dans l'huile essentielle de la plante *Eugenia sp. nov.* (2%) (Stokes et *al.*, 2007) et dans les feuilles de *Stemodia maritima* (2,1%) (Arriaga et *al.*, 2007). Quant aux huiles de feuilles de *Bursera simaruba*, *Humulus lupulus* et *Humulus lupulus*, l' α -humulene a été trouvé comme un produit majoritaire, représentant respectivement 13,25%, 22,7%, et 17,4% (Sylvestre et *al.*, 2007, Nance et Setzer, 2011).

Il est important de noter que l'humulene epoxyde II a été observé des doses différentes chez les huiles essentielles des plantes : *Vepris heteropylla* (1,6%), *Ocimum basilicum* L. cv. (1,8%), *Valeriana alliariifolia* (3,6%), *Humulus lupulus* Hallertauer (4%) et *Perovskia scrophulariifolia* (7,9%) (Ngassoum et *al.*, 2007, Sajjadi, 2006, Bardakci et *al.*, 2011, Nance et Setzer, 2011 et Nuriddinov et *al.*, 1997).

La présence de l'epi- α -cadinol a été notée chez les huiles de plusieurs plantes telles que *Ocimum basilicum* L. cv. Purple (5,9%), *Anacardium occidentale* L. (4,7%), *Uvaria ovate* (13,2%), *Angelica urumiensis* (5,76%) (Sajjadi, 2006, Kossouoh et *al.*, 2008, Muriel et *al.*, 2011. Mohammadi et *al.*, 2010).

Contrairement à l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* qui ne représente que 3,56% de l' α -bisabolone oxide, la plante *Chamomilla recutita* présente une quantité élevée de la composition totale de l'huile estimée à 13,9% (Raal et *al.*, 2011).

Dans d'autres études de recherche, le trans-chrysanthényle acétate a été noté abondant chez l'huile essentielle d'*Artemisia sagebrush* (12,76%), de *Chrysanthemum coronarium*

(13,2%) et de *Tanacetum parthenium* (22,1%) (Nezhadali et Parsa 2010, Basta et *al.*, 2007, Polatoglu et *al.*, 2010).

III- Etude de la cinétique d'extraction et de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*

III-1- Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

Le rendement de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*, après une hydrodistillation à l'aide du clevenger, a été estimé à 0,16 ml pour 100 g du matériel végétal. Ce rendement, qui dépend de nombreux facteurs (stade de croissance, conditions pédoclimatiques, technique d'extraction, etc.) pourrait être nettement supérieur chez d'autres *Astéracées*, des *Anthémidées* comme l'Armoise (Sefidkon, 2001).

La cinétique du rendement en huile essentielle durant 7 heures d'extraction a montré que le temps optimum de l'hydrodistillation durant lequel la vitesse d'extraction augmente progressivement pour atteindre un plateau est d'environ 5 heures. L'augmentation de la durée d'extraction peut engendrer des pertes de composés qui sont sensibles à la température (Morin et *al.*, 1985). Pour cela nous avons jugé important de mettre fin à l'hydrodistillation de l'appareil végétatif d'*Asteriscus imbricatus* à la fin de la 5^{ème} heure (Figure 39).

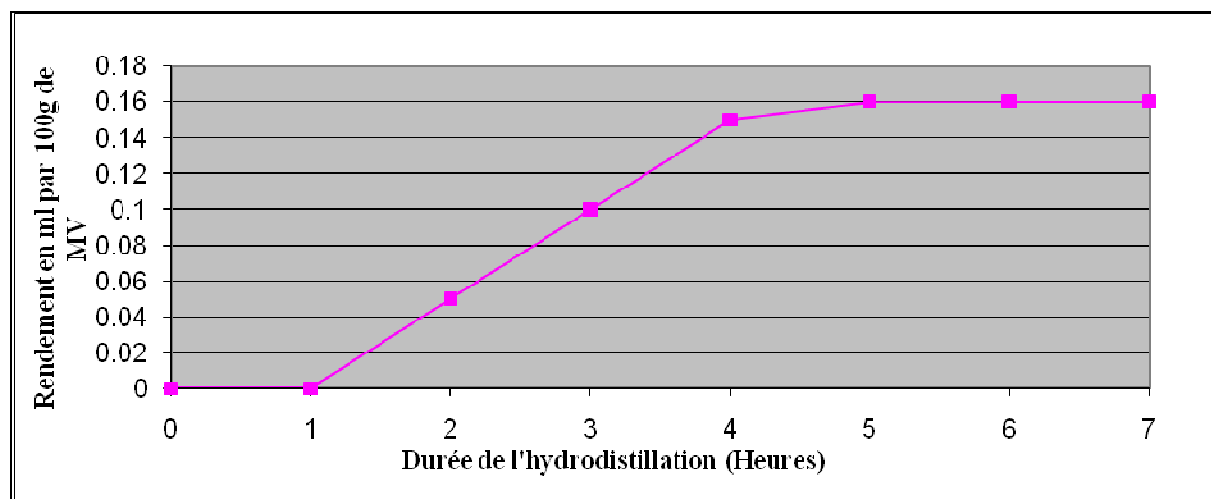


Figure 39 : Cinétique de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*.

III-2- Analyse chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*

L'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* est de couleur jaune claire. L'analyse de cette huile par GC/MS a révélé la présence de 51 composés, soient 59,82% de la composition

chimique totale de l'huile essentielle. 24 de ces composés sont des hydrocarbures et 27 sont des composés oxygénés. On note la présence des produits majoritaires et d'autres en petites quantités. Le thymol isobutyrate et le 2,5-diméthoxy-para cymène sont les composés les plus dominants dans cette huile, représentant respectivement (18,32%) et (16,21%). L' α -pinène et le cis-chrysanthényle acétate présentent des quantités modérées estimées respectivement à 8,22% et 5,53%. D'autres composés en faibles quantités ont été révélés tels que l'épi- α -cadinol (2,53%), l' α -cadinol (1,54%) et l' δ -cadinène (1,20%) (Tableau 12).

Il est important de noter que la fraction monoterpénique s'est révélée présente en grande quantité (75%). Le thymol isobutyrate, le cis-chrysanthényle acétate et le 2,5-diméthoxy-p-cymène sont les composés les plus abondants des monoterpènes oxygénés, soient respectivement 18,32%, 8,22% et 16,21%. Quant aux monoterpènes hydrocarbures (α -pinène 5,53%), ils ne représentent que 0,02% à 0,16%. D'ailleurs, Hatanaka et *al.*, (1987) ont montré que les constituants principales des huiles sont des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$.

20 sesquiterpènes ont été identifiés et représentés par l'épi- α -cadinol (2,53%) δ -cadinène (1,20%), l' α -cadinol (1,54%). Les sesquiterpènes représentent plus que 1% de la quantité totale de l'huile essentielle. On note aussi la présence de 12 composés oxygénés représentant 35% du total de l'huile.

D'après l'étude présentée par Cheriti et *al.*, (2007), il est important de noter que les huiles essentielles des deux espèces *Asteriscus imbricatus* et *Asteriscus graveolens subsp. Stenophyllus*, appartenant au genre *Asteriscus*, contiennent des composés similaires, à savoir l' α -pinène, le chrysanthényle acétate, le cadinol et l' α -pinène.

Il est important de noter que le cis-chrysanthényle acétate a été trouvé en grande quantité chez plusieurs plantes. En effet, l'huile essentielle d'*Anthriscus cerefolium* var. *trichocarpa* présente plus que 74% de la quantité totale de l'huile (Chizzola, 2011). Les huiles essentielles d'*Artemisia absinthium* et de *Stachys pilifera* présentent aussi des quantités élevées estimées respectivement de 17,6% et 21,8% de la composition totale des huiles de ces plantes (Sharopov, 2011, Javidnia et *al.*, 2006). Quant à l'huile de *Chrysanthemum coronarium*, elle ne dépasse pas 9,9% (Basta et *al.*, 2007).

Tableau 12 : Composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Asteriscus imbricatus*.

Composés	KI	Pourcentage (%)
α -pinène	939	5,53
Camphene	954	0,13
Benzaldehyde	960	0,02
Verbenene	968	0,04
Sabinene	977	0,05
β -Pinene	980	0,16
β -Myrcene	992	0,06
α -Phellandrene	1006	0,05
Δ^3 -Carene	1010	0,04
α -Terpinene	1019	0,02
Limonene	1032	0,02
γ -Terpinene	1063	0,02
Linalol	1100	0,02
Nonanol	1102	0,02
<i>cis-p</i> -Meth-2-en-1-ol	1124	0,12
α -Campholenal	1128	0,02
<i>trans</i> -Pinocarveol	1140	0,02
<i>cis</i> -Verbenol	1142	0,09
<i>p</i> -Menth-1,5-dien-8-ol	1170	0,12
Terpinen-4-ol	1177	0,02
α -Terpineol	1192	0,02
Thymol, methyl ether	1235	0,90
Carvotanacetone	1247	0,12
<i>cis</i> -Chrysanthenyl acetate	1265	8,22
Bornyl acetate	1289	0,35
Thymol	1290	0,08
Carvacrol	1302	0,02
α -Copaene	1380	0,08
β -Bourbonene	1388	0,02
Methyl eugenol	1404	0,02
β -Caryophyllene	1419	0,17
2,5-dimethoxy- <i>p</i> -Cymene	1427	16,21
<i>cis</i> -Muurola-3,5-diene	1452	0,10
9- <i>epi</i> - β -Caryophyllene	1466	0,11
<i>cis</i> -Muurola-4(14), 5-diene	1467	0,18
<i>trans</i> -Cadina-1(6), 4-diene	1477	0,16
γ -Muurolene	1481	0,11
Germacrene D	1486	0,38
Thymol isobutyrate	1492	18,32
<i>epi</i> -Cubenol	1495	0,43
α -Muurolene	1500	0,77
α -Cubenol	1515	0,02
δ -Cadinene	1525	1,20
α -Cadinene	1539	0,10
α -Calacorene	1546	0,08
Nerolidol	1566	0,08
<i>ar</i> -Tumerol	1583	0,42
<i>epi</i> - α -cadinol	1644	2,53
α -Muurolol	1648	0,40
α -cadinol	1654	1,54
Manoyl oxide	1998	0,11
Total		59,82

KI : Les indices de Kovats calculés par rapport C8-C23 n-alcanes sur la colonne HP OV-17

IV- Comparaison de la cinétique d'extraction et de la composition chimique des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

IV-1- Comparaison de la cinétique d'extraction des huiles essentielles

Le rendement de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* estimé de 0,3 ml pour 100 g du matériel végétal est relativement plus important que le rendement de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* estimé de 0,16 ml pour 100 g du matériel végétal (Figure 39).

L'étude de la cinétique du rendement en huile essentielle après une hydrodistillation a montré que le temps d'extraction d'*Asteriscus imbricatus* est plus long (5 heures) que celui d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* (4 heures) durant 7 heures d'extraction (Figure 40).

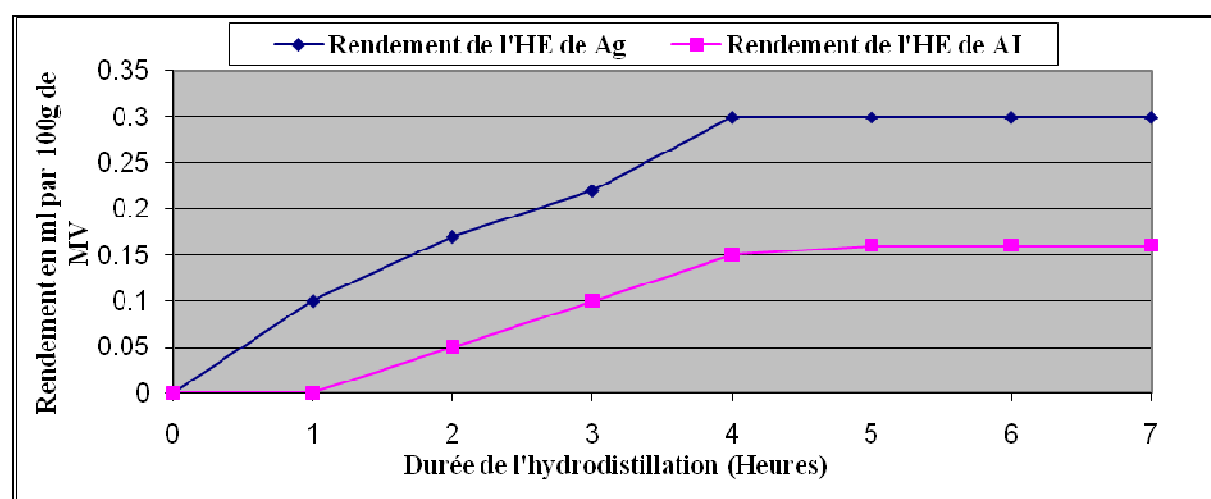


Figure 40 : Cinétique de l'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*.

IV-2- Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

En comparant la composition chimique des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*, on constate une différence aussi bien dans la nature que la teneur des composés des huiles essentielles des deux plantes.

En outre, le pool chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* est très diversifié et présente un grand nombre de composés chimiques estimé à 51 quoiqu'il ne représente que 59,82% du total de l'huile. Quant au pool chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*, qui représente 69,14% du total de l'huile, il ne compte seulement que 21 composés chimiques. En outre, l'étude présentée par Cheriti et *al.*, (2007) a montré que le pool chimique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. stenophyllus* représente 97,3% du total de l'huile, et ne compte que 43 composés chimiques.

Le rapprochement botanique des deux espèces *Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* appartenant au genre *Asteriscus* peut expliquer la présence de certains composés communs dans les deux huiles essentielles. En effet, le camphène, le myrcène, le limonène, le verbenol, le β -caryophyllène et le cadinène sont présents dans les deux huiles essentielles, mais ils ne représentent qu'une faible dose de la quantité totale des huiles essentielles. Quant l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*, elle contiennent presque la même quantité de l' α -pinène, que celle d'*Asteriscus imbricatus* (estimé respectivement à 4,22% et 5,53%,). En outre, il est important de noter que l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* est plus riche en epi- α -cadinol que l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*, soient respectivement des teneurs de 14,5% et 2,35%.

La comparaison entre les huiles essentielles des deux plantes a montré que celle d'*Asteriscus imbricatus* contient des quantités élevées et très différentes de monoterpènes, soit de 75%, contrairement aux monoterpènes des huiles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* qui ne dépassent pas 9,51%. Quant aux sesquiterpènes, *Asteriscus graveolens subsp. odoratus* en est riche, soit de 59,63%, contrairement à *Asteriscus imbricatus* qui n'en représente que 1% de la quantité totale de l'huile essentielle.

De grandes quantités de monoterpènes et de sesquiterpènes oxygénés ont été trouvées dans la plante *Asteriscus graveolens subsp. stenophyllus*, soient respectivement de 58,70% et 21,4% Cheriti et *al.*, (2007).

La composition chimique totale des huiles essentielles récupérées présente une différence, aussi bien quantitative que qualitative, entre les deux plantes étudiées. Cette différence peut être expliquée par plusieurs phénomènes physico-chimiques et facteurs altérant les huiles essentielles à savoir :

- La matière chimique présente dans le végétal fait l'objet de réactions chimiques diverses : hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisations pouvant être catalysées par des métaux présents à l'état de traces dans la plante, provoquant des transformations chimiques des constituants (Koedam, 1982) ;
- L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit durant le chauffage du végétal. Elle conduit à la formation d'acides organiques, qui à leur tour catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation. La dégradation du sabinène donne un exemple des transformations chimiques de l'huile essentielle lors de l'hydrodistillation (Koedam et *al.*, 1980) ;
- Les traitements survenus avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle.

Les étapes successives conduisant à l'isolement d'une essence et les diverses transformations susceptibles de l'accompagner, se traduisent par la modification de la teneur en certains constituants ou par la formation de nouveaux composés, d'où une grande variabilité de sa composition. De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle.

V- Conclusion

Dans le présent travail, nous avons effectué une étude quantitative et qualitative des huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* et *Asteriscus imbricatus*. L'étude quantitative a montré que l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* présente un faible rendement estimé de 0,16 ml pour 100 g du matériel végétal. Quant à *Asteriscus graveolens subsp. odor*, le rendement est relativement plus important que l'huile d'*Asteriscus imbricatus*, soit de 0,3 ml pour 100 g du matériel végétal. Ainsi, l'extraction de l'appareil végétatif d'*Asteriscus imbricatus* demande 5 heures d'hydrodistillation contrairement à *Asteriscus graveolens subsp. odor* qui nécessite uniquement 4 heures.

Cette étude a révélé la présence des produits majoritaires et d'autres en faibles quantités des huiles essentielles des deux plantes étudiées. En effet, l'huile d'*Asteriscus imbricatus* présente une grande quantité de thymol isobutyrate et de 2,5-dimethoxy-*p*-cymene estimés respectivement de 18,32% et de 16,21%. L' α -pinène et le cis-chrysanthenyle acétate

présentent des quantités modérées, soient respectivement de 8,22% et 5,53%. Quant à *Asteriscus graveolens subsp. odor*, le 6-oxocyclonerolidol et l'*epi*- α -cadinol constituent les composés majoritaires de l'huile essentielle de cette plante, soient respectivement de 30,72% et 14,50%. Les composés : bisabolone, α -bisabolone oxide, humulene epoxyde II et α -humulene, présentent une quantité modérée estimée respectivement à 3,50%, 3,56%, 3,50% et 2,41%. L' α -pinène, le myrtenylacetate et le trans-chrysanthenyle acétate présentent les monoterpènes majoritaires de cette huile, soient respectivement 4,22%, 2,54% et 2%.

L'exploitation des résultats phytochimiques a été faite dans le but de valoriser les huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* et *Asteriscus imbricatus* par le biais de l'activité antifongique contre quelques champignons qui attaquent les fruits et légumes en post-récolte. En effet, l'identification de la composition chimique de ces huiles essentielles, est considérée comme une étape préliminaire et indispensable pour dévoiler les matières actives pouvant contribuer à expliquer leur effet antifongique.

CHAPITRE III

Extraction, séparation, purification et identification des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*

I- Introduction

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures. La valorisation médicinale de ces pratiques passe notamment par l'isolement et l'identification de nouvelles molécules.

Ce travail est une contribution dans la recherche de principes actifs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*, plante médicinale endémique du Sud du Maroc.

L'objectif principal de cette étude est l'extraction, la séparation, la purification et l'identification par les différentes méthodes spectroscopiques, de la structure chimique des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*.

II- Identification des lactones sesquiterpéniques majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

En utilisant les solvants hexane-acétate d'éthyle, la chromatographie sur colonne ouvert de silice a fourni quatre fractions importantes, les différents composés obtenus ont été séparés en utilisant des solvants appropriés. En effet, le composé C1 et C3b ont été obtenus en séparant la fraction 1 [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (9:1)]. La fraction 2 a donné les composés C2 et C3a [Ether de pétrole/ Et_2O (3:2)]. Quant à la fraction 3, elle a donné le composé C3c [Hexane/ Et_2O (1:1)]. Enfin, la fraction 4 a été la source du composé C3d [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (4.95:0.05)].

Dans la présente étude, nous rapportons l'isolement d'une nouvelle molécule de lactone sesquiterpène d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* nommée naupliolide (C1), ainsi que plusieurs composés connus tels que le 6,7,9,10-tétrahydroasteriscanolide (C2) et les asteriscunolides (C3a, C3b, C3c et C3d) (Figure 40) (San Feliciano et al., 1985a, El-Dahmy et al., 1985).

II-1- Identification du nouveau composé C1

Les différentes étapes d'identification du nouveau composé C1 sont les suivantes :

Le composé C1 se présente sous forme de poudre blanche amorphe. Il a un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +80$ ($c=0.11$; CHCl_3). La formule moléculaire de ce composé a été déterminée comme $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$ par HREIMS, m/z 246,13 indiquant 7 degrés d'insaturations. Le spectre infrarouge a montré une bande d'absorption à 1765 cm^{-1} correspondant à la bande d'absorption du groupement carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) du squelette γ -lactone et une deuxième bande d'absorption 1660 cm^{-1} correspondant au groupe cétone à α,β -insaturés.

Le spectre ^{13}C RMN (Tableau 13) du composé C1 montre la présence de 15 signaux, dont chacune représente le signal de résonance d'un carbone. La présence d'une double liaison trisubstituée qui peut être établie par ceux à 136,2 ppm (singulet) et 138,7 ppm (doublet).

Les signaux restants, présentent une multiplicité correspondante à deux CH_3 , trois CH_2 , cinq CH et un carbone quaternaire. Leur valeur de δ est caractéristique du carbone sp^3 non fonctionnalisé. Ainsi, le composé 1 contient 3 fonctions insaturées et possède quatre cycles dans sa structure.

Le spectre ^1H RMN présente des signaux : à 6,34 ppm (1H, ddq, $J = 8.9, 7.7, \text{ et } 1.3\text{ Hz}$) caractéristique d'une double liaison trisubstituée conjuguée par le groupe cétone, à 1,84 ppm (3H, s) et 1,34 ppm (3H, s) caractéristiques de deux groupements méthyle.

Tableau 13 : Spectres ^1H RMN et ^{13}C RMN DEPT du composé C1 (CDCl_3 , TMS).

No.	δ_{H}	δ_{C}	DEPT
1 α	4.66 (1H, d, $J = 4.2\text{ Hz}$)	87.7	CH
2 α	2.59 (1H, ddd, $J = 9.9, 6.7, 4.2\text{ Hz}$)	45.2	CH
3 α	2.94 (1H, ddd, $J = 6.6, 6.4, 4.2\text{ Hz}$)	47.9	CH
4 α	1.79 (1H, dddd, $J = 15.0, 10.3, 6.2, 6.2\text{ Hz}$)	23.9	CH ₂
4 β	2.39 (1H, dddd, $J = 15.0, 9.0, 4.0, 1.3\text{ Hz}$)		
5 α	2.30 (1H, dddd, $J = 15.5, 9.0, 8.9, 6.2\text{ Hz}$)	30.8	CH ₂
5 β	2.54 (1H, ddddq, $J = 15.5, 10.2, 7.5, 1.3, 1.3\text{ Hz}$)		
6	6.34 (1H, ddddq, $J = 8.9, 7.7, 1.3\text{ Hz}$)	129.7	CH
7	-	138.4	C
8	-	198.7	C
9 β	3.66 (1H, dd, $J = 9.9, 4.2\text{ Hz}$)	135.0	C
10 β	1.61 (1H, ddd, $J = 8.1, 4.0, 4.0\text{ Hz}$)	150.9	CH
11	-	49.1	C
12	-	176.9	C
13	1.84 (3H, sa)	26.7	CH ₃
14 α	0.57 (1H, dd, $J = 6.0, 4.0\text{ Hz}$)	20.7	CH ₃
14 β	0.64 (1H, dd, $J = 7.9, 6.0\text{ Hz}$)		
15	1.34 (3H, s)	22.6	CH ₃

Par ailleurs, un signal à 4,66 ppm (1H, d. $J=4,2$ Hz) a été attribué à un proton lié à un carbone oxygéné. D'autres signaux à savoir 0,57 ppm (1H, dd, $J=6.0$ et 8.0 Hz), 0,64 ppm (1H, dd, $J=6.0$ et 4.0 Hz), et 1,61 ppm (1H, ddd, $J=8.4$ et 4.0 Hz) ont été attribués à un cycle cyclopropane. L'interprétation des signaux restants a été faite à l'aide de 2D-RMN, HSQC et ^1H - ^1H HCOSY permettant d'établir la structure partielle du C1. Tous les protons sont liés avec une corrélation directe à l'exception de groupement méthyle à 1,34 ppm dans ^1H RMN.

Les corrélations HMBC (Figure 41) permettent de joindre le composé C1 au groupement méthyle et de déterminer les liaisons entre le reste des fragments structuraux de ce composé. Ainsi, la structure carbonatée du composé C1 a été établie.

La stéréochimie de la double liaison a été déterminée par la corrélation NOE observée pour H_6 et Me-C_7 en spectre 1D-NOESY. La configuration relative de six carbones stériogéniques ont également été établies par le spectre 1D-NOESY (Figure 42) et $J_{\text{H}_2-\text{H}_9}=9.9\text{Hz}$, confirmant qu'il n'y a pas de relation entre ces protons. En outre, les corrélations NOE observées pour $\text{H}_5\beta\text{H}_9$ et $\text{H}_4\beta\text{H}_9$ sont en accord avec la conformation bateau pour la raie cyclooctène. Ainsi, la caractérisation structurale du composé C1 a montré que c'est un nouveau squelette tetracyclique sesquiterpénique nommé naupliolide (Figure 43).

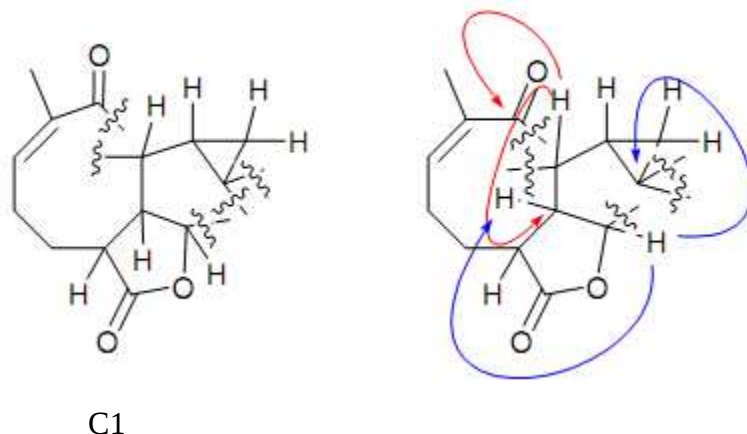


Figure 41 : Structure partielle et les corrélations HMBC du composé C1

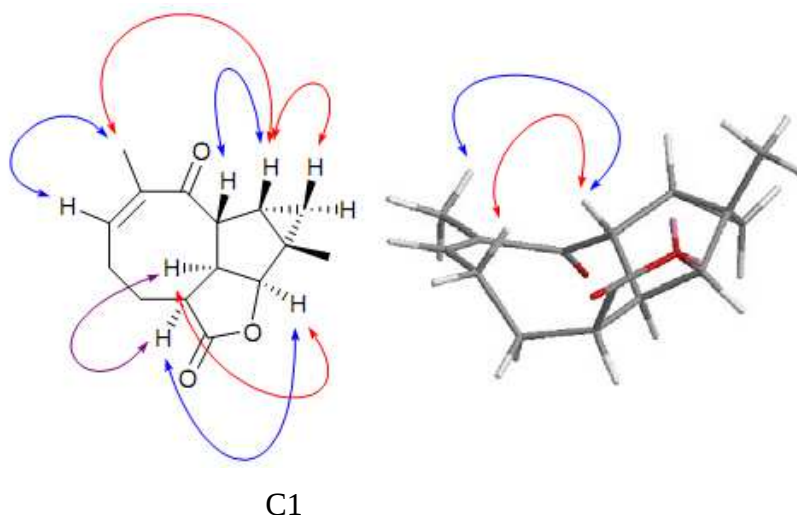


Figure 42 : Corrélations NOESY du composé C1.

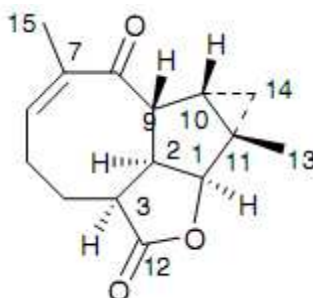


Figure 43 : Structure de naupliolide : 14,15-diméthyl-7,13-dioxotricyclic[6.4.0.0^{9,11}]dodéca-12,13-olide.

II-2- Identification du composé C2

Le produit C2 (Figure 43) est un composé solide avec des cristaux blancs. Il présente un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +30$ ($c=0.16$; CHCl_3). Le spectre de masse de ce produit montre un pic ionique $m/z = 246,12$ compatible avec la formule brute $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$.

Le spectre infrarouge a montré une bande d'absorption à 1780 cm^{-1} indiquant la présence du groupement carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) du squelette γ -lactone. Une deuxième bande d'absorption à 1665 cm^{-1} correspondante au groupement cétone à α,β -insaturés a été observée.

Le spectre ^{13}C RMN (Tableau 14) du composé C2 étale 15 raies, dont chacune représente le signal de résonance d'un carbone. Les caractéristiques de ce spectre montrent la présence de deux doubles liaisons trisubstituées. En effet, la première est constituée de deux

carbones établis respectivement à 138,7 ppm (ddq) et 136,1 ppm. Quant à la deuxième, elle est constituée de deux carbones établis respectivement à 28,4 ppm (dd) et 51,9 ppm.

Les signaux restants, présentent une multiplicité correspondante à trois CH₃, deux CH₂, trois CH et un carbone quaternaire. Leur valeur de δ est caractéristique du carbone sp³ non fonctionnalisé. Ainsi, le composé C2 contient 4 fonctions insaturées et possède trois cycles dans sa structure.

Tableau 14 : Spectres ¹H RMN et ¹³C RMN DEPT du composé C2 (CDCl₃, TMS).

No.	δ_H	δ_C	DEPT
1	4.55 (1H, dd, $J = 5.5, 1.5$ Hz)	98.1	CH
2	4.04 (1H, ddd, $J = 9, 5.5, 1.5$ Hz)	42.0	CH
3	2.72 (1H, ddd, $J = 12, 5.2, 9$ Hz)	43.4	CH
4 α	2.30 (1H, ddd, $J = 12, 5.2$ Hz)	23.0	CH ₂
4 β	1.65 (1H, ddd, $J = 12$ Hz)		
5 α	2.21 (1H, m, $J = 4, 1, 20, 12$ Hz)	25.3	CH ₂
5 β	2.63 (1H, br d, $J = 4, 1, 20$ Hz)		
6	5.76 (1H, ddq, $J = 4, 1$ Hz)	138.7	CH
7	-	136.1	C
8	-	203.8	C
9	-	51.9	C
10	6.51 (1H, dd, $J = 1.5$ Hz)	28.4	CH
11	-	25.3	C
12	-	177.0	C
13	1.83 (3H, ddd, $J = 1, 1$ Hz)	21.0	CH ₃
14	1.10 (3H, s)	13.2	CH ₃
15	1.23 (3H, s)	16.1	CH ₃

Le spectre ¹H RMN présente des signaux à 5,76 ppm (1H, ddq, $J = 4, 1$ Hz) et 6,51 ppm (1H, dd, $J = 1.5$ Hz). Chaque signal est caractéristique d'une double liaison trisubstituée conjuguée par le groupement cétone. Des signaux à 1,10 ppm (3H, s), 1,23 ppm (3H, s) et 1,83 ppm (3H, ddd, $J = 1, 1$ Hz) ont été observés, indiquant trois groupements méthyle. Quant au signal 4,55 ppm (1H, dd, $J = 5.5, 1.5$ Hz), il a été attribué à un proton lié à un carbone oxygéné.

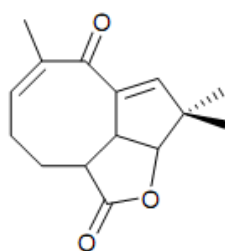


Figure 44 : Structure de 6,7,9,10-tetrahydroasteriscunolide.

II-3- Identification des asteriscunolides 3a, 3b, 3c et 3d

Dans notre étude, nous avons déterminé la structure, la configuration et la conformation de ces quatre asteriscunolides (Figure 45) par les analyses spectrales ^1H -RMN et ^{13}C -RMN.

Les résultats obtenus ont montré que les quatre asteriscunolides se présentent sous forme de cristaux blancs. Au niveau du spectre ^1H -RMN, on observe deux doublets à 5,29 et 6,16 ppm pour l'asteriscunolide 3a, deux doublets à 5,49 et 6,17 ppm pour l'asteriscunolide 3b et deux doublets à 5,74 et 6,10 ppm pour l'asteriscunolide 3d, respectivement proposés pour α et β des protons (H_9 et H_{10}). Ces doublets correspondent à des doubles liaisons disubstituées conjuguées à un groupement carbonyle.

Les déplacements chimiques prévus dans le cas des asteriscunolides 3a et 3b ne peuvent pas être expliqués seulement par la conformation (Z,E) et la coplanarité du système α - β insaturés, mais aussi par la présence et la disposition spatiale de γ -lactone, α - β insaturés de la double liaison Δ^6 . En effet, dans le cas de l'asteriscunolide 3d, la disposition relative de H_{10} par rapport aux doubles liaisons Δ^2 et Δ^6 peut expliquer le décalage par rapport à H_9 .

Ainsi, les spectres ^{13}C -RMN, ^1H -RMN des asteriscunolides 3a, 3b, 3c et 3d sont présentés dans les tableaux 15 et 16.

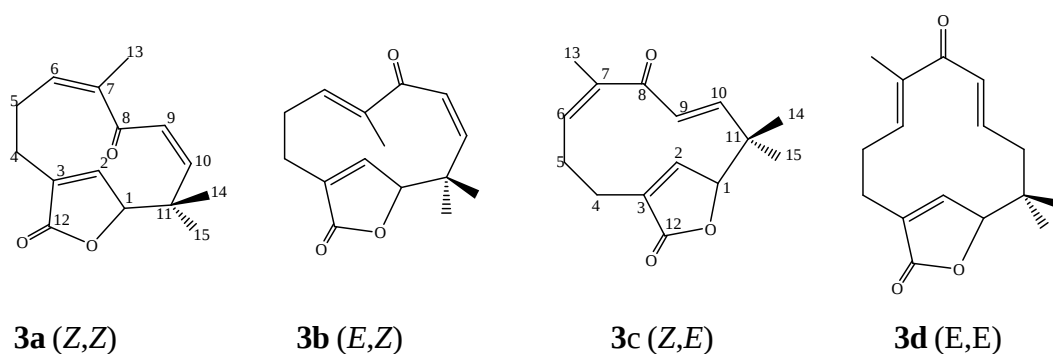


Figure 45 : Structure des sesquiterpènes lactones isolés d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*.

Tableau 15: Données spectrales ^1H -RMN des asteriscunolides 3a, 3b, 3c et 3d.

Asteriscunolides	H ₉	H ₁₀	H ₁₄	H ₁₅
3a (Z,Z)	6.16 d (J=13.9)	5.29 d	1.41	1.20
3b (E,Z)	6.17 d (J=14.1)	5.49 d	1.38	1.04
3c (Z,E)	5.91 (J=16.5)	6.27 d	1.36	1.28
3d (E,E)	6.10 d (J=16.5)	5.74 d	1.28	1.30

Tableau 16 : Données spectrales ^{13}C -RMN des asteriscunolides 3a, 3b, 3c et 3d.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
3a	88,1	147,9	138,8	23,0	29,9	138,3	133,7	198,5	133,1	136,5	42,5	173,5	21,3	30,0	24,7
3b	88,7	153,1	138,3	23,9	21,7	151,6	131,8	199,7	133,1	136,8	42,7	173,5	10,9	31,1	23,9
3c	85,6	149,7	138,6	22,8	33,9	128,4	135,6	202,6	129,5	156,4	40,7	173,7	21,1	24,6	21,0
3d	87,3	150,3	139,3	24,5	22,8	145,2	133,9	202,9	129,8	155,3	41,0	172,5	12,6	24,2	21,5

La présence des asteriscunolides (3a 3b, 3c et 3d) avec la structure voisine des sesquiterpènes lactones, naupliolide et 6,7,9,10-tétrahydroasteriscanolide, d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* semble indiquer leur relations biosynthétiques.

La cyclisation induite par l'acide d'asteriscunolide 3c conduit au carbocation intermédiaire II qui peut évoluer en produits 1 ou 2 en perdant respectivement H₉ ou H₁₄. Ainsi, la présence de composé 1 constitue une preuve solide de la relation biogénétique entre les asteriscunolides et les lactones sesquiterpéniques tricycliques tels que les composés liés aux asteriscanolides (Figure 46).

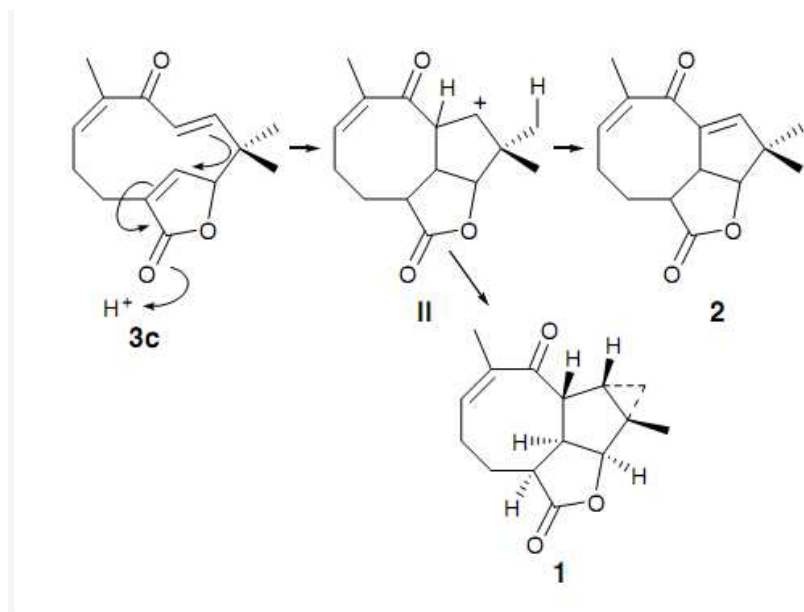


Figure 46: Voies de biosynthèse du composé 1 (C1) : naupliolide.

Au cours des vingt dernières années, une attention considérable a été donnée au genre *Asteriscus* et principalement aux sesquiterpènes lactones. Les asteriscunolides (3a- 3b, 3c et 3d) ont été isolés à partir des parties aériennes d'*Asteriscus aquaticus* (San Feliciano et *al.*, 1982, 1984, 1985a et b), *Asteriscus graveolens* (El-Dahmy et *al.*, 1985), *Asteriscus sericeus* (Jakupovic et *al.*, 1987) et *Asteriscus vogelii* (Rauter et *al.*, 2001). Les asteriscunolides et leurs hydroxyacides libres ont été aussi obtenus de l'extrait de *Nauplius intermedius* (Bohlmann et *al.*, 1992). D'autres lactones sesquiterpènes comme l'asteriscanolide et l'aquatolide ont été obtenus à partir de l'extrait d'*Asteriscus aquaticus* (San Feliciano et *al.*, 1985 a et b, 1989). *Asteriscus graveolens* a été reconnu pour son activité antimicrobienne et hypoglycémiant (Ahmed, 1992). C'est dans les mêmes perspectives et dans le but de la valorisation des composés majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* par le biais de l'activité antifongique, qu'on a jugé important d'isoler les composés sesquiterpéniques de cette plante.

Dans une étude présentée par Rauter et *al.*, (2001), les asterisunolides 3a, 3c et 3d présentent une activité phytotoxique supérieurs à 90% contre *Lemna paucicostata*. La même étude a montré que l'asterisunolide 3a est considéré comme le produit le plus toxique contre *Scenedesmus acutus*. Quant aux produits 3b et 3d, ils présentent une activité cytotoxique remarquable.

III- Conclusion

A l'issu de ce chapitre on a pu extraire, séparer et identifier plusieurs molécules à partir d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*. L'extrait organique neutre a donné quatre fractions importantes qui nous ont permis d'isoler une nouvelle lactone sesquiterpène à partir de la partie aérienne d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* nommée naupliolide (C1). La principale nouveauté de ce composé est la présence d'un nouveau squelette tetracyclique possédant dans sa structure un cyclopropane. Ainsi, d'autres composés connus ont été isolés : le 6,7,9,10-tetradehydroasteriscanolide (C2) et les asteriscunolides (3a, 3b, 3c et 3d). Les structures de ces composés ont été établies sur la base de méthodes spectroscopiques en interprétant les spectres RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC et NOESY) et les spectres IR. Il est important de noter que les asteriscunolides 3a, 3b, 3c et 3d ont été déjà décrits dans la littérature (San Feliciano et *al.*, 1985a, El-Dahmy et *al.*, 1985), c'est pour cette raison que nous avons présenté uniquement les caractéristiques spectrales les plus importants (^{13}C -RMN et ^1H -RMN) .

C-2- DEUXIEME PARTIE

**Étude antifongique d'*Asteriscus odoratus* et
*Asteriscus imbricatus***

CHAPITRE I

**Activité antifongique des extraits
d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et
Asteriscus imbricatus sur la croissance
mycélienne de *Penicillium digitatum* et
*Penicillium expansum***

I- Introduction

C'est dans la perspective de l'exploration d'un éventuel potentiel antifongique que nous avons testé les extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne de deux champignons qui attaquent les fruits et légumes en post récolte : *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Ceci s'inscrit également dans le cadre de la recherche d'une démarche préventive de lutte intégrée visant à la réduction significative de l'utilisation des pesticides et en particulier les fongicides.

Nous avons été encouragés dans cette démarche après l'exploration de leurs compositions phytochimiques riches et variées.

II- Rendement des extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*

L'extraction des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* effectuée dans trois solvants à polarités croissantes (éther de pétrole, acétate d'éthyle et méthanol). Une différence de rendement de ces extraits a été ainsi notée (Tableau 17). Cette différence pourrait être due à la capacité d'extraction de chaque solvant. Chacun de ces derniers peut extraire des familles bien définies de métabolites secondaires existants dans les différentes parties des plantes étudiées. En effet, selon Cowan (1999) l'éther de pétrole pourrait extraire les alcaloïdes, les terpénoïdes et les coumarines. Quant au solvant d'acétate d'éthyle, il permet d'extraire les hétérosides. Le méthanol, solvant le plus polaire des trois, permet l'extraction des tanins, des saponines, des terpenoïdes, des anthocyanines, des xanthoxylines, des quassinoïdes, des lactones, des flavones, des phénones et des polyphénols.

Tableau 17 : Rendement des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* après extraction par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le méthanol.

Plantes	Partie utilisée	Quantité de poudre	Solvants d'extraction	Rendement de l'extraction (g)
<i>Asteriscus graveolens subsp. odoratus</i>	Feuilles	50g	Ether de pétrole	0,2
			Acétate d'éthyle	0,3
			Méthanol	0,6
	Fleurs	50g	Ether de pétrole	0,35
			Acétate d'éthyle	0,3
			Méthanol	0,8
<i>Asteriscus imbricatus</i>	Feuilles	50g	Ether de pétrole	0,3
			Acétate d'éthyle	0,4
			Méthanol	1
	Fleurs	50g	Ether de pétrole	0,25
			Acétate d'éthyle	0,3
			Méthanol	0,7

III- Etude de l'activité antifongique des extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

III-1- Evaluation de l'activité antifongique des extraits du même organe sur le même champignon

Les analyses statistiques ont montré que les mesures effectuées sur les diamètres des disques du *Penicillium digitatum* se sont révélées significativement discriminantes pour les extraits des deux organes (Figure 47, 48).

Les extraits d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle semblent avoir la même activité contre *Penicillium digitatum* puisqu'ils présentent des taux d'inhibition respectifs de 100% et 98,5% (Figures 49 et 50) s'ils sont issus des feuilles et de 95,8% et 89,3% s'ils sont issus des fleurs. Cependant, les diamètres que présente *Penicillium digitatum* sous leur action, restent significativement moins élevés que celui qu'il présente sous l'action du méthanol. Les alcaloïdes, les terpénoïdes et les coumarines extraits par l'éther de pétrole ainsi que les hétérosides extraits par l'acétate d'éthyle seraient un support argumentatif fiable pour cette différence (Cowan, 1999). En effet, le screening phytochimique a montré la présence des

coumarines, des terpènes et des alcaloïdes dans d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*. De même, comme nous l'avons publié dans un travail antérieur, l'identification par RMN de cette plante a révélé la présence d'une nouvelle molécule dite naupliolide et d'autres asteriscunolides faisant partie des lactones sesquiterpéniques (Akssira et *al.*, 2006). Ceci est susceptible d'expliquer l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons testés en utilisant l'extrait éther de pétrole.

Toutefois, il est à signaler que les trois extraits contribuent à une réduction significativement importante de diamètres des disques par rapport au témoin.

Contrairement à la réponse de *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* n'affiche pas autant de sensibilité vis-à-vis des effets des extraits, quoiqu'ils aient réduit significativement le taux de croissance du champignon par rapport au témoin.

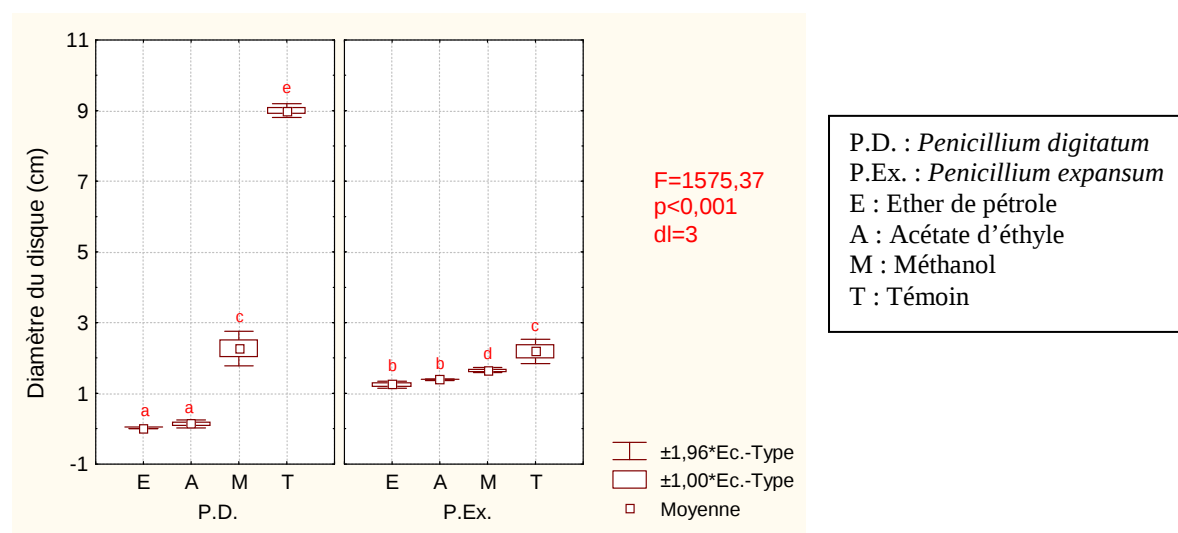


Figure 47 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits des feuilles de *Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

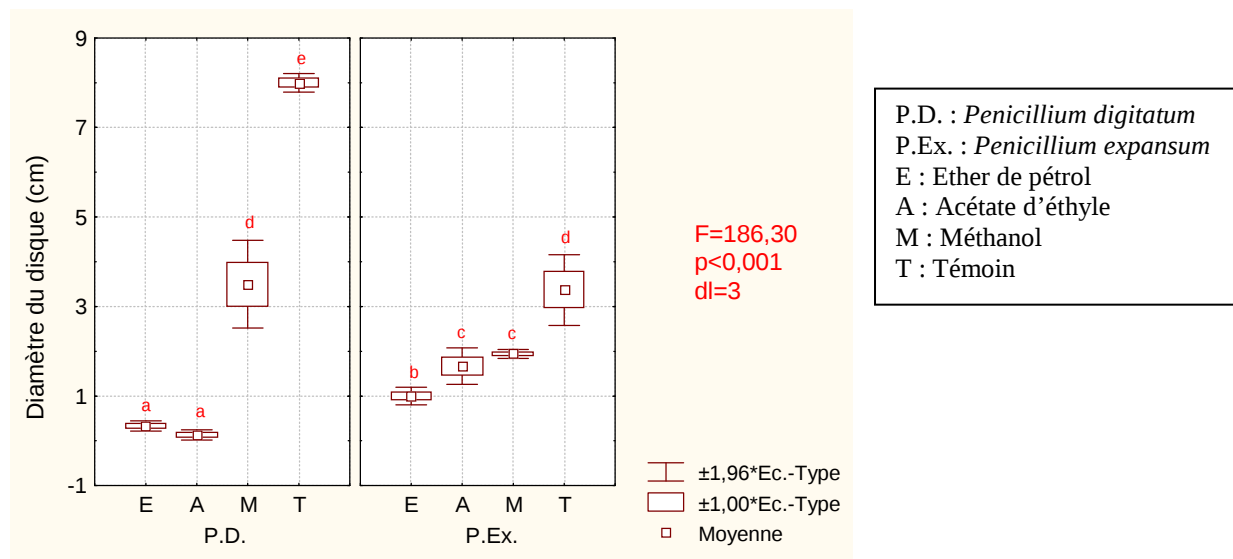


Figure 48 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.



Figure 49: Test antifongique de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* contre la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*.



Figure 50: Test antifongique de l'extrait éther de pétrole des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* contre la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*.

III-2- Spécificité antifongique

Les résultats relevés lors de l'analyse statistique témoignent d'une différence significative entre les réponses des deux champignons vis-à-vis des extraits étudiés, quelque soit l'organe d'extraction. En effet, paradoxalement à la vitesse de croissance, qui s'avère plus élevée chez *Penicillium digitatum* que chez le *Penicillium expansum*, sous l'action des extraits d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle c'est le premier champignon qui présente les diamètres les plus significativement faibles. Ceci indique clairement une activité inhibitrice

préférentielle de ces deux extraits vis-à-vis du *Penicillium digitatum*. Ce constat est ratifié, en fait, par les taux d'inhibition élevés que présentent ces deux extraits chez le *Penicillium digitatum*, alors qu'ils sont de 42,8% et de 36,3% chez le *Penicillium expansum*. L'extrait méthanolique, quant à lui, affiche une situation opposée puisque c'est le *Penicillium expansum* qui présente le diamètre le plus faible sous son action. Cependant, cette constatation ne permet aucune conclusion puisque la différence des taux de croissance entre les deux champignons pourrait en être la cause.

III-3- Evaluation de l'effet des extraits en fonction de l'organe d'extraction

Les trois extraits témoignent d'un pouvoir antifongique important sur les deux champignons étudiés. Toutefois, une forme d'interaction entre l'organe d'extraction et le champignon utilisé semble définir un schéma particulier d'efficacité (Figures 51 et 52). En effet, sur le *Penicillium digitatum* les extraits d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle ne présentent aucune différence d'effet selon l'organe d'extraction. Cependant, sur le *Penicillium expansum*, l'extrait d'éther de pétrole présente significativement plus d'efficacité s'il est issu des fleurs. L'extrait d'acétate d'éthyle, par contre est plutôt plus efficace s'il est issu des feuilles. Quant à l'extrait méthanol, il présente une efficacité significativement plus élevée s'il est issu également des feuilles, et cela sur les deux champignons étudiés.

La purification de certaines molécules des feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*, a montré la richesse de cette plante en acides phénols, en aglycones flavoniques et en polyphénols à grand intérêt médicinal et biologique. Ces métabolites ont des rôles très importants dans la coloration des fleurs et des fruits et la protection des plantes contre les ravageurs. De plus, ce sont des antioxydants, anti-inflammatoires, antiviraux, anticancéreux et anti-spasmodiques (Asad et *al.*, 1998).

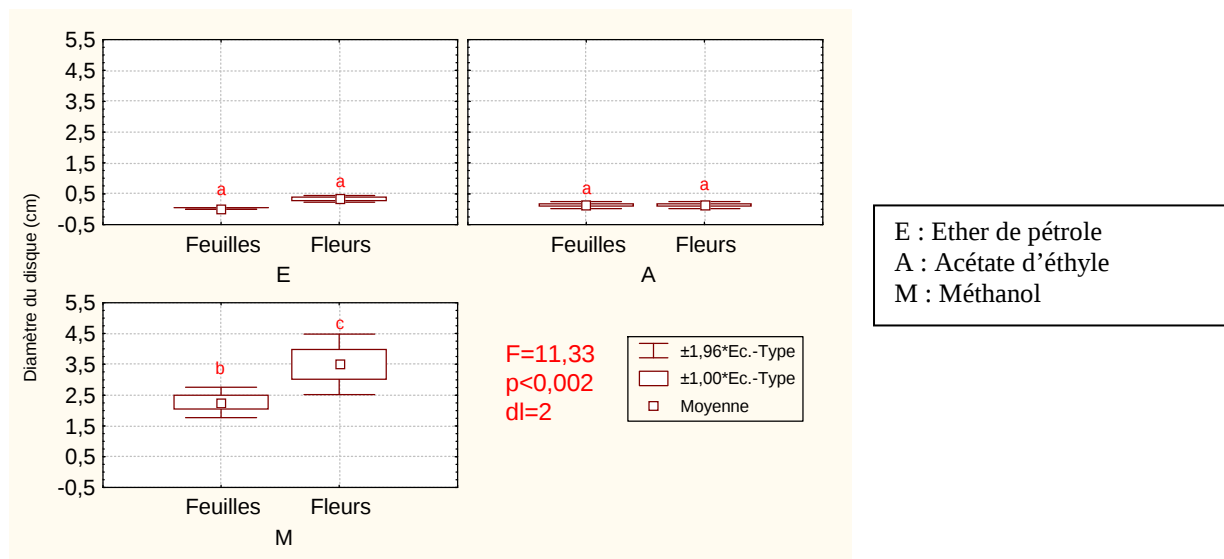


Figure 51 : Efficacité des extraits sur *Penicillium digitatum*, en fonction des organes d'extraction d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* (feuilles et fleurs).

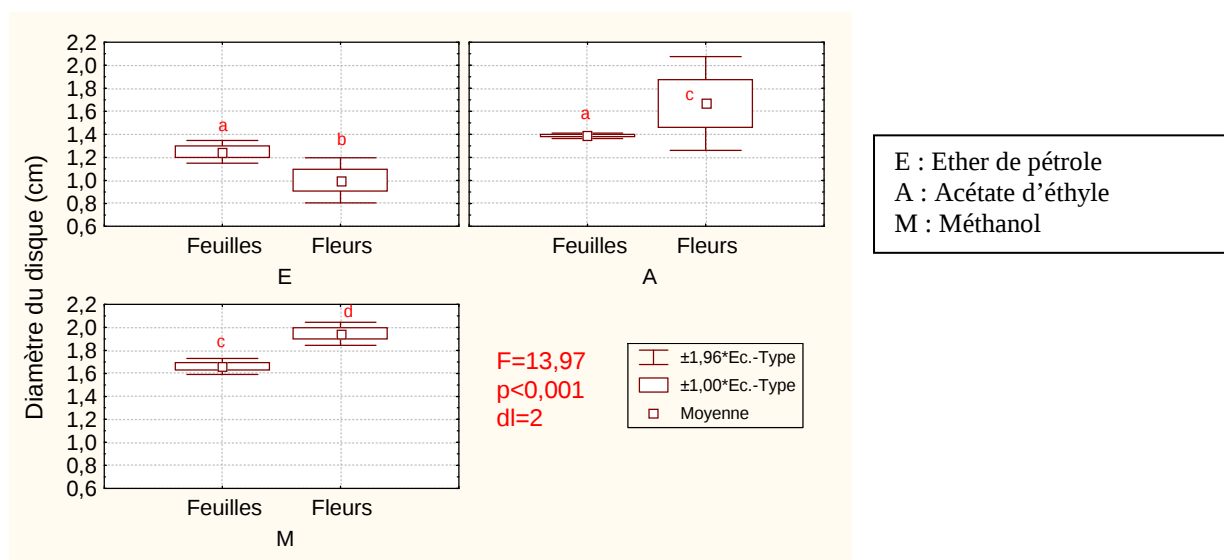


Figure 52 : Efficacité des extraits sur *Penicillium expansum*, en fonction des organes d'extraction d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* (feuilles et fleurs).

IV- Etude de l'activité antifongique des extraits de l'appareil végétatif d'*Asteriscus imbricatus*

L'étude statistique a montré que les deux champignons étudiés répondent différemment à l'effet antifongique des trois extraits de la plante étudiée (Figure 53). En effet, alors que *Penicillium expansum* ne semble être objet d'aucun effet inhibiteur des extraits étudiés, *Penicillium digitatum* semble réagir significativement à leur effet antifongique.

Toutefois, une différence significative a été signalée entre les effets des extraits sur *Penicillium digitatum*. L'acétate d'éthyle semble avoir l'effet inhibiteur le plus élevé contre *Penicillium digitatum* (98,14%) alors que l'éther de pétrole présente l'effet le plus faible des trois extraits (55,55%). Quant à l'extrait méthanolique, il souligne un effet significatif moyen (63,33%) contre le même champignon (Tableau 18).

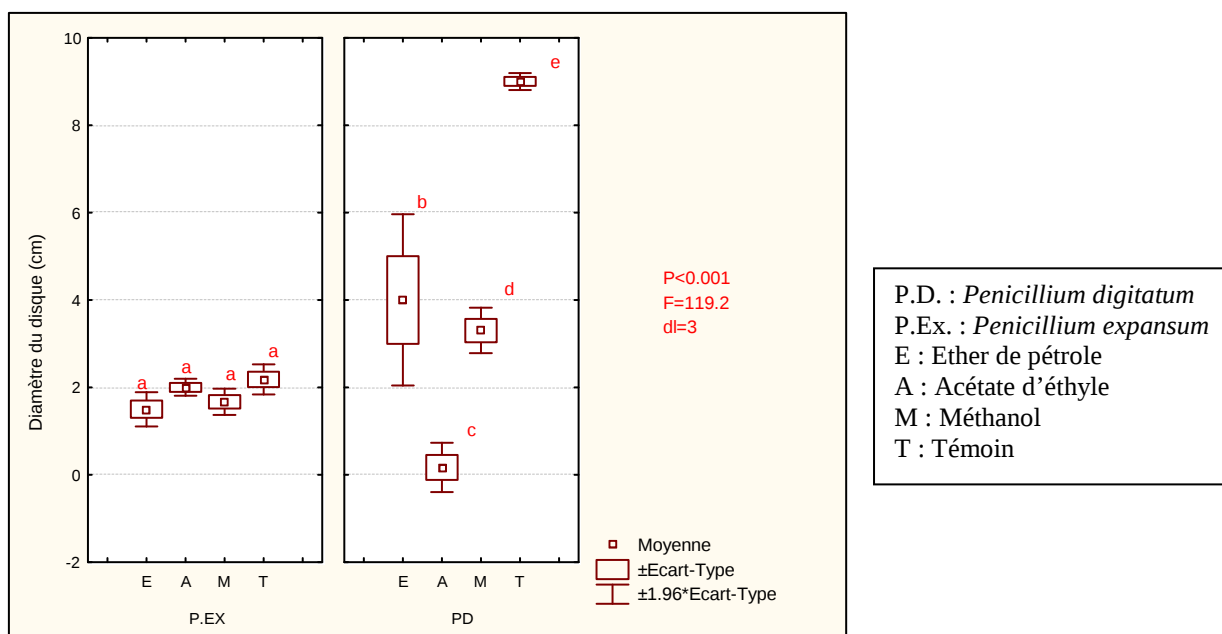


Figure 53 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits de l'appareil végétatif d'*Asteriscus imbricatus*.

Tableau 18 : Pourcentage d'inhibition des extraits d'*Asteriscus imbricatus* contre *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

Champignon	Extraits	Pourcentage d'inhibition (%)
<i>Penicillium expansum</i>	Ether de pétrole	31.29
	Acétate d'éthyle	8.39
	Méthanol	23.66
<i>Penicillium digitatum</i>	Ether de pétrole	55.55
	Acétate d'éthyle	98.14
	Méthanol	63.33

L'étude effectuée par Attrassi et *al.*, (2007) sur l'effet d'un fongicide de synthèse sur *Penicillium expansum* a montré des résultats similaires que ceux retrouvés dans notre étude en utilisant les extraits des plantes. En effet, l'anilinopyrimidine a marqué une sensibilité au *Penicillium expansum* avec une $CI_{50} < 400$ ppm. Ce fongicide ne permet pas, avec une $CI_{90} > 800$ ppm, de contrer totalement la croissance mycélienne de ce champignon. Ce qui est

toujours le cas en utilisant l'azoxystrobine comme fongicide ($CI_{50} < 625$ ppm et $CI_{90} > 1250$ ppm).

Toutefois, la même étude a rapporté que *Penicillium expansum* est très résistant au bénomyl ($CI_{50} > 600$ ppm, $CI_{90} > 300$ ppm) qu'au Thiabendazole ($CI_{50} > 1500$ ppm, $CI_{90} > 1500$ ppm).

La lutte intégrée, en utilisant un antagoniste comme alternative de l'utilisation des produits chimiques, a été présentée par Bencheqroun (2009). En effet, l'utilisation d'*Aureobasidium pullulans* comme antagoniste favorise une activité fongistatique plus que fongicide vis-à-vis de *Penicillium expansum*. L'antagoniste agit par une compétition efficace pour les éléments nutritifs des blessures des pommes sans affecter la viabilité des conidies du pathogène. Ainsi, les acides aminés (la sérine, la glycine et l'acide glutamique) semblent être parmi les éléments les plus limitants dans le mécanisme de la compétition.

V- Comparaison de l'effet antifongique des extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* et *Asteriscus imbricatus*

L'étude multivariée a révélé une interaction très hautement significative entre les différents paramètres introduits dans l'analyse (champignon, plante, extrait) (Figure 54). En effet, *Penicillium digitatum* semble être plus sensible à l'effet des extraits des deux plantes par rapport au *Penicillium expansum*. Par ailleurs, l'*Asteriscus graveolens subsp. odor* semble avoir un effet plus significatif que l'*Asteriscus imbricatus*. Cette différence entre les deux plantes est d'autant plus accentuée lorsqu'il s'agit de l'effet de l'extrait d'éther de pétrole et celui méthanolique sur le *Penicillium digitatum* et l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle sur le *Penicillium expansum*.

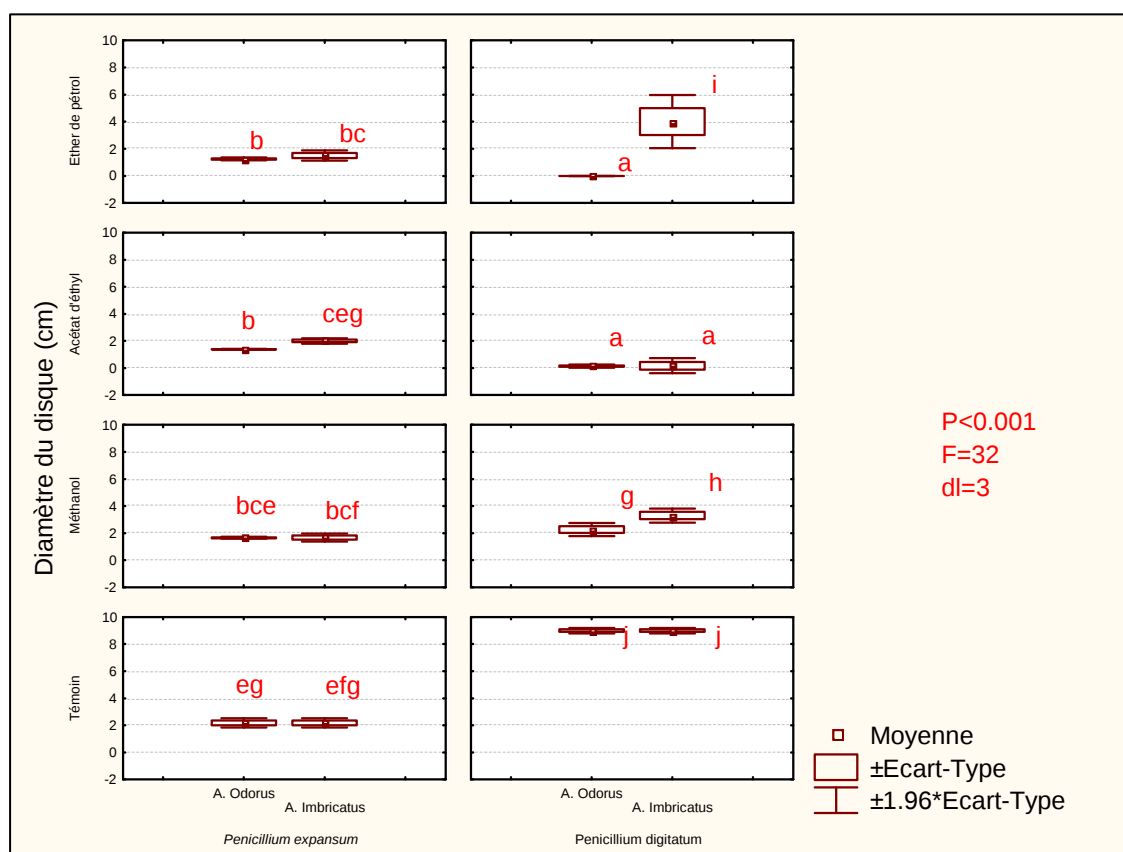


Figure 54 : Réponses de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* au pouvoir antifongique des extraits de l'appareil végétatif d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* et d'*Asteriscus imbricatus*.

VI- Conclusion

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antifongique des extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* et de l'appareil végétatif d'*Asteriscus imbricatus* contre la croissance mycélienne des champignons ravageurs des serres de la région du Sud du Maroc : *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. En effet, l'étude statistique a montré que les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle ont une spécificité très marquée pour *Penicillium digitatum* plus que pour *Penicillium expansum* aussi bien pour les feuilles que pour les fleurs d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*.

Les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* ont présenté des pourcentages d'inhibition, respectifs de 100% et 98,5% s'ils sont issus des feuilles et de 95,8% et 89,3% s'ils sont issus des fleurs sur la croissance mycélienne du

Penicillium digitatum. Cette inhibition est minime par rapport au *Penicillium expansum* pour les mêmes extraits (soient 42,8% et 36,3%, respectivement).

En outre, l'effet antifongique des trois extraits d'*Asteriscus imbricatus* étudiée ne montre pas une inhibition de *Penicillium expansum*, contrairement au *Penicillium digitatum* qui semble réagir significativement à leur effet antifongique. Toutefois, l'acétate d'éthyle semble avoir l'effet inhibiteur le plus élevé contre *Penicillium digitatum*. Quant à l'éther de pétrole, il présente l'effet le plus faible des trois extraits. Ainsi, on note que l'extrait méthanolique a marqué un effet moyen contre le même champignon.

La comparaison de l'effet antifongique entre les extraits des deux plantes et les deux champignons a révélé une sensibilité de *Penicillium digitatum* à l'effet des extraits des deux plantes par rapport au *Penicillium expansum*. On note aussi qu'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* semble avoir un effet plus significatif sur *Penicillium digitatum* que l'*Asteriscus imbricatus* lorsqu'il s'agit de l'extrait d'éther de pétrole.

L'efficacité des différents extraits d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne des deux pathogènes : *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* pourrait présenter une éventuelle alternative aux fongicides synthétiques peu biodégradables.

CHAPITRE II

**Activité antifongique des huiles essentielles
d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et
Asteriscus imbricatus sur *Penicillium*
digitatum, *Penicillium expansum* et *Botrytis*
*cinerea***

I- Introduction

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Pour tenter de trouver de nouveaux remèdes aux fléaux actuels, la communauté scientifique s'est récemment tournée vers les constituants des huiles essentielles, car un nombre non négligeable de composés volatil, tels que les sesquiterpènes, ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre les maladies comme le cancer (Modzelewska et *al.*, 2005).

Les huiles essentielles sont des produits du métabolisme secondaire des plantes (Hatanaka et *al.*, 1987). D'autres composés incluent des phénylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Svoboda et Hampson, 1999).

Dans la recherche de molécules bioactives, les huiles essentielles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés.

Dans le cadre de la recherche sur des procédés de lutte biologique basés sur l'action de nouvelles molécules naturelles, et suite à l'utilisation excessive des substances synthétiques qui ont des effets néfastes sur les plantes et l'Homme, nous avons opté pour l'exploitation des huiles essentielles extraites à partir d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et d'*Asteriscus imbricatus*. L'étude de l'effet des huiles essentielles des deux plantes a été faite sur trois champignons qui attaquent les fruits et légumes en post récolte : *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*.

Pour apprécier la variabilité et l'évolution de l'éventuel effet antifongique des différentes doses des huiles essentielles de ces deux plantes sur les trois champignons choisis, nous avons effectué un suivi sur une période d'incubation de 7 jours *in vitro* sur les trois champignons et 10 jours *in vivo* mais uniquement sur *P. digitatum*. Un transfert d'expérience a été fait dans le but d'évaluer l'effet fongicide ou fongistatique des huiles essentielles des deux plantes contre les trois champignons testés.

II- Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

II-1- Test *in vitro* de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur *Penicillium digitatum*

Les résultats relevés sur *Penicillium digitatum* soulignent un effet antifongique significatif pour les différentes doses testées de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* (Figure 55). Cet effet est d'autant plus important que la durée d'incubation est plus longue. Toutefois, une variation significative a été notée entre les différentes doses quant à l'intensité et la rapidité de l'effet antifongique (Tableau 19). Ainsi, alors que les doses 125, 150, 200, 250, 500, 1000 et 2000 ppm présentent un effet inhibiteur atteignant 100% dès le premier jour d'incubation, les doses 50 et 100 ppm ne commencent à prendre effet qu'au-delà du troisième jour pour atteindre un pouvoir inhibiteur d'à peine 21,43% et 75,82% respectivement, en termes du test (Tableau 22).

Vu cette inhibition totale de *Penicillium digitatum*, le transfert de disque de champignon, totalement inhibé, vers un autre milieu de culture a été nécessaire pour évaluer la viabilité de ce champignon. Les résultats obtenus ont montré que la croissance mycélienne réapparaît après que le disque ait été exposé à l'huile essentielle pendant 1, 3, 6 et 12 jours. Ainsi, l'effet que représente l'huile essentielle sur l'organisme cible est un effet fongistatique.

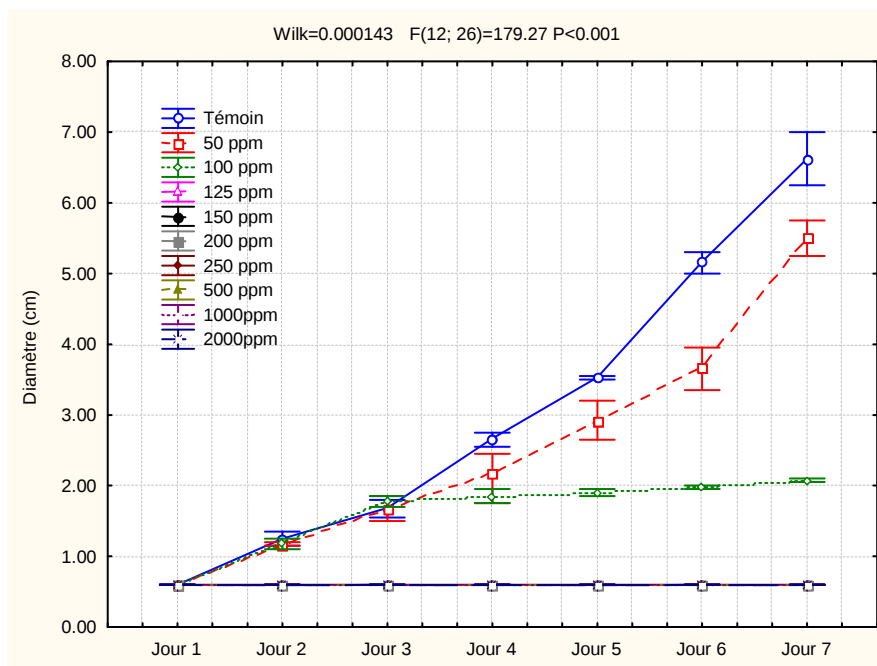


Figure 55 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 19 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoin	0,60a	1,25ac	1,68a	2,67a	3,53a	5,17a	6,67a
50 ppm	0,60a	1,17bc	1,68a	2,18b	2,90b	3,68b	5,37b
100 ppm	0,60a	1,18c	1,78a	1,82c	1,88c	1,97c	2,07c
125 ppm	0,60a	0,60d	0,60b	0,60d	0,60d	0,60d	0,60d
150 ppm	0,60a	0,60d	0,60b	0,60d	0,60d	0,60d	0,60d
200 ppm	0,60a	0,60d	0,60b	0,60d	0,60d	0,60d	0,60d
250 ppm	0,60a	0,60d	0,60b	0,60d	0,60d	0,60d	0,60d
500 ppm	0,60a	0,60d	0,60b	0,60d	0,60d	0,60d	0,60d
1000 ppm	0,60a	0,60d	0,60b	0,60d	0,60d	0,60d	0,60d
2000 ppm	0,60a	0,60d	0,60b	0,60d	0,60d	0,60d	0,60d

II-2- Test *in vitro* de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* sur *Penicillium expansum*

Ce qui a été rapporté pour *Penicillium digitatum* est valable pour *Penicillium expansum* avec la seule différence qu'au niveau de la dose 125 ppm l'effet antifongique ne commence que lors du troisième jour avec un pourcentage d'inhibition de 67,53% (Figure 56). Les deux premières doses ne semblent pas avoir un pouvoir antifongique significatif important étant donné que leurs effets inhibiteurs n'excèdent pas 2,21% pour la dose 50 ppm et 12,92% pour la dose 100 ppm (Tableaux 20 et 22).

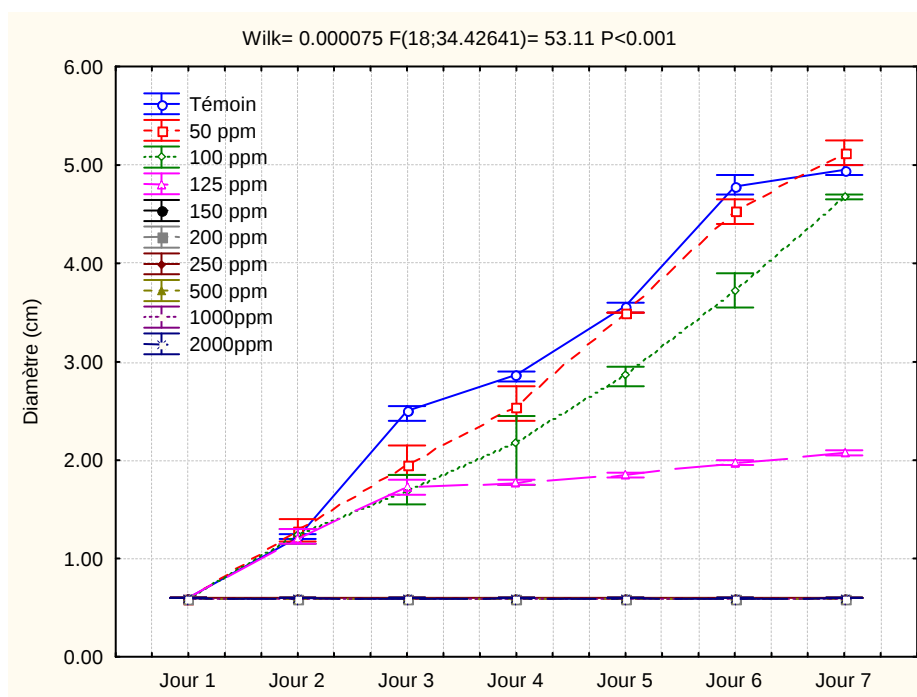


Figure 56 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 20 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoin	0,60a	1,22a	2,50a	2,87a	3,57a	4,78a	5,12a
50 ppm	0,60a	1,29a	1,95b	2,53b	3,50b	4,53b	5,02a
100 ppm	0,60a	1,23a	1,68c	2,18c	2,87c	3,72c	4,53b
125 ppm	0,60a	1,20a	1,73c	1,77d	1,85d	1,97d	2,07c
150 ppm	0,60a	0,60b	0,60d	0,60e	0,60e	0,60e	0,60d
200 ppm	0,60a	0,60b	0,60d	0,60e	0,60e	0,60e	0,60d
250 ppm	0,60a	0,60b	0,60d	0,60e	0,60e	0,60e	0,60d
500 ppm	0,60a	0,60b	0,60d	0,60e	0,60e	0,60e	0,60d
1000 ppm	0,60a	0,60b	0,60d	0,60e	0,60e	0,60e	0,60d
2000 ppm	0,60a	0,60b	0,60d	0,60e	0,60e	0,60e	0,60d

II-3- Test *in vitro* de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* sur *Botrytis cinerea*

Une différence significative a été relevée entre l'ampleur et l'évolution des effets des différentes doses testées sur *Botrytis cinerea* (Figure 57 et Tableau 21). L'intensité de cet effet dépend étroitement de la dose utilisée et de la période d'incubation. Ainsi, alors que les doses 500, 1000 et 2000 ppm affichent un pourcentage d'inhibition de 100% dès le premier jour, l'effet inhibiteur des autres doses oscille entre 16% et 72% en termes du test. Les doses 200 et 250 ppm tout comme les doses 125 et 150 ppm ne présentent aucune différence significative en termes de pourcentage d'inhibition (Tableau 22).

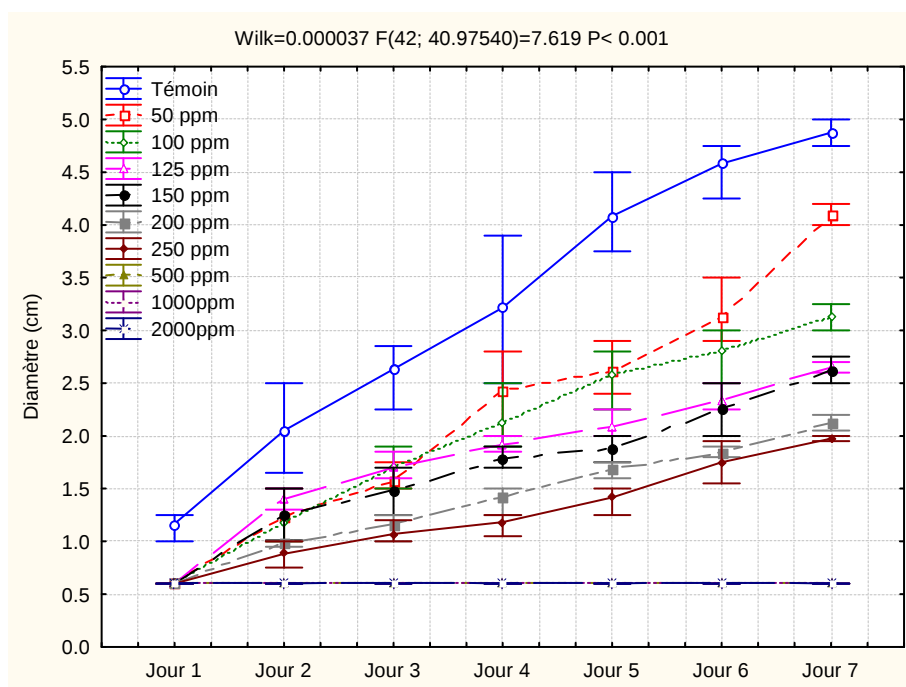


Figure 57 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 21 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jour d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoin	1,17a	2,05a	2,63a	3,22a	4,08a	4,58a	4,95a
50 ppm	0,60b	1,23bc	1,58b	2,43b	2,62b	3,13b	4,23b
100 ppm	0,60b	1,17bc	1,70b	2,13bc	2,58b	2,80b	3,05c
125 ppm	0,60b	1,40b	1,72b	1,92c	2,09c	2,33c	2,68d
150 ppm	0,60b	1,25bc	1,48b	1,78cd	1,88cd	2,25c	2,67d
200 ppm	0,60b	0,98c	1,17c	1,42de	1,68de	1,83d	2,05e
250 ppm	0,60b	0,88c	1,07c	1,18e	1,42e	1,75d	1,83e
500 ppm	0,60b	0,60d	0,60d	0,60f	0,60f	0,60e	0,60f
1000 ppm	0,60b	0,60d	0,60d	0,60f	0,60f	0,60e	0,60f
2000 ppm	0,60b	0,60d	0,60d	0,60f	0,60f	0,60e	0,60f

Tableau 22 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* en utilisant les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

	50 ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000 ppm
<i>Botrytis cinerea</i>	16,48%	43,68%	52,11%	52,49%	66,67%	71,65%	100%	100%	100%
<i>Penicillium digitatum</i>	21,43%	75,82%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Penicillium expansum</i>	2,21%	12,92%	67,53%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

En général, l'étude statistique a montré que les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* présentent une activité antifongique efficace sur les trois champignons testés *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. En effet, cette efficacité peut être due au réservoir des composés phénoliques et terpéniques de cette plante. Dans ce sens, une étude publiée par Valnet (2005) a montré que les composés chimiques ayant une efficacité antibactérienne et antifongique à large spectre sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques. Les meilleures activités ont été observées pour les huiles de thym, d'origan, de clous de girofle, d'armoise blanche, tous riches en composés phénoliques (thymol, carvacrol et eugénol) (Agnihotri, 2003).

La richesse d'*A. odorus* en 6-oxocyclonerolidol représentant 30,72% de la quantité totale de l'huile essentielle pourrait expliquer son activité antifongique sur les champignons étudiés. En effet, Znini et *al.*, (2011) ont montré que l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens* a un effet fongicide sur *Penicillium expansum* à 80 µL et sur *Alternaria sp.* à 0,2%. Cette plante est riche en 6-oxocyclonerolidol représentant 66,7%.

Une autre étude présentée par Melekmi et *al.*, (2006) a montré l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Bubonium graveolens* (Forssk.).

II-4- Test *in vivo* de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur la sporulation du *Penicillium digitatum*

Le test réalisé *in vivo* sur *Penicillium digitatum* a révélé un effet significatif des trois doses testées de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* et ce le long de la période d'incubation (Figure 57). Toutefois en termes du test, c'est la dose 2000 ppm qui donne le pourcentage d'inhibition le plus significativement élevé.

La figure 58 montre une réduction significative des spores de *Penicillium digitatum* sur les clémentines ($p < 0,001$) en comparaison avec le témoin pendant 10 jours d'incubation. Une augmentation considérable durant les 10 jours d'incubation a été observée pour le témoin.

On note que l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* a induit un pourcentage d'inhibition très important après 7 jours de stockage. Cette inhibition est estimée respectivement à 77,50%, 85,83% et 93,33% pour les concentrations 500, 1000 et 2000 ppm. En outre, après 10 jours d'incubation, une réduction du pourcentage d'inhibition de *Penicillium digitatum* a été notée. Le pourcentage de cette inhibition a été estimé respectivement à 75,83%, 77,50% et 92,50% pour les concentrations 500, 1000 et 2000 ppm. Cette diminution du pourcentage d'inhibition pourrait être expliquée par l'effet fongistatique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur *Penicillium digitatum*.

L'efficacité de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* pourrait être due au pool phénolique et sesquiterpénique de cette plante. Plusieurs auteurs ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens et antifongiques dans plusieurs domaines industriels et médicaux (Baser et *al.*, 2002 ; Dorman et Deans, 2000). Une autre étude présentée par Wilson et *al.*, (1977) a montré que des composés fongitoxiques des huiles essentielles pourraient être une alternative au bromure de méthyle en tant que des fumigants dans le sol.

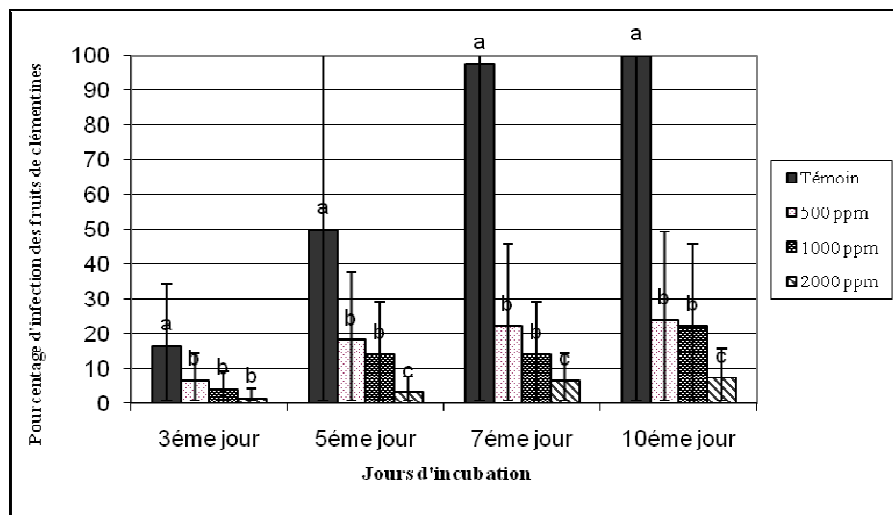


Figure 58 : Activité antifongique *in vivo* de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant 3, 5, 7 et 10 jours d'incubation sur *Penicillium digitatum*.

III- Etude de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*

III-1- Test *in vitro* de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*

L'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* a été testée sur la croissance mycélienne de trois champignons phytopathogènes dans le but de déterminer son activité antifongique. En effet, différentes concentrations ont été testées : 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 1000 et 2000 ppm (Tableau 23).

Tableau 23 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* en utilisant les différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*.

	50 ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
<i>Botrytis cinerea</i>	27,57%	30,43%	35,29%	36,71%	42,86%	48,86%	51,43%	99,00%	100%
<i>Penicillium digitatum</i>	24,27%	27,41%	29,92%	39,75%	49,79%	52,30%	67,15%	89,12%	100%
<i>Penicillium expansum</i>	42,53%	47,82%	51,26%	53,56%	67,13%	71,26%	71,72%	87,82%	97,01%

Dans son aspect global, les résultats ont révélé une activité antifongique efficace de l'huile essentielle sur tous les champignons testés. Pour différencier les concentrations par

rapport à leurs effets, nous avons fait un suivi de la croissance mycélienne pendant les 7 jours d'incubation. Une évolution hétérogène entre les différentes concentrations a été constatée le long de la période d'incubation (Figures 59, 60, 61 et Tableaux 24, 25, 26).

Les concentrations 1000 et 2000 ppm se présentent comme étant les plus efficaces en termes d'inhibition durant toute la période d'incubation et pour les trois champignons testés. Toutefois, il est à signaler que seule la dose 2000 ppm a permis une inhibition de 100% depuis le premier jour et jusqu'à la fin de l'incubation. Cette inhibition complète a été constatée uniquement pour le *Botrytis cinerea* et le *Penicillium digitatum* qui semble être les champignons les plus sensibles aux doses 1000 et 2000 ppm de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*.

Par ailleurs, si à une concentration de 2000 ppm l'inhibition complète est atteinte, il était important de savoir si l'huile essentielle était fongistatique ou fongicide à cette concentration. En effet, le transfert des disques de *Penicillium digitatum* et *Botrytis cinerea* sur milieu PDA frais a montré que l'inhibition complète est atteinte après 12 jours d'incubation. Nous avons noté, alors, que l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* a un effet fongicide sur la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* et *Botrytis cinerea* à une concentration de 2000 ppm.

L'efficacité de cette huile peut être expliquée par la présence de la grande quantité de thymol isobutyrate, 2,5-dimethoxy-p-cymène, α -pinène et cis-chrysanthényle acétal. En effet, les champignons ont une sensibilité au carvacrol et au thymol mais plusieurs auteurs se sont concentrés sur l'activité antibactérienne du thymol (Kim et *al.*, 1995 ; Curtis et *al.*, 1996). Cela est expliqué, selon Lahlou (2004), par la valeur de cette huile qui tient à son « totum » ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses composés majoritaires. D'autre part, ces composés peuvent agir en synergie, comme il a été suggéré par Filipowicz et *al.*, (2003). On peut dire, donc, que cette synergie peut être, aussi, responsable du pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*.

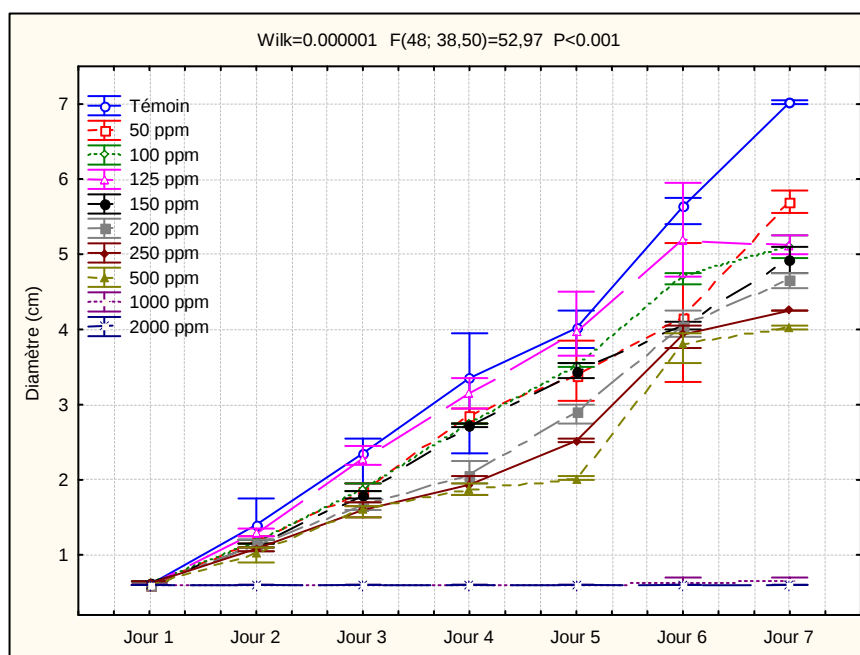


Figure 59 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 24 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoin	0,63a	1,72a	2,95a	3,83a	4,83a	5,63a	7,00a
50 ppm	0,62a	1,68a	2,67b	3,47b	4,65ab	5,07b	5,67b
100 ppm	0,62a	1,37b	2,60b	3,30b	4,53b	4,97bc	5,47b
125 ppm	0,60a	1,28b	2,13c	3,02c	3,97c	4,77c	5,13c
150 ppm	0,63a	1,12c	1,78d	2,73d	3,45d	4,05d	5,03c
200 ppm	0,60a	1,12c	1,67de	2,07e	2,90e	4,05de	4,60d
250 ppm	0,62a	1,08c	1,60e	1,93e	2,52f	3,93de	4,18e
500 ppm	0,60a	1,03c	1,60e	1,88e	2,02g	3,80e	4,00e
1000 ppm	0,60a	0,60d	0,60f	0,60f	0,60h	0,63f	0,67f
2000 ppm	0,60a	0,60d	0,60f	0,60f	0,60i	0,60f	0,60f

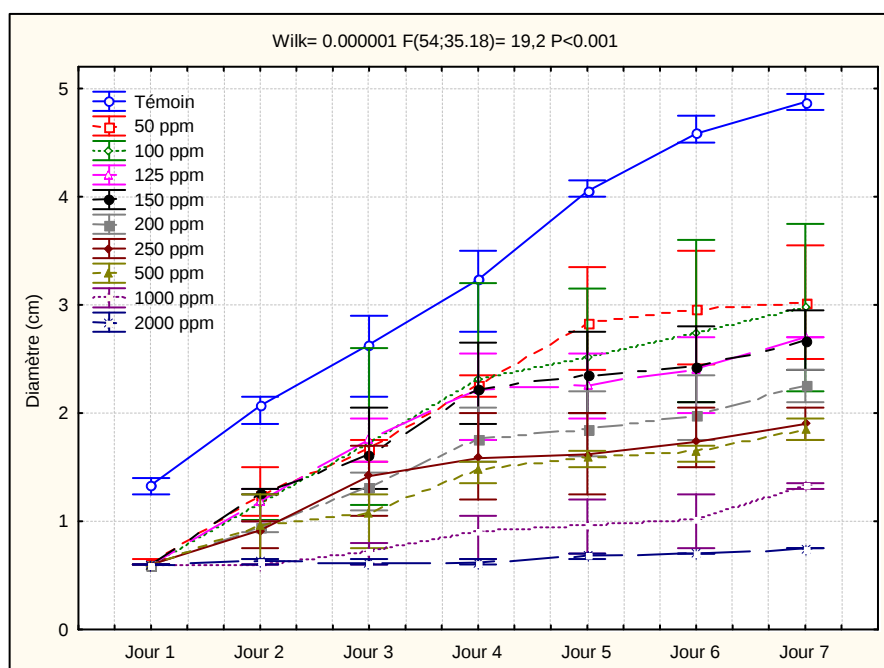


Figure 60 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 25 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoins	1,33a	2,07a	2,63a	3,48a	4,05a	4,58a	4,95a
50 ppm	0,62b	1,23cbd	2,08b	2,20b	2,77b	2,93b	3,10b
100 ppm	0,60b	1,08cbde	1,82bc	2,18bc	2,52bc	2,67b	2,87b
125 ppm	0,60b	1,1 e	1,75bcd	1,85bcd	2,25bcd	2,40bc	2,72b
150 ppm	0,60b	1,27c	1,55cde	1,73cde	2,07cde	2,30bcd	2,62bc
200 ppm	0,60b	0,95e	1,35def	1,37de	1,67de	1,80cd	2,03cd
250 ppm	0,60b	0,92e	1,17ef	1,22ef	1,58e	1,73cd	1,85d
500 ppm	0,60b	0,97e	1,03fg	1,13ef	1,50e	1,65d	1,83d
1000 ppm	0,60b	0,6f	0,72g	0,85f	0,88f	0,95e	1,13e
2000 ppm	0,60b	0,63f	0,63g	0,63f	0,67f	0,68e	0,73e

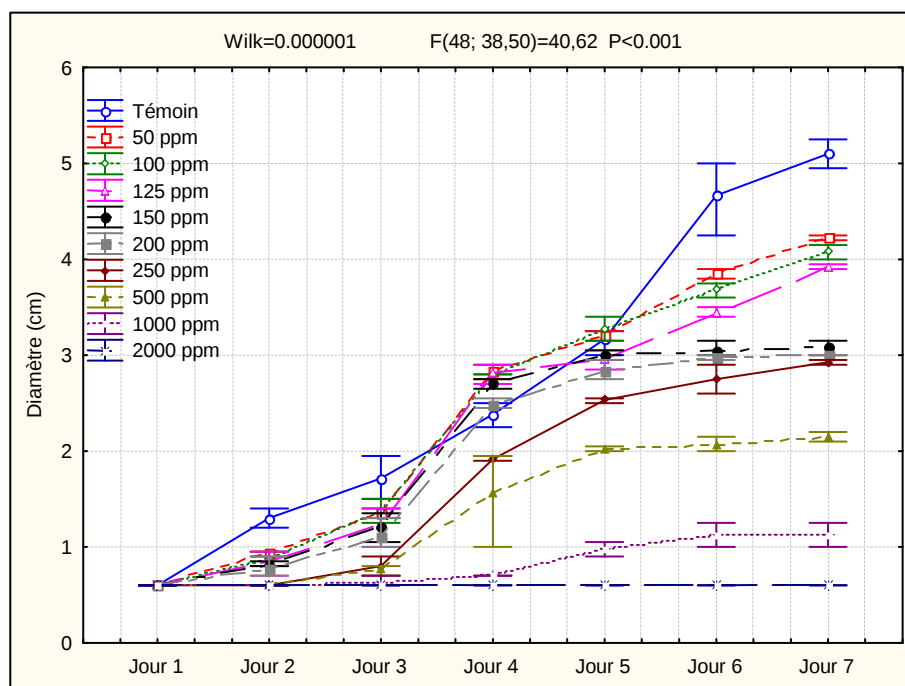


Figure 61 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 26 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoins	0,68a	1,30a	1,72a	2,97a	3,60a	4,67a	5,38a
50 ppm	0,63a	0,93b	1,35b	2,83a	3,22b	3,85b	4,22b
100 ppm	0,60b	0,88bc	1,27b	2,80a	3,27b	3,68b	4,07c
125 ppm	0,60b	0,85bc	1,07c	2,82a	2,97c	3,43c	3,95c
150 ppm	0,60b	0,82bc	1,02c	2,70ab	3,02c	3,17d	3,48d
200 ppm	0,60b	0,77c	0,97cd	2,48b	2,83d	2,98de	3,00e
250 ppm	0,60b	0,60d	0,80de	1,92c	2,53e	2,75e	2,88e
500 ppm	0,60b	0,60d	0,73ef	1,57d	2,02f	2,07f	2,17f
1000 ppm	0,60b	0,60d	0,63ef	0,70e	0,98g	1,12g	1,12g
2000 ppm	0,60b	0,60d	0,60f	0,60e	0,60h	0,60h	0,60h

III-2- Test *in vivo* de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* sur la sporulation de *Penicillium digitatum*

Le test *in vivo* de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* sur les clémentines inoculées artificiellement par les spores de *Penicillium digitatum* a été réalisé afin de confirmer les résultats précédemment obtenus dans les tests *in vitro*.

La figure 62 montre l'apparition des symptômes sur les fruits traités dès le troisième jour de stockage pour le témoin et tous les traitements, à l'exception de la concentration 2000 ppm pour laquelle l'apparition de l'infection fongique reste minime jusqu'au 5^{ème} jour. On note que pour le témoin, il y a une augmentation considérable des symptômes entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour.

En outre, le pourcentage d'infection des clémentines par les spores de *Penicillium digitatum* est significativement plus faible en comparaison avec le témoin, et ce durant les 10 jours d'incubation (Tableau 27).

En effet, un pouvoir inhibiteur important de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* est constaté après 10 jours de stockage avec une inhibition remarquable estimée respectivement à 50%, 73,33% et 81,66%, pour les concentrations 500, 1000 et 2000 ppm. Une importante réduction de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* a été également notée après 7 jours de stockage. Le pourcentage de cette inhibition a été estimé respectivement à 53,78%, 74,78% et 89,91%, pour les concentrations 500, 1000 et 2000 ppm.

Nous rappelons que l'analyse de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* a montré la présence d'un pourcentage élevé de monoterpènes (>82%). En effet, les monoterpènes isolés de plusieurs *Asteraceae* possèdent un large spectre d'activité biologique (Marles et *al.*, 1995) et semblent jouer un rôle très important dans les mécanismes de la défense de la plante.

Wilson et *al.*, (1997) a montré que les composés antifongiques des huiles essentielles des plantes peuvent être utilisés pour contrôler des maladies fongiques des fruits et légumes.

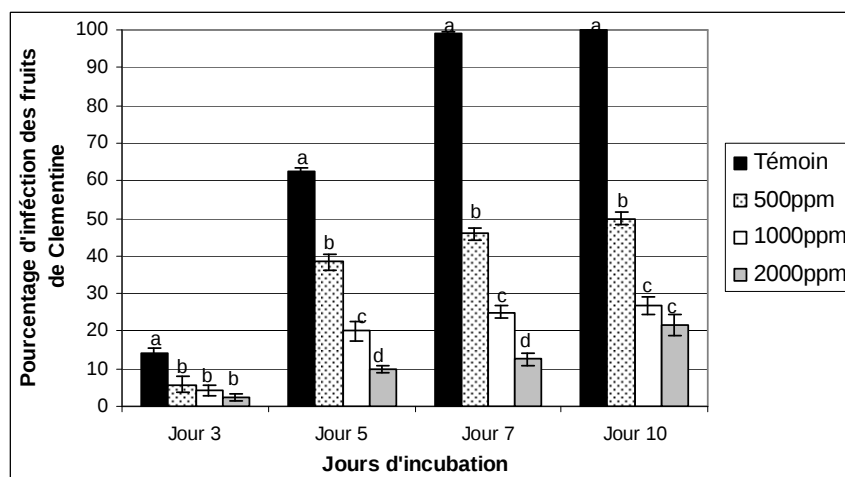


Figure 62 : Activité antifongique *in vivo* de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 3, 5, 7 et 10 jours d'incubation sur *Penicillium digitatum*.

Tableau 27 : Effet de différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* en fonction de l'infection sur des clémentines par les spores de *Penicillium digitatum*.

	Jour 3	Jour 5	Jour 7	Jour 10
Témoin	5,66a	25,00a	39,66a	40,00a
500 ppm	2,33b	15,33b	18,33b	20,00b
1000 ppm	1,66b	8,00c	10,00c	10,66c
2000 ppm	1,00b	4,00d	5,00d	8,66c

IV- Conclusion

Cette étude a démontré que les huiles essentielles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* ont une activité antifongique intéressante sur la croissance mycélienne des trois champignons *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*.

Il est important de noter que l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* a inhibé complètement la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum* dès la concentration 125 ppm. Ainsi, on note une CI₁₀₀ (concentration causant un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de 100%) estimée à 125 ppm pour *Penicillium digitatum*. Quant aux *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*, ils ont révélé des CI₁₀₀ estimées respectivement à 150 et 500 ppm.

Contrairement à *Asteriscus graveolens subsp. odoratus*, les résultats obtenus avec *Asteriscus imbricatus* ont révélé une CI₁₀₀ à 2000 ppm uniquement pour *Penicillium digitatum*

et *Botrytis cinerea*. Quant au *Penicillium expansum*, le pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de la plante étudiée a été estimé à 97,01% pour une concentration de 2000 ppm.

On note l'effet fongistatique de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* sur *Penicillium digitatum*. Quant à l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*, elle a un effet fongicide sur *Penicillium digitatum* et *Botrytis cinerea*.

Le test réalisé *in vivo* sur *Penicillium digitatum* a révélé un effet très significatif des trois doses testées de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* après 7 jours de stockage.

CHAPITRE III

**Activité antifongique des produits purs
d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et
Asteriscus imbricatus sur la croissance
mycélienne de *Penicillium digitatum*,
Penicillium expansum et *Botrytis cinerea***

I- Introduction

Plusieurs plantes locales marocaines sont utilisées par la population comme remèdes antifongiques. La plupart de ces plantes possèdent un caractère aromatique et contiennent des huiles essentielles qui peuvent être responsables de ces activités (El Mahi et *al.*, 1998 ; Khalouki et *al.*, 2000 ; Hmamouchi et *al.*, 2001 ; Lahlou et *al.*, 2001 a et b ; Arras et Usai, 2001).

Dans le but de rechercher les composés actifs dotés de propriétés antifongiques, nous avons étudié dans les chapitres précédents les composés majoritaires d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*. Il nous a semblé intéressant de tester les produits purs de ces plantes afin de mieux cerner leurs effets sur les champignons pathogènes de post récolte. A cet effet, de nombreuses molécules ont été testées à savoir les flavones, un acide phénol et les sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et les produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*.

II- Activité antifongique des produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

II-1- Activité antifongique de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*

Neuf concentrations de l'acide caféique (50, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 1000 et 2000 ppm) ont été utilisées pour tester la réponse des trois champignons étudiés (*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*). Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés pour déterminer les concentrations efficaces de l'acide caféique pour l'inhibition des trois champignons testés (Tableau 28).

Tableau 28 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en fonction des différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*.

	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
PI (BC) en %	32,20	43,56	49,24	53,03	64,39	70,83	73,48	84,85	96,97
PI (PD) en %	11,57	23,14	29,07	30,85	36,76	41,90	47,56	84,83	100
PI (PE) en %	12,41	21,53	29,20	46,35	48,91	50,00	63,87	82,12	100

PI : Pourcentage d'inhibition

a- Test *in vitro* de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea*

Une différence significative a été enregistrée quant à l'ampleur et l'évolution de l'effet des différentes doses de l'acide caféique (Figure 63 et Tableau 28) contre *Botrytis cinerea*. Les doses 50 et 150 ppm présentent une même allure avec des valeurs semblables. Ceci est le cas des doses 200 et 500 ppm tandis que les doses 1000 et 2000 ppm affichent une inhibition élevée plutôt différente. La dose 2000 ppm reste toutefois la meilleure quant à la rapidité et l'intensité et la stabilité de l'activité antifongique (Tableau 29).

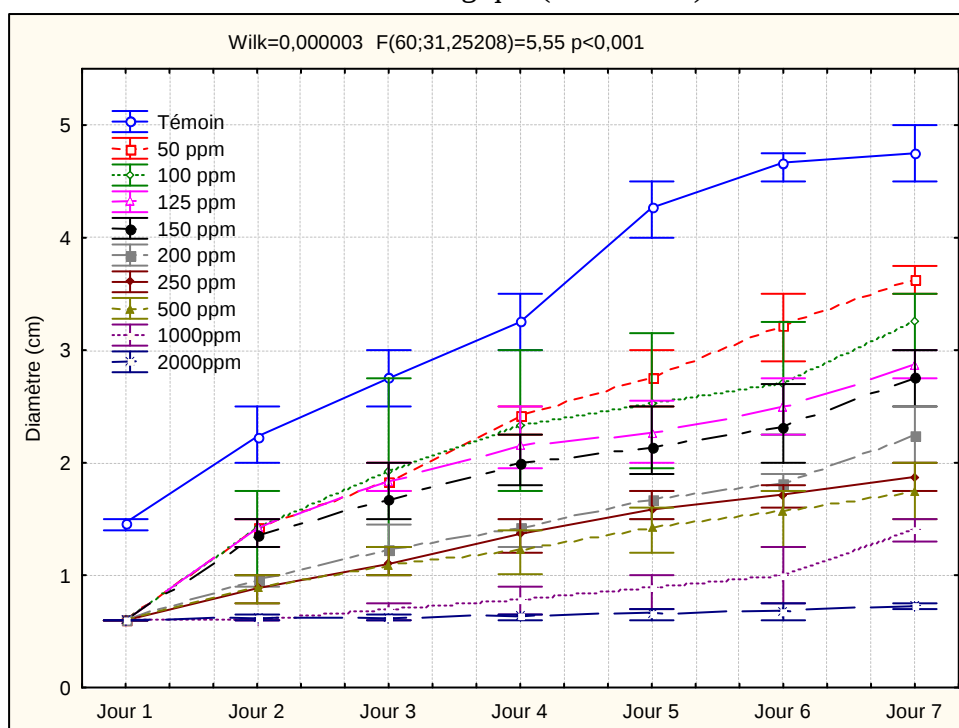


Figure 63 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 29 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoin	1,46a	2,23a	2,75a	3,25a	4,26a	4,66a	5a
50 ppm	0,60b	1,41b	1,83b	2,41b	2,75b	3,21b	3,58b
100 ppm	0,60b	1,41b	1,91b	2,33b	2,53b	2,70c	3,08c
125 ppm	0,60b	1,41b	1,83b	2,15b	2,26bc	2,50c	2,83c
150 ppm	0,60b	1,35b	1,66bc	2b	2,13cd	2,31c	2,66c
200 ppm	0,60b	0,96c	1,23cd	1,41c	1,66de	1,81d	2,16d
250 ppm	0,60b	0,88c	1,10d	1,36c	1,58e	1,71d	1,88d
500 ppm	0,60b	0,88c	1,08d	1,23cd	1,43e	1,56d	1,76d
1000 ppm	0,60b	0,60d	0,70d	0,78de	0,88f	1e	1,26e
2000 ppm	0,60b	0,60d	0,61d	0,63e	0,66f	0,68e	0,73f

b- Test *in vitro* de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*

La réponse du *Penicillium digitatum* est très semblable à celle du *Botrytis cinerea* (Figure 64 et Tableau 30). En effet, les différentes doses présentent toujours le même comportement précédemment décrit avec un rendement plutôt inférieur pour toutes les concentrations à l'exception de la dose 2000 ppm dont le pourcentage d'inhibition atteint pratiquement 100% (Tableau 28).

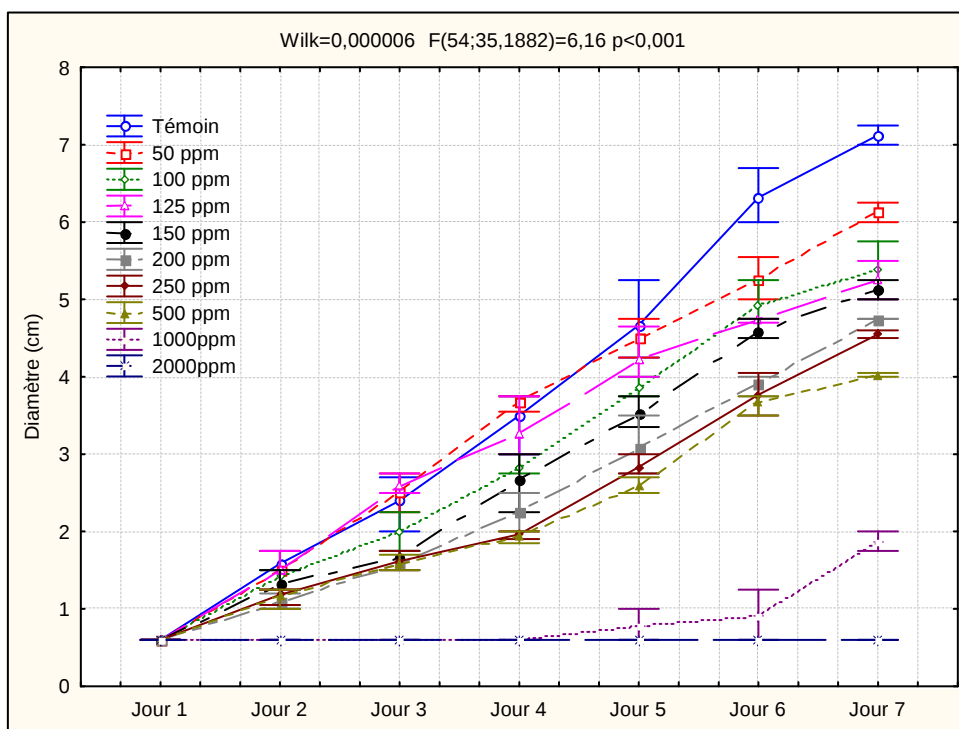


Figure 64 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 30 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoin	0,60a	1,58a	2,40a	3,50a	4,66a	6,31a	7,08a
50 ppm	0,60a	1,50ac	2,51a	3,66a	4,51a	5,26b	6,33b
100 ppm	0,60a	1,41ab	2b	2,83bc	3,85bc	4,91bc	5,58c
125 ppm	0,60a	1,50a	2,58a	3,25ab	4,21ab	4,73c	5,41c
150 ppm	0,60a	1,33ab	1,66c	2,66cd	3,53cd	4,58c	5,08cd
200 ppm	0,60a	1,10b	1,58c	2,25d	3,08d	3,91d	4,70de
250 ppm	0,60a	1,18bc	1,61c	1,96d	2,83de	3,76d	4,36ef
500 ppm	0,60a	1,16b	1,58c	1,95d	2,58e	3,66d	4f
1000 ppm	0,60a	0,60d	0,60d	0,60e	0,76f	0,91e	1,58g
2000 ppm	0,60a	0,60d	0,60d	0,60e	0,60f	0,60e	0,60g

c- Test *in vitro* de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium expansum*

Une hétérogénéité significative caractérise les effets des différentes doses sur le développement du *Penicillium expansum* aussi bien en termes d'intensité que de comportement au cours de la période d'incubation (Figure 65 et Tableau 31). Les doses 50-

125 ppm présentent des comportements semblables, ce qui est le cas des doses 150-250 ppm. Toutefois, en termes de pourcentage d'inhibition, la réponse du *Penicillium expansum* est très semblable à celle du *Penicillium digitatum*. La dose 2000 ppm reste toujours la plus efficace et atteint, depuis le premier jour d'incubation, une inhibition de 100% (Tableau 28).

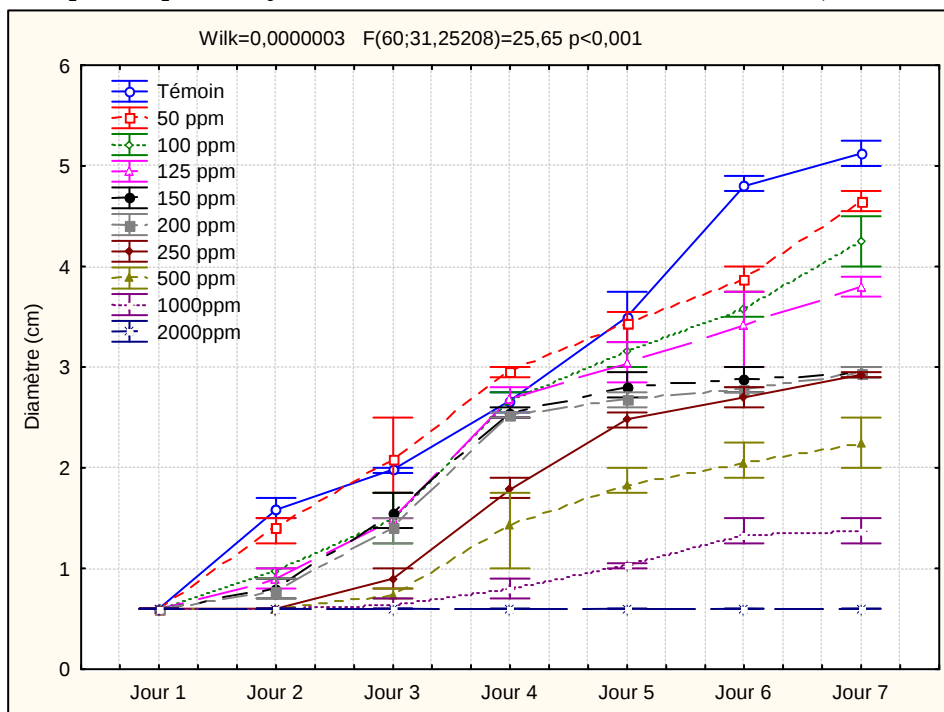


Figure 65 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 31 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de l'acide caféique d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7
Témoin	0,60a	1,58ab	1,98a	2,66a	3,50a	4,80a	5,16a
50 ppm	0,60a	2,58a	2,08a	2,96b	3,43a	3,88b	4,60b
100 ppm	0,60a	0,96b	1,50b	2,66a	3,15b	3,58c	4,18c
125 ppm	0,60a	0,90b	1,50b	2,68a	3,03bc	3,41c	3,83d
150 ppm	0,60a	0,80b	1,55b	2,55a	2,80cd	2,88d	3,05e
200 ppm	0,60a	0,76b	1,41b	2,53a	2,68de	2,78d	2,93e
250 ppm	0,60a	0,60b	0,90c	1,78c	2,48e	2,70d	2,88e
500 ppm	0,60a	0,60b	0,73c	1,43d	1,83f	2,05e	2,25f
1000 ppm	0,60a	0,60b	0,63c	0,80e	1,03g	1,33f	1,41g
2000 ppm	0,60a	0,60b	0,60c	0,60e	0,60h	0,60g	0,60h

L'étude menée sur l'activité antifongique de l'acide caféique sur les trois champignons *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* a montré une efficacité remarquable aux différentes concentrations de la molécule étudiée. En effet, les doses 50-125 ppm présentent une faible inhibition avec des valeurs semblables contre *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Pour les mêmes doses, l'étude a montré un effet modéré sur *Botrytis cinerea*. Les mêmes résultats ont été observés pour les doses 200 et 500 ppm. Quant aux doses 1000 et 2000 ppm, elles affichent une inhibition complète contre *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. En outre, en termes d'efficacité, *Botrytis cinerea* reste le plus sensible aux différentes concentrations de l'acide caféique.

L'effet antifongique de l'acide caféique pourrait être dû au groupement hydroxyle présent dans cette molécule. L'acide caféique a une structure très proche de l'acide cinnamique dont il dérive. Comme lui il présente un groupe acrylique en bout de chaîne, mais s'en différencie par la présence de deux groupes hydroxy sur le phényle qui lui donne des propriétés propres aux polyphénols. En effet, le nombre et les sites des groupements hydroxyle sont les deux facteurs responsables de la toxicité envers les microorganismes (Cowan, 1999). Ce même auteur a montré que l'augmentation de l'hydroxylation induit l'augmentation de la toxicité, d'où le rôle antifongique joué par cette hydroxylation. D'ailleurs, selon Cowan (1999), l'acide caféique est connu pour son grand pouvoir antifongique.

L'explication du mécanisme d'action responsable de la toxicité antifongique des acides phénols tient peut être à l'inhibition par les composés oxydés des enzymes fongiques à travers une réaction avec les groupements sulfhydryl ou bien avec des interactions non spécifiques avec les protéines fongiques (Cowan, 1999).

II-2- Activité antifongique des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

Neuf doses de trois flavones (névadensine, lutéoline et artemétine) ont été utilisées pour tester la réponse des trois champignons étudiés (*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*). Les pourcentages d'inhibition figurent dans le tableau 32.

Tableau 32 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en utilisant les différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor.*

		50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
Névadensine	PI (BC) en %	22,51	39,48	53,14	57,20	66,79	69,00	71,59	80,07	89,30
	PI (PD) en %	10,03	20,31	30,85	35,48	38,30	43,44	46,27	57,58	83,80
	PI (PE) en %	11,89	18,44	25,41	44,26	51,23	63,11	72,95	81,56	88,11
Lutéoline	PI (BC) en %	0,74	11,44	28,41	41,33	47,60	52,03	59,78	69,74	74,17
	PI (PD) en %	10,54	31,88	46,27	52,70	65,04	73,01	77,12	90,49	100
	PI (PE) en %	11,89	20,08	28,69	40,57	51,23	58,61	65,16	74,59	84,84
Artemétine	PI (BC) en %	3,32	6,27	17,71	30,26	33,95	43,17	47,60	59,78	67,16
	PI (PD) en %	21,59	29,31	43,70	48,07	50,64	59,13	70,18	81,75	91,00
	PI (PE) en %	14,75	25,41	50,41	61,07	75,41	81,15	85,25	94,26	97,95

PI : Pourcentage d'inhibition

a- Test *in vitro* des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea*

Les trois produits testés semblent avoir des effets inhibiteurs significativement différents (Figure 66 et Tableau 33). En effet, la névadensine présente l'effet le plus élevé des produits testés avec des pourcentages d'inhibition atteignant 80,07% et 89,30% pour les doses 1000 et 2000 ppm. L'artémétine est la moins efficace des trois produits avec une valeur maximale à peine de 67,16% pour la dose 2000 ppm. Quant à la lutéoline, elle présente un effet intermédiaire entre les deux autres molécules avec un taux estimé de 74,17% pour la concentration 2000 ppm (Tableau 32).

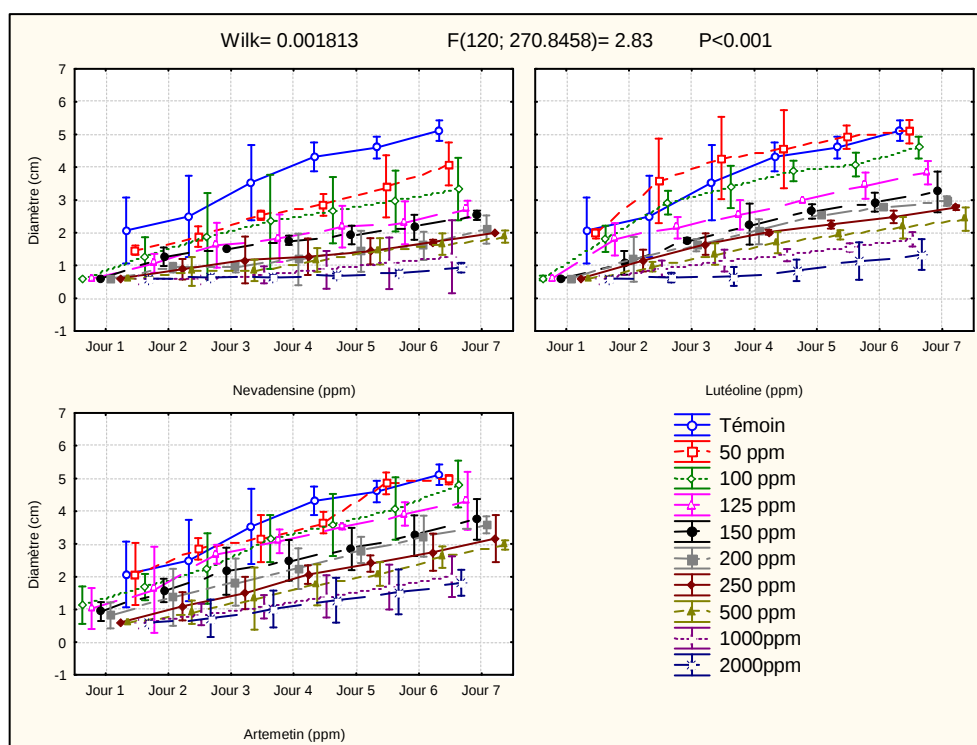


Figure 66 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 33 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50 ppm	100 ppm	125 ppm	150 ppm	200 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
Névadensine	3,37a	2,40a	2,15a	1,75a	1,68a	1,25a	1,29a	1,2a	0,94a	0,76a
Lutéoline	3,37a	3,56b	3,04b	2,48b	2,07b	1,95b	1,84b	1,58b	1,32b	0,99b
Artemétine	3,37a	3,28c	2,96b	2,87c	2,43c	2,27c	1,94c	1,75c	1,43b	1,29c

b- Test *in vitro* des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*

La réponse du *Penicillium digitatum* à l'effet antifongique des trois produits testés diffère significativement (Figure 67 et Tableau 34). La lutéoline présente l'effet le plus élevé des trois produits avec des pourcentages d'inhibition atteignant 90,49% pour la dose 1000 ppm et 100% pour la dose 2000 ppm. La névadensine a montré un faible effet sur *Penicillium digitatum* estimé à 83,80% pour la concentration 2000 ppm. Quant à l'artémétine, elle marque un effet intermédiaire allant jusqu'à 91% pour la concentration 2000 ppm (Tableau 32).

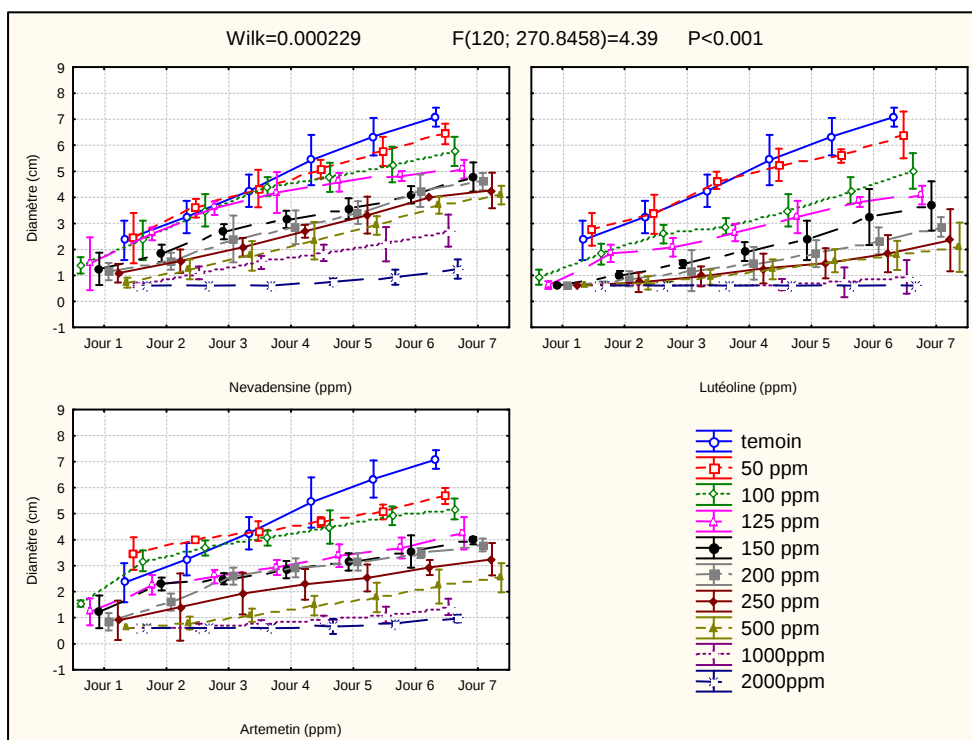


Figure 67 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 34 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
Névadensine	4,30a	4,17a	3,92a	3,75a	3,05a	2,88a	2,71a	2,39a	1,90a	0,91a
Lutéoline	4,30a	4,15a	3b	2,62b	2,03b	1,59b	1,31b	1,27b	0,76b	0,6b
Artemétine	4,30a	4,15a	3,8a	2,90c	2,79c	2,62c	2,17c	1,49c	1,03c	0,77c

c- Test *in vitro* des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium expansum*

A l'instar des autres champignons, les trois produits testés sur le *Penicillium expansum* présentent des effets inhibiteurs significativement différents (Figure 68 et Tableau 35). Toutefois, contrairement aux deux autres champignons, c'est l'artémétine qui affiche l'effet le plus élevé des trois produits avec des valeurs de 94,26% pour la dose 1000 ppm et 97,95% pour la dose 2000 ppm (Tableau 32).

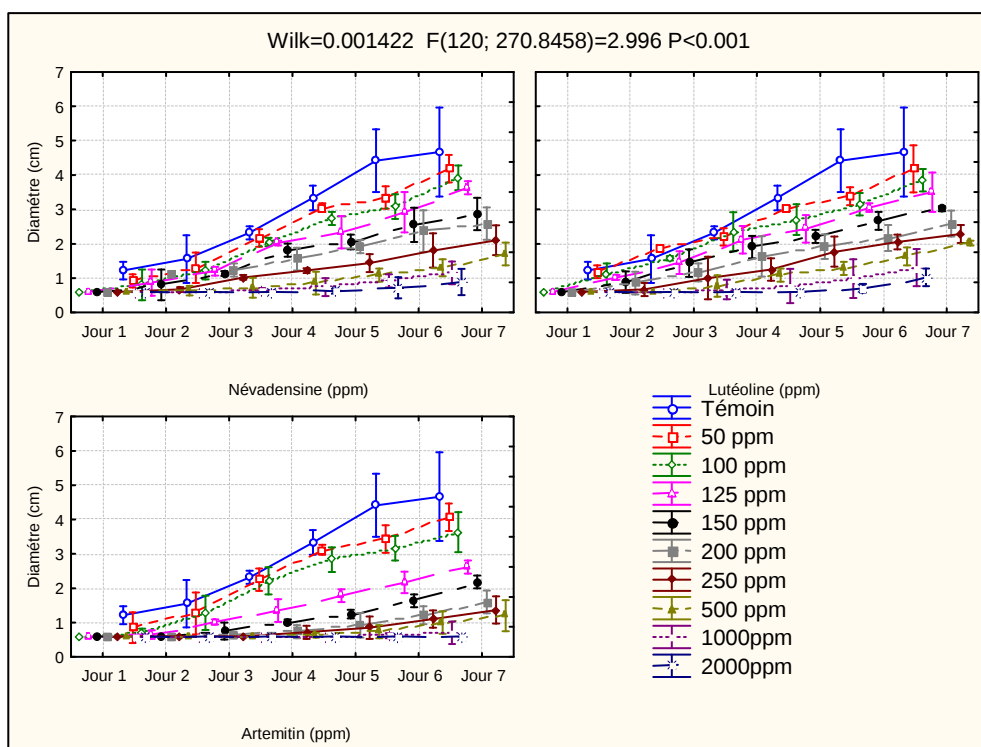


Figure 68 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 35 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des flavones d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
Névadensine	2,58a	2,22a	2,05a	1,93a	1,68a	1,62a	1,26a	0,98a	0,85a	0,72a
Lutéoline	2,58a	2,34b	2,19b	2,02b	1,81b	1,55a	1,37b	1,14b	0,93b	0,76a
Artemétine	2,58a	2,22a	2,06a	1,45c	1,14c	0,89b	0,83c	0,76c	0,65c	0,61b

En général, les trois flavones ont montré un effet antifongique très important sur les trois champignons *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. En effet, *Botrytis cinerea* est très sensible à la névadensine, le *Penicillium digitatum* est sensible à la lutéoline, quant au *Penicillium expansum*, il marque une sensibilité à l'artémétine.

Bruneton (1999) et Kurkin (2003) ont montré que les phénols simples, les acides phénoliques et les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antihémorragiques, des propriétés antibactériennes et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes.

Dans d'autres études de recherche, les flavonoïdes ont des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-tumorales (Harbone et Williams, 2000 ; Wang et al., 1999 ; Middleton et Kardasnam, 1993).

Kalt (2000) a montré que les flavonols et les flavones sont efficaces pour la lutte contre les champignons pathogènes des grains de céréales. Quant à Goutam (2008), il a montré que la névadensine a un effet anti-inflammatoire, cytotoxique et antituberculeux.

Cushnie et Lamb (2005) ont montré l'efficacité des flavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols...) dans l'activité antifongique, antivirale et antibactérienne.

Dans une étude présentée par Sertié et *al.*, (1990), l'artémétine extrait à partir de *Cordia verbenacea* DC (*Boraginaceae*) a montré une activité anti-inflammatoire chez les rats. Quant aux De Souza et *al.*, ils ont montré que cette molécule isolée de *Achillea millefolium* a réduit la pression artérielle moyenne des rats.

II-3- Activité antifongique des sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*

Neuf concentrations de deux sesquiterpènes naupliolide et asteriscunolide 3c ont été utilisées pour tester la réponse des trois champignons étudiés (*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*). Une augmentation des doses des deux produits sesquiterpéniques a été accompagnée par une augmentation de pourcentage d'inhibition (Tableau 36).

Tableau 36 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en utilisant les différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor*.

		50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
Naupliolide	PI (BC) en %	50,00	60,34	63,79	71,98	81,03	85,34	92,67	95,26	100,00
	PI (PD) en %	25,46	36,60	52,25	68,97	76,13	80,64	89,39	92,84	100,00
	PI (PE) en %	29,32	39,36	53,01	65,46	72,69	85,54	93,17	98,39	100,00
Asteriscunolide 3c	PI (BC) en %	24,14	36,21	45,69	81,03	84,48	92,24	97,41	100,00	100,00
	PI (PD) en %	27,06	39,26	45,09	53,58	70,03	87,00	89,92	92,57	93,10
	PI (PE) en %	13,65	31,73	37,75	43,78	53,82	64,26	76,71	88,76	94,78

PI : Pourcentage d'inhibition

a- Test *in vitro* des sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea*

Les deux produits testés naupliolide et asteriscunolide 3c ont affiché des comportements différents en fonction des concentrations utilisées. En effet, si le naupliolide présente de meilleurs résultats en termes d'inhibition de la croissance du *Botrytis cinerea* à des doses de 50, 100 et 125 ppm, l'asteriscunolide 3c, quant à lui, se présente plus efficace à des doses de 150 à 1000 ppm. Toutefois, à 2000 ppm les activités antifongiques des deux produits sont similaires (Figure 69 et Tableaux 36 et 37).

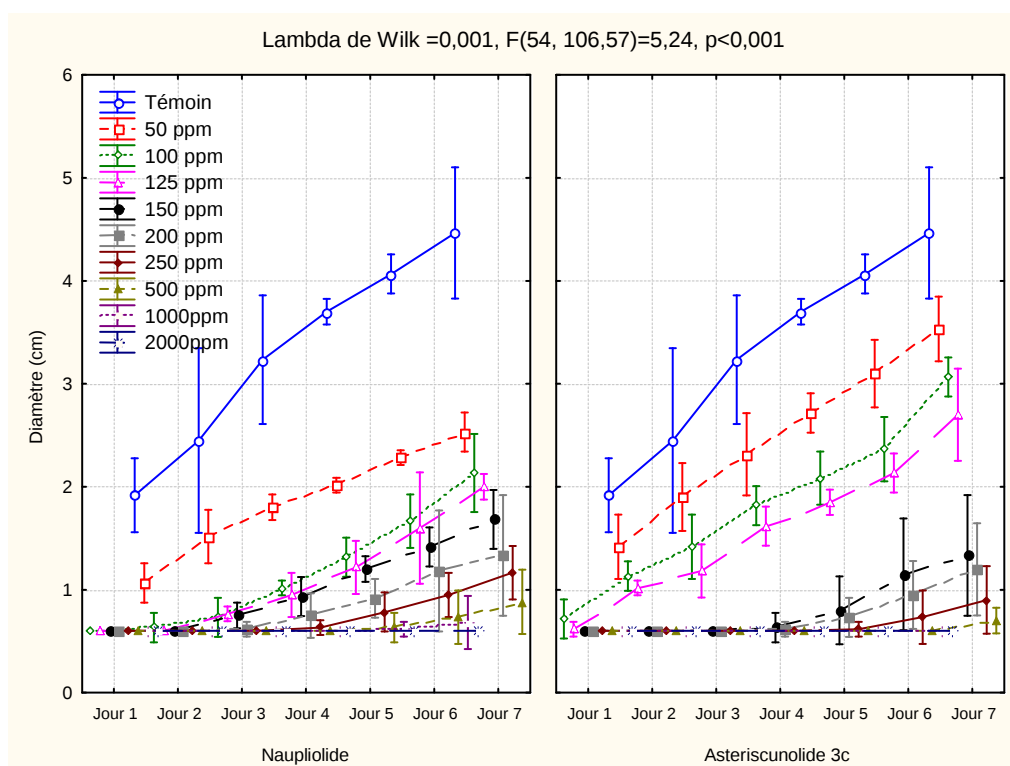


Figure 69 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 37 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
Naupliolide	3,01a	1,69a	1,15a	1,10a	1,02a	0,85a	0,76a	0,66a	0,64a	0,6a
Asteriscunolide 3c	3,01a	2,25b	1,8b	1,58b	0,81b	0,75b	0,66b	0,61b	0,6b	0,6a

b- Test *in vitro* des sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*

Penicillium digitatum semble répondre sensiblement aux deux produits testés (Figure 70). Toutefois, cette sensibilité est significativement plus accentuée vis-à-vis du naupliolide que de l'asteriscunolide 3c (Tableau 38). L'effet amplifié en fonction de la concentration utilisée est toujours remarquable (Tableau 36).

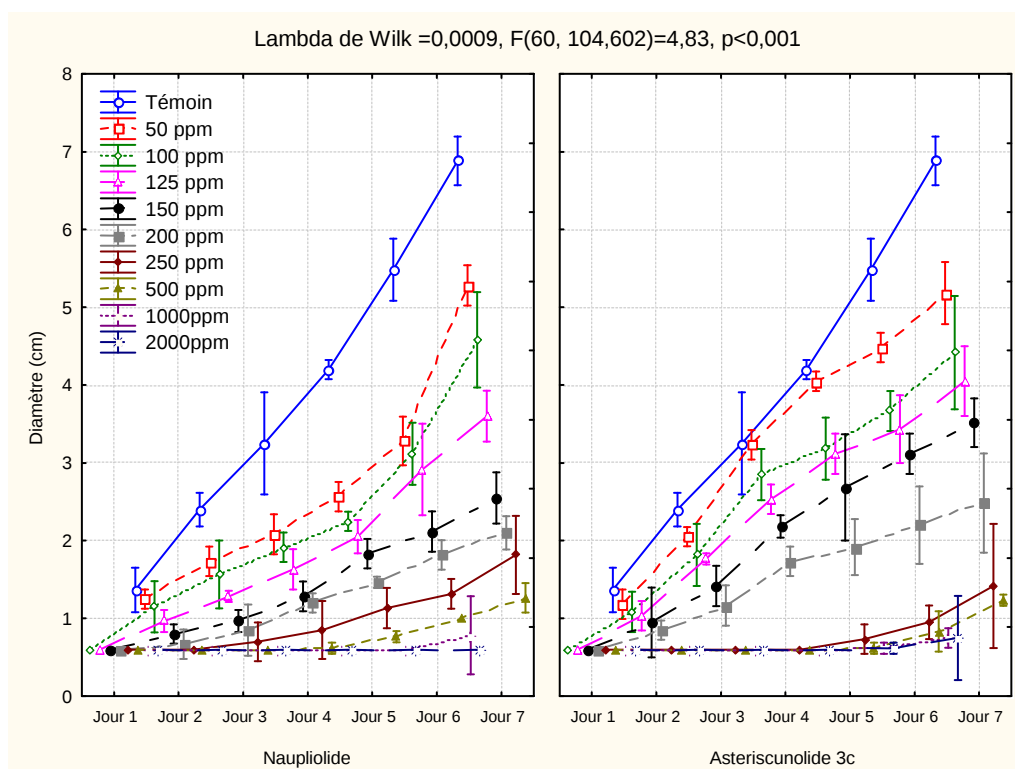


Figure 70 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 38 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
Naupliolide	3,45a	2,4a	2,16a	1,86a	1,45a	1,24a	1a	0,77a	0,69a	0,6a
Asteriscunolide 3c	3,45a	2,96b	2,51b	2,36b	2,06b	1,56b	0,78b	0,72b	0,69a	0,68b

c- Test *in vitro* des sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* sur la croissance mycélienne du *Penicillium expansum*.

A l'instar du *Penicillium digitatum*, le *P. expansum* répond sensiblement aux deux produits testés, avec une inhibition plus accentuée sous l'effet du naupliolide que de l'asteriscunolide 3c (Figure 71 et Tableaux 36 et 39).

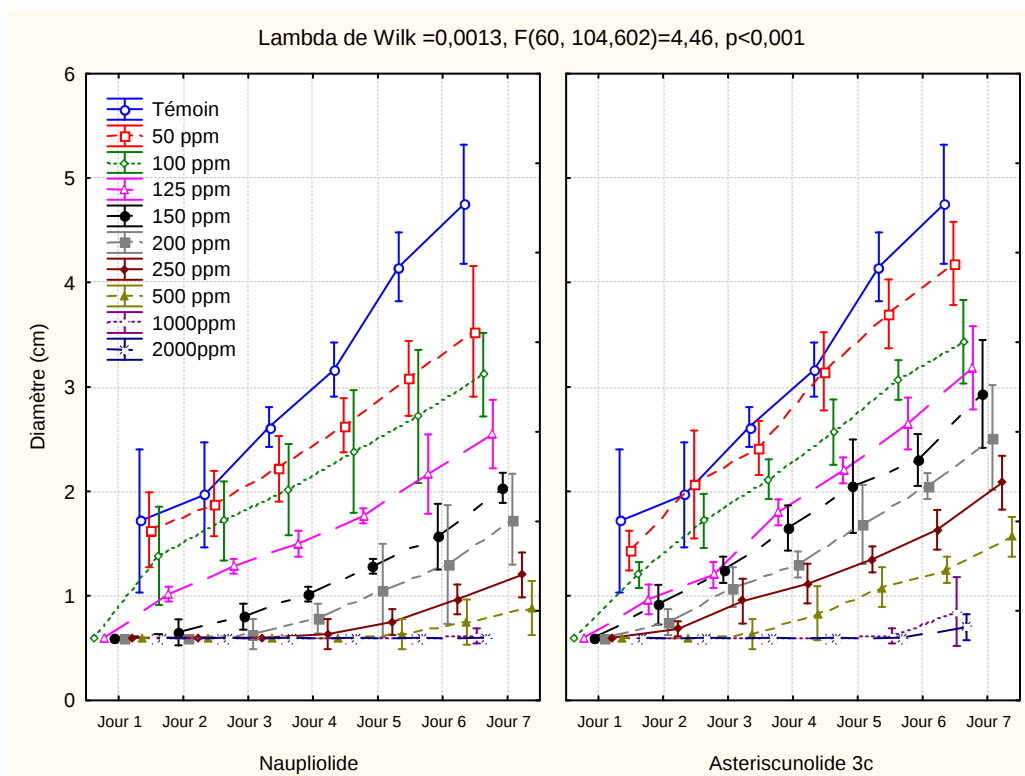


Figure 71 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

Tableau 39 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
Naupliolide	2,70a	2,22a	1,99a	1,55a	1,13a	0,95a	0,76a	0,66a	0,61a	0,6a
Asteriscunolide 3c	2,70a	2,50b	2,1b	1,8b	1,67b	1,42b	1,20b	0,93b	0,70b	0,64b

L'étude de l'activité antifongique des deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* a montré une meilleure efficacité sur les trois champignons testés. En effet, le naupliolide, la nouvelle molécule identifiée, a marqué une forte inhibition contre *Botrytis cinerea* à des doses de 50, 100 et 125 ppm et une inhibition complète à la concentration

2000 ppm. Cette même molécule a montré une meilleure efficacité sur *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Quant à la molécule asteriscunolide 3c, elle a marqué un effet remarquable sur *Botrytis cinerea* à des doses de 150 à 1000 ppm et une inhibition complète à la dose 2000 ppm. Toutefois, cette molécule paraît moyennement efficace sur *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

La recherche de l'activité biologique des lactones sesquiterpéniques a toujours été d'actualité. Ainsi, les propriétés phytotoxiques et cytotoxiques (due à l'existence du groupement α -méthylène- γ -lactone) des asteriscunolides ont fait l'objet d'une étude publiée par Rauter et *al.*, (2001).

Bruneton (1993) a montré que certaines lactones sesquiterpéniques ont une activité antibactérienne contre des germes Gram positif. C'est le cas de l'hénélanine de l'aunée (*Inula helenium*) et de la cnicine du chardon béni (*Cnicus beniductus*).

De même, il a été prouvé que certaines lactones sesquiterpéniques sont antifongiques (Mitscher et Hasennhuettl, 1975). L'artémisine est un anti malarique qui a donné d'excellents résultats sur l'Homme, tandis que l'ambrosine, un pseudoguaianolide d'*Ambrosia maritima*, est anthelminthique et molluscide (Bruneton, 1993).

III- Activité antifongique des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus*

Quatre produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* (α -pinène, *cis*-chrysanthenyl acétate, 2,5-dimethoxy-*p*-cymene et thymol isobutyrate) ont été utilisés en neuf concentrations pour tester la réponse des trois champignons étudiés (*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*).

Les pourcentages d'inhibition représentés dans le tableau 40 ont donné plus d'informations sur le comportement de ces composés envers les différentes doses des produits testés.

Tableau 40 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en utilisant les différentes concentrations des produits majoritaires de huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus*.

		50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
α -pinène	PI (BC) en %	38,77	48,19	50,36	56,88	65,94	68,84	72,10	75,36	84,78
	PI (PD) en %	3,07	8,70	11,51	18,41	22,51	29,92	34,78	45,52	49,62
	PI (PE) en %	16,03	25,57	29,77	38,93	41,98	50,00	55,34	59,54	66,41
cis-chrysanthenyl acetate	PI (BC) en %	7,97	11,59	24,28	28,26	35,87	46,38	51,81	53,62	63,77
	PI (PD) en %	4,09	9,97	12,53	17,14	24,04	33,50	43,22	50,13	79,80
	PI (PE) en %	3,05	11,83	21,37	26,34	38,93	45,04	48,85	66,41	77,48
2,5-dimethoxy- <i>p</i> -cymene	PI (BC) en %	5,07	11,59	19,20	23,91	25,72	29,35	38,77	55,07	87,68
	PI (PD) en %	5,63	14,32	17,14	24,04	44,25	76,21	86,45	94,37	100,00
	PI (PE) en %	3,05	16,41	25,95	33,59	43,51	53,44	69,08	81,30	90,84
Thymol isobutyrate	PI (BC) en %	13,77	24,28	39,49	40,58	50,36	56,88	65,22	80,80	100,00
	PI (PD) en %	7,42	20,72	36,83	59,34	72,89	75,45	80,82	94,37	100,00
	PI (PE) en %	6,49	15,27	31,68	34,35	44,27	54,20	66,03	86,64	100,00

PI : Pourcentage d'Inhibition

a-Test *in vitro* des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea*

La comparaison entre les effets des différents produits sur *Botrytis cinerea*, montre que l' α -pinène présente le meilleur effet inhibiteur pour les concentrations de 50 jusqu'à 1000 ppm, suivi du thymol isobutyrate puis du *cis*-chrysanthenyle acétate (Figure 72 et Tableau 41). Le 2,5-dimethoxy-*p*-cymene présente l'effet antifongique le plus faible. Toutefois, à 2000 ppm le thymol isobutyrate se présente comme le plus efficace des produits testés, suivi du 2,5-dimethoxy-*p*-Cymene puis de l' α -pinène (Tableau 40).

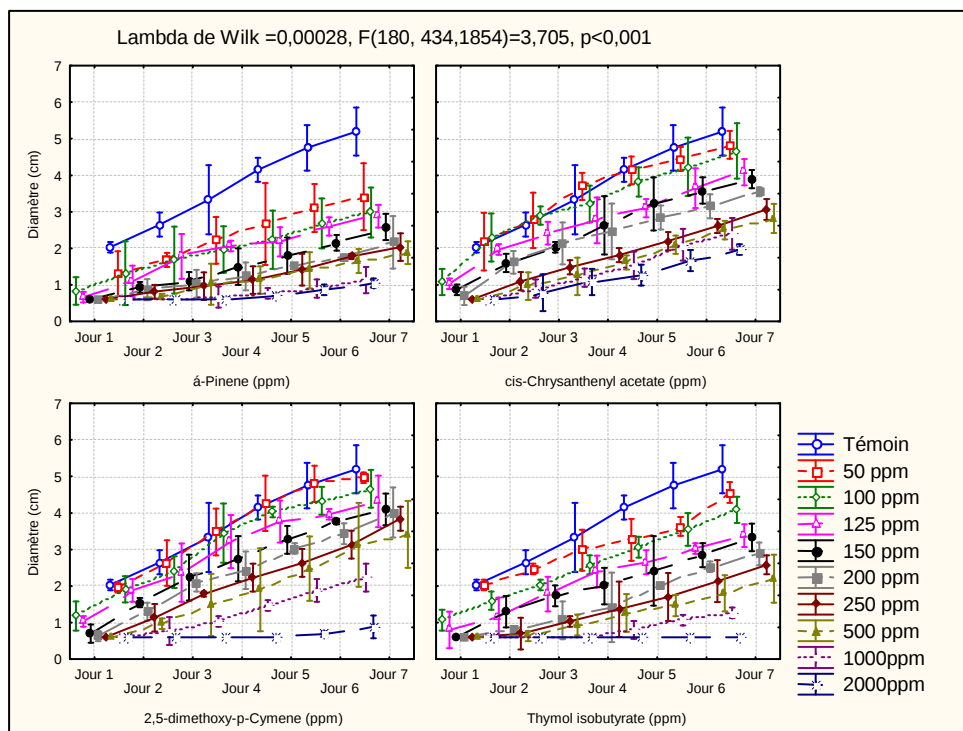


Figure 72 : Evolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 41 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations des molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
α -pinène	3,35a	2,17a	1,95a	1,89a	1,52a	1,31a	1,25a	1,19a	0,91a	0,81a
cis-chrysanthenyl acetate	3,35a	3,34b	3,17b	2,71b	2,54b	2,35b	1,84b	1,69b	1,63b	1,37b
2,5-dimethoxy-p-cymene	3,35a	3,34b	3,13b	2,93c	2,62b	2,42b	2,19c	1,99c	1,52c	0,73c
Thymol isobutyrate	3,35a	2,87c	2,56c	2,17d	2,03c	1,61c	1,44d	1,27a	0,91a	0,6d

b- Test *in vitro* des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*

Le 2,5-dimethoxy-*p*-cymene et le thymol isobutyrate présentent des effets antifongiques similaires sur *Penicillium digitatum* (Figure 73 et Tableaux 40 et 42). L'effet inhibiteur de ces deux produits est en fait le meilleur des produits testés. A 2000 ppm l'inhibition causée par l' α -pinène est classée la deuxième après le 2,5-diméthoxy-*p*-cymene et le thymol isobutyrate dont le taux d'inhibition à cette dose est très stable le long de la période d'incubation.

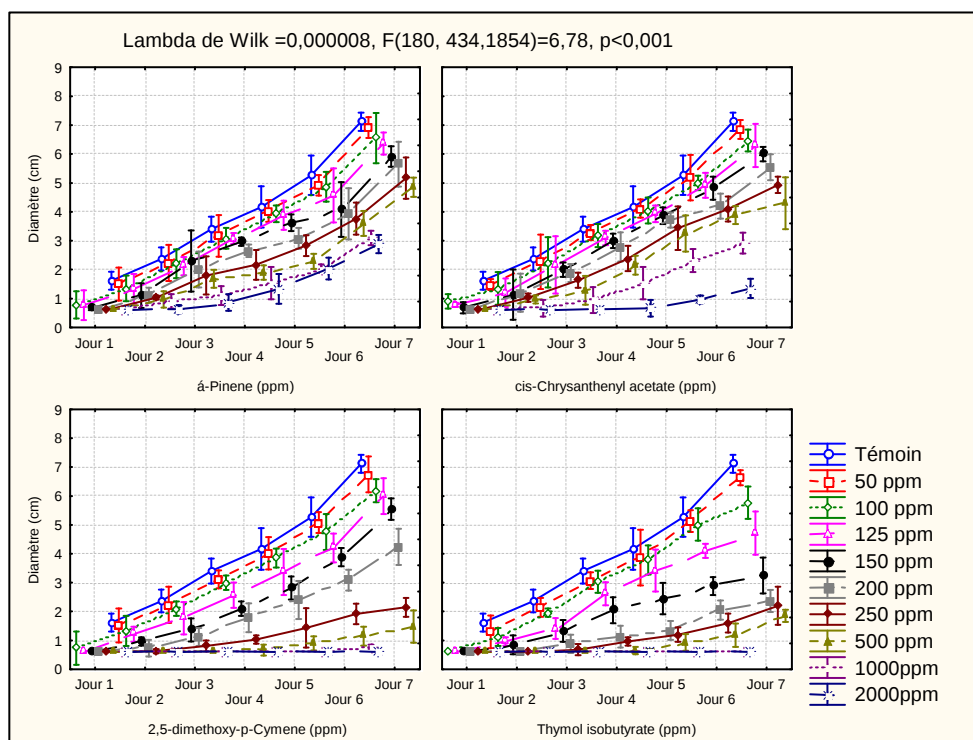


Figure 73 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 42 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations des molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
α -pinène	3,56a	3,38a	3,25a	3,15a	2,95a	2,71a	2,48a	2,26a	1,91a	1,74a
cis-chrysanthenyl acetate	3,56a	3,45a	3,31a	3,2a	3,07b	2,84b	2,58b	2,34a	1,83b	0,95b
2,5-dimethoxy-p-cymene	3,56a	3,36a	3,13b	2,81b	2,46c	1,99c	1,22c	0,85b	0,67c	0,6c
Thymol isobutyrate	3,56a	3,25b	3,04b	2,54c	1,91d	1,28d	1,12d	0,91b	0,65c	0,6c

c- Test *in vitro* des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium expansum*

Les résultats de la croissance mycélienne du *Penicillium expansum* montre que la différence entre les effets des quatre produits testés est très significative (Figure 74 et Tableau 41 et 43). Ce sont toujours le thymol isobutyrate et le 2,5-dimethoxy-*p*-cymene qui présentent respectivement les meilleurs effets inhibiteurs. L' α -pinène présente par contre l'effet le moins efficace pour la dose la plus concentrée (2000 ppm). Il est intéressant de noter que l'effet du thymol isobutyrate et le 2,5-dimethoxy-*p*-cymene à la concentration 2000 ppm est très stable

le long de la période d'incubation, ce qui n'est pas le cas pour l' α -pinène et le *cis*-chrysanthényle acétate.

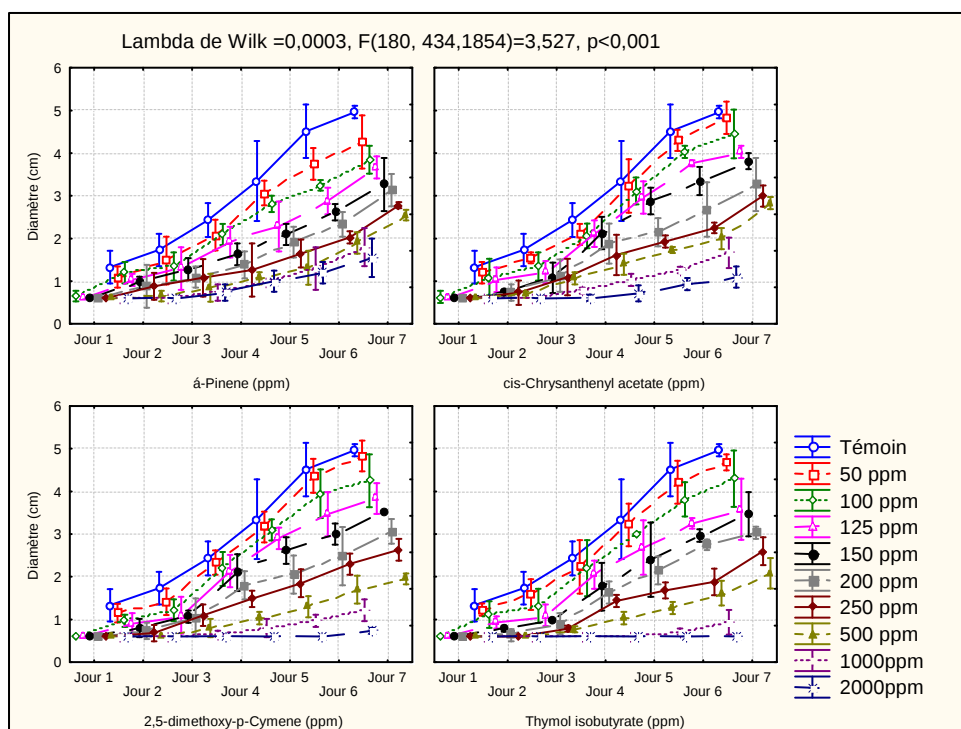


Figure 74 : Evolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant 7 jours d'incubation.

Tableau 43 : Variabilité de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations des molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* durant les 7 jours d'incubation.

	Témoin	50ppm	100ppm	125ppm	150ppm	200ppm	250ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
α -pinène	2,73a	2,36a	2,17a	1,95a	1,78a	1,62a	1,47a	1,27a	1,2a	1,10a
<i>cis</i> -chrysanthenyl acetate	2,73a	2,55b	2,39b	2,24b	2,08b	1,77b	1,60b	1,47b	1,14b	0,87b
2,5-dimethoxy-p-cymene	2,73a	2,55b	2,32b	2,13c	1,95c	1,68a	1,52a	1,14c	0,89c	0,67c
Thymol isobutyrate	2,73a	2,53b	2,33b	2,02a	1,85a	1,67a	1,36c	1,13c	0,74d	0,6d

La richesse de l'huile essentielle en composés monoterpéniques (75% du total de l'huile) pourrait être responsable de l'effet antifongique de cette huile sur les trois champignons testés. En effet, plusieurs travaux ont étudié l'efficacité des monoterpènes oxygénés dans l'activité antifongique (Pattnaik et *al.*, 1997 ; Edris et Farrag, 2003 ; Kordali et *al.*, 2005 ; 2007 ; Salamci et *al.*, 2007).

L' α -pinène, monoterpène hydrocarbure qui représente 5,53% du total de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* présente le meilleur effet inhibiteur pour les concentrations allant de 50 jusqu'à 1000 ppm sur *Botrytis cinerea*. Quant au thymol isobutyrate, monoterpène oxygéné, qui est le composé le plus abondant représentant 18,32% du total de l'huile essentielle, il est le plus efficace à la concentration 2000 ppm contre le même champignon. Ce même composé avec le 2,5-dimethoxy-*p*-cymene (16,21%) sont les plus efficaces sur *Penicillium digitatum*.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Chebli (2003) qui a montré que le thymol et le carvacrol ont une importante activité antifongique *in vitro*. Ces derniers ont affiché une inhibition complète de la croissance du mycélium de *Botrytis cinerea*, de *Phytophthora citrophthora*, de *Penicillium digitatum* et de *Geotrichum citri-aurantii* et ceci à 150 ppm après sept jours d'incubation. En plus de l'activité antifongique du thymol, celui-ci est un antioxydant fort (Jukié et Milos, 2005).

L'étude réalisée par Bourkhiss (2007) a montré que la richesse de l'huile essentielle en α -pinène peut conférer un pouvoir antifongique sur d'autres champignons comme *Penicillium parasiticus* et *Aspergillus niger* ainsi qu'une activité antibactérienne sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*.

Une autre étude dictée par Pauli (2001) a montré que le thymol est employé aussi en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques.

Le carvacrol et le thymol possèdent une activité antibactérienne et antifongique sur les mycètes phytopathogènes (Schwämmle et *al.*, 2001). L'huile essentielle de la menthe pouliot dont le composé majoritaire est la R (+) Pulégone (82%) est dotée également d'un fort pouvoir antifongique sur le *Penicillium* et le *Mucor* (Belghazi et *al.*, 2002).

IV- Conclusion

Les études effectuées pour l'évaluation de l'activité antifongique des produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus* ont montré une différence d'efficacité aussi bien pour les produits purs utilisés et les champignons testés que les différentes concentrations étudiées.

Tous les produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* ont montré une variation d'efficacité sur les trois champignons testés, aussi bien pour les flavones et l'acide caféique que pour les produits majoritaires des sesquiterpènes de cette plante.

L'acide caféique extrait d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* reste un composé à efficacité variable selon les concentrations utilisées. En effet, une inhibition modérée a été remarquée contre *Botrytis cinerea* pour les concentrations 50-500 ppm. En outre, l'acide caféique a présenté une faible inhibition contre *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* pour les mêmes doses. Toutefois, les concentrations 1000 et 2000 ppm affichent une inhibition complète contre *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. On peut conclure que, en termes d'efficacité, les différentes concentrations de l'acide caféique se sont montrées très efficaces sur *Botrytis cinerea*.

Les trois flavones ont révélé une importante efficacité sur *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. En effet, *Botrytis cinerea* est très sensible à la névadensine, le *Penicillium digitatum* est sensible à la lutéoline, quant au *Penicillium expansum*, il marque une sensibilité à l'artémétine.

L'étude de l'activité antifongique des deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens subsp. odor* testés sur les trois champignons a révélé une forte inhibition du naupliolide contre *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Quant à la molécule asteriscunolide 3c, elle a marqué un effet remarquable sur *Botrytis cinerea*. Toutefois, cette dernière molécule semble être moyennement efficace sur *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

Le test *in vitro* de l'activité antifongique des produits purs de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* a montré que l' α -pinène présente le meilleur effet inhibiteur pour les concentrations de 50 jusqu'à 1000 ppm sur *Botrytis cinerea*. Quant au thymol isobutyrate, il est le plus efficace à la concentration 2000 ppm sur le même champignon. Ce même composé avec le 2,5-dimethoxy-*p*-cymene, sont les plus efficaces sur *Penicillium digitatum*.

L'efficacité des produits purs pourrait être le sujet d'une investigation et une exploitation dans la lutte intégrée contre les trois champignons testés qui causent beaucoup de dégâts sur les fruits et légumes en post-récolte : *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

D- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I- Conclusion générale

Le present travail a porté sur l'étude phytochimique et antifongique de deux espèces médicinales et aromatiques de la famille des *Asteraceae* endémiques du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*. Ces deux plantes sont utilisées dans la pharmacopée traditionnelle marocaine pour le traitement de la fièvre, des désordres des tractus gastro-intestinaux, des douleurs céphaliques, de la bronchite, des coliques, des gastralgies et de la blennorrhagie. Elles sont utilisées aussi comme anti-inflammatoires et indiquées contre les migraines et pour calmer les maux de dents.

L'étude bibliographique préalable réalisée sur les deux plantes a montré que l'on disposait de peu d'informations sur ces espèces concernant leur composition chimique. Pour cette raison, nous avons analysé ces plantes et mis en évidence la présence des flavonoïdes et des lactones sesquiterpéniques dans le genre *Asteriscus*. Dans une deuxième étape nous avons jugé important de contribuer à la valorisation de ces deux plantes par le biais de l'étude phytochimique et antifongique.

Pour ce faire, nous avons au préalable effectué un criblage préliminaire des différentes familles de métabolites secondaires majoritaires des deux espèces citées en question. En effet, le screening phytochimique des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* a montré la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des terpènes, des coumarines et des composés cyanogénétiques. Quand aux saponines et les quinones libres, ils sont présents dans les fleurs des *Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* et ils sont absents dans les feuilles des deux plantes. L'identification des molécules par spectrophotométrie UV a montré la présence de l'acide caféique, la névadensine, la lutéoline et l'artémétine chez les feuilles d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*. Quant à l'*Asteriscus imbricatus*, on note la présence de l'artémétine tandis que d'autres molécules sont purifiées et en cours d'identification.

L'identification de l'huile essentielle d'*Asteriscus imbricatus* par GC-MS a montré la présence des produits majoritaires : le thymol isobutyrate et le 2,5-dimethoxy-p-cymène estimés, respectivement, à 18,32% et 16,21%. L' α -pinène et le cis-chrysanthényle acétate présentent des quantités modérées estimées, respectivement, à 8,22% et 5,53%. Quant à *Asteriscus graveolens subsp. odoratus*, elle présente une quantité élevée en 6-oxocyclonerolidol et *epi*- α -cadinol estimée respectivement à 30,72% et 14,50%. Le bisabolone, l' α -bisabolone

oxide, l'humulene epoxyde II, l' α -humulene, l' α -pinène, le myrtenylacetate et le trans-chrysanthényle acétate sont considérés comme des produits de quantité modérée estimée respectivement à 3,50%, 3,56%, 3,50%, 2,41%, 4,22%, 2,54% et 2%.

En utilisant les différentes techniques de la spectroscopie de résonance magnétique (RMN) et de l'infra-rouge (IR), une nouvelle lactone sesquiterpène a été isolée nommée naupliolide (C1) avec un nouveau squelette tétracyclique. De même, plusieurs composés connus mais décrits pour la première fois dans nos espèces étudiées ont été isolés : il s'agit de la molécule 6,7,9,10-tétrahydroasteriscanolide (2) et des asteriscunolides (3a, 3b, 3c et 3d).

Dans la partie biologique de notre travail, l'étude statistique de l'effet antifongique des extraits des feuilles et des fleurs des deux plantes étudiées a montré que les extraits « éther de pétrole » et « acétate d'éthyle » ont une spécificité très marquée pour *Penicillium digitatum*, beaucoup plus que pour *Penicillium expansum* aussi bien pour les feuilles que pour les fleurs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus*. La comparaison de l'effet antifongique entre les extraits des deux plantes a révélé une sensibilité de *Penicillium digitatum* à l'effet des extraits des deux plantes par rapport au *Penicillium expansum*.

Par ailleurs, nous avons montré que le test *in vitro* de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* présente un effet fongistatique sur *Penicillium digitatum*. Cette huile a inhibé complètement la croissance mycélienne du même champignon dès la concentration 125 ppm. Quant à l'huile d'*Asteriscus imbricatus*, elle présente un effet fongicide sur *Penicillium digitatum* et *Botrytis cinerea*. Le test *in vivo* sur *Penicillium digitatum*, a montré un effet très significatif de l'huile essentielle d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* après 7 jours de stockage.

Les études effectuées pour l'évaluation de l'activité antifongique des produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* a montré une inhibition complète de *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* par l'acide caféique en utilisant les concentrations 1000 et 2000 ppm. On peut conclure que, en termes d'efficacité, les différentes concentrations de l'acide caféique se sont montrées très efficaces sur *Botrytis cinerea*.

L'activité antifongique des trois flavones respectivement, la névadensine, la lutéoline et l'artémétine semble être démontrée sur *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

Le naupliolide a révélé une forte inhibition contre *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Quant à la molécule asteriscunolide 3c, elle a montré un effet remarquable sur *Botrytis cinerea*.

On note que l' α -pinène présente le meilleur effet inhibiteur pour les concentrations allant de 50 jusqu'à 1000 ppm contre *Botrytis cinerea*. Quant au thymol isobutyrate, il est le plus efficace à la concentration 2000 ppm sur le même champignon. Ce même composé avec le 2,5-dimethoxy-*p*-cymene, sont les plus efficaces sur *Penicillium digitatum*.

Cette étude a permis de mieux connaître la phytochimie des deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus*. Elles ont, en outre, démontré l'intérêt de ces plantes comme source de nouveaux produits naturels et de composés à activités biologiques et pharmacologiques prometteuses. Les sujets d'étude dans ce domaine sont fertiles et chaque plante représente un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacognosiques originales. Ainsi, l'efficacité des différents extraits des feuilles et des fleurs, des huiles essentielles et des produits purs d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* sur la croissance mycélienne des trois pathogènes : *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* pourrait présenter une éventuelle alternative aux fongicides synthétiques.

II- Perspectives

Le présent travail nous a permis de contribuer à la valorisation d'*Asteriscus graveolens subsp. odoratus* et *Asteriscus imbricatus* par le biais de l'étude phytochimique et de l'activité antifongique. Cette étude nécessite d'être complétée par un certain nombre de travaux. Ainsi, on se propose de :

- Poursuivre l'étude phytochimique et continuer la recherche sur les deux espèces étudiées afin d'isoler, de purifier et d'identifier d'autres métabolites secondaires contenus dans ces deux plantes.
- Elargir l'étude du spectre de l'activité biologique des deux plantes (contre d'autres champignons, contre les insectes, contre les bactéries ...)

- Etude de faisabilité de la commercialisation des produits antifongiques à base des huiles essentielles, des extraits et des produits purs isolés d'*Asteriscus graveolens subsp. odorus* et *Asteriscus imbricatus*. Cette étude nécessite un suivi *in vivo* de l'effet antifongique à grand échelle.
- Culture en masse en utilisant la culture *in vitro* des deux plantes pour amplifier la quantité des huiles essentielles extraites et qui constitue un réservoir riche en molécules. La recherche d'un milieu et des conditions de culture sont indispensables.

E- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Achbani, EH., Mounir, R., El Jaafari, S., Douira, A., Benbouazza, A., Jijakli, MH., 2005. Selection of antagonists of postharvest apple parasites: *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. Comm. App. Biol. Sci, Ghent University. 70 (3), 5 143-149.
- Adams, RP., 2001. Identification of essential oil components by Gas Chromatography. Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corp. Carol Stream (III, USA).
- Adikaram, NKB., Joyce, DC., Terry, LA., 2002. Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. Australian. Plant Pathol. 31, 223–229.
- Adio, AM., 2005. Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from essential oils of some liverworts (Hepaticae). These for the degree of Dr. rer. national à l'institut de chimie organique. Université de Hambourg. 280 p.
- Adrian, J., Potus, J., Fragne, R., 1995. La science alimentaire de A à Z. 2ème Edition. 38, Ed. Tec et doc. Lavoisier. 164-166.
- Agnihotri, A., Khatoon, S., Shanta, M., 2003. Pharmacognostical evolution of an antioxidant plant *Acorus calamus* linn. J. of Nat. Prod.
- Ahmed, AA., Ishak, MS., Micheal, HN., El-Ansari, MA., El-Sissi, HI., 1991. Flavonoids of *Asteriscus graveolens*. J. of Nat. Prod. 54, 1092-1093.
- Ahmed, AA., 1992. Farnesol and thymol derivatives from *Asteriscus pygmaeus*. J. of Nat. Prod. 55, 824-827.
- Ajouz, S., 2009. Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de doctorat. Université d'Avignon. 5, 198 p.
- Akssira, M., Mellouki, F., Salhi, A., Alilou, H., Saouf, A., El Hanbali, F., Jesus, FA., Barrero, AF., 2006. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens* sub sp. *odorus*. Tetrahedron Letters. 47, 6719-6721.

Ali-Emmanuel, N., Moudachirou, M., Akakpo, A.J., Quetin-Leclercq, J., 2002. Activités antibactériennes *in vitro* de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 35 (3), 183-187.

Al-Yahya, MA., 1986. Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. Fitoterapia. 57 (3), 179-182.

Alston, RE., Turner, BL., 1963. Biochemical systematics, Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, N.J. 404p.

Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A., 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14 (1), 141-148.

Andrews, JH., 1992. Biological control in the phyllosphere. Annu. Rev. Phytopathol. 30, 603-635.

Anima., 2005. La filière cosmétique dans la région Euro méditerranéenne», Notes et Etudes.

Arriaga, AMC., Rodrigues, FEA., Lemos, TLG., Lima, JQ., Santiago, GMP., de Oliveira MCF., Braz-Filho, R., Mafezoli, J., 2007. Composition and larvicidal activity of essential oil from *Stemodia maritima* L. Natural Product Communications. 2 (12), 1237-1239.

Arras, G., Usai, M., 2001. Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* (L.) Hofmegg oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. Journal of Food Protection. 46 (7), 1025-1029

Asad, SF., Singh, S., Ahmad, A., Hadi, SM., 1998. Flavonoids : antioxidants in diet and potentiel anticancer agents. Medical Science Research. 26, 273-728.

Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M. 2009. *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. Food Chem. 116, 289-294.

Attrassi, K., Benkirane, R., Attrassi, B., Badoc, A., Douira, A., 2007. Efficacité de deux fongicides benzimidazolés et de lanilinopyrimidine sur la pourriture des pommes en conservation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 146, 195-210.

B

Barbouche, N, Hajjem, B, Lognay, G , Ammar, M., 2001. Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 5 (2), 85-90.

Bardakci, H., Demirci, B., Yesilada, E., Kirmizibekmez, H., Husnu, K., Baser, C., 2011. Chemical composition of the essential oil of the subterranean parts of *Valeriana alliariifolia*. Rec. Nat. Prod. 6 (1), 89-92.

Barros-Filho, BA., Nunes, FM., Oliveira, MD., Andrade-Neto, M., Mattos, MC., Barbosa, FG., 2007. Secondary metabolites from *Esenbeckia almawillia* Kaastra (Rutaceae). Quvm Nova. 30, 1589-1591.

Barluenga, S., Dakas, PY., Boulifa, M., Moulin, E., Winssinger, N., 2008. Resorcylic acid lactones : a pluripotent scaffold with therapeutic potential. 11 (12), 1306-1317.

Bartel, S., Bohlmann, F., 1989. Total synthesis of the elemanolides ($\pm$) zempoalin A and B. Tetrahydron lett. 29, 3929-3932.

Baser, KHC., Demirci, B., Demirci, F., Koçak, S., Akinci, Ç., Malyer, H., Güleriyüz, G., 2002. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. Planta Med. 68 (10), 941-943.

Basta, A., Pavlovic, M., Couladis, M., Tzakou, O., 2007. Essential oil composition of the flowerheads of *Chrysanthemum coronarium* L. from Greece. Flavour and Fragrance Journal. 22 (3), 197-200.

Bate-Smith, EC., 1954. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. J. Linn. Soc. of London. 58 (371), 95 p.

Bayeux, MC., Fernandes, AT., Foglio, MA., Carvalho, JE., 2002. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 35, 1229-1232.

Belghazi, L., Lahlou, N., Alaoui Ismaili, M., Abousaouiria, T., Habti, N., Tantaoui, Iraki A., Talbi, M., Blaghen, M., Fellat-Zarrouch, K., 2002. Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielles de menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de Biochimie. Casablanca. Biochimie et santé.

Bellakhdar, J., 1997 : La pharmacopée traditionnelle marocaine : Médecine arabe ancienne et savoir faire. Ibis Press. 560-602

Bellakhdar, J., Baayaoui, A., Kazdari, A., Marechal, J., 1987. Herboristes et médecine traditionnelle à Tissint, oasis présaharien du Sud Marocain (province de Tata). Al Biruniya. 3 (1), 7-50.

Benabid, A., 2000. Flore et écosystème du Maroc, évaluation et présentation de la biodiversité. Ibis Press, paris. 359 p.

Bencheqroun, S., 2009. Etude des mécanismes d'action implique le biocontrôle d'une souche d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud vis-à-vis de *Penicillium expansum* link sur pommes en post-récolte. Thèse de doctorat es Sciences Agronomiques de l'Université de Liège 144 p.

Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, JM., Bernardini, J.F., Costa, J., 2007. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction : Comparison with hydrodistillation. Food Chem. 106, 132-139.

Binet, P., Brunel, J.P., 1967. Physiologie végétale. Tome II. Edit., Doin.

Blache, D., 2001. Rôle bénéfique des polyphénols et du resveratrole du vin. Equation-Nutrition. n° 16.

Blakeman, JP., Brodie, IDS., 1977. Competition for nutrients between epiphytic micro-organisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. Physiol. Plant Pathol. 10, 29-42.

Blakeman, JP., Fokkema, NJ. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20, 167-192.

Bocevskaja, M., Sovova, H., 2007. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow ; *J. of Supercritical Fluids.* 40, 360-367.

Bohlmann, F., Pauls, A., 1992. Humulane derivatives from *Nauplius intermedius* *Phytochemistry.* 31, 1663-1665.

Boulet, C., Bouhache, M., Wahbi, M., Taleb, A., 1991. Les mauvaises herbes de Souss. Ed., Actes Edition, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat. 295 p.

Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Chaouch, A. 2007. Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetralina articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science* 03(2), 232-242.

Brahmachari, G., Mondal, S., Jash, SK., Mandal, KS., Chattopadhyay, S., Gangopadhyay, A., 2006. Naturally occurring bioactive O-heterocycles : A quest for new sources. *Nat Prod Indian J.* 2, 74-7.

Brahmachari, G., 2008. *Limnophila* (Scrophulariaceae): Chemical and pharmaceutical aspects. *Open Nat Prod J.* 1, 34-43.

Bristow, PR., McNichol, RJ., Williamson, B., 1986. Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to Grey mould development. *Ann. Appl. Biol.* 109, 545-554.

Brown, GE., Eckert, JW., 1988. Compendium of citrus diseases. Whiteside, J.O., Graney, S.M. et Timmer L.M. (Edits). American Phytopathological Society. 32-38.

Bruneton, J., 1993. *Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales*, éditions Techniques et documentations Lavoisier. 915 p.

Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème Edition, Editeur technique et documentation, Paris. 1120p.

C

Caillard, J., 2003. Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. 6 p.

Carlile, WR., 1988. Environmental and toxicological considerations. In control of crop diseases. 78-79. Carlile WR. (Eds). Edward Arnold.

Carnat, AP., Carnat, A., Fraisse, D., Ricoux, L., Lamaison, JL., 1998. The aromatic and polyphenolic composition of roman camomille tea. *Fitoterapia*. 75(1), 32-38.

Carvalho, RN., Moura, LS., Rosa, PTV., Meireles, MAA., 2005. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) : Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity, *J. of Supercritical Fluids*. 35, 197-204.

Castoria, R., De-curtis, F., Limi, G., Caputo, L., Pacifico, S., De-Cicco, V., 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits : study of its mode of action. *Postharvest boil. Technol.* 22 (1), 7-17.

Castro-Lopez, T., Izquierdo, I., Perez, L., 1981. Response of lemons to various harvesting and postharvest treatments. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 2, 737-739.

Charchari S., Dahoun A., Bachi F., Benslimani A. 1996. *In vitro* antimicrobial of essential oils of *Artemisia herba-alba* and *Artemisia judacia* from Algeria. *Rivista-Italiana-EPPOS*. 18, 3-6.

Chebli, B., 2003. Etude chimique et antifongique de plantes médicinales marocaines et valorisation des plantes endémiques de la région du Souss. Thèse de Doctorat National de l'Université Med V-Soussi, Faculté de médecine et de pharmacie. 187 p.

Chemat, F., Lucchesi, ME., Smadja, J., Favretto, L, Colnaghi, G., Visinoni, F., 2006. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender : A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta*. 555, 157-160.

Chen, YF., Tsai, HY., Wu, TS., 1995. Antiinflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*. 61, 2-8.

Cheriti, A., Saad, A., Belboukhari, N., Ghezali, S., 2007. The essential oil composition of *Bubonium graveolens* (Forssk.) Maire from the Algerian Sahara. Flavour Fragr. J. 22, 286-288.

Cheriti, A., 2000. Plantes médicinales de la région de Bechar, sud ouest Algérie : Etude Ethnopharmacologique. Rapport CRSTRA, Algérie.

Chidiak, S., Guada, M., Buitrago, D., Morales, A., 2007. Flavonoids isolate from specie *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon Pers). Ciencia.15, 361-365.

Chizzola, R., 2011. Composition of the essential oils from *Anthriscus cerefolium* var. *trichocarpa* and *A. caucalis* growing wild in the urban area of Vienna (Austria). Nat Prod Commun. 6 (8), 1147-1150.

Chung, CJ., Geahlen, RL., 1992. Protein-tyrosine kinase inhibition: Mexchanism-based discovery of antitumor agents. J Nat Prod. 55, 1529-1560.

Coley-smith, JR., Verhoeff K., Jarvis WR., 1980. The biology of *Botrytis*, Academic Press, London. 318 p.

Cowan, MM., 1999. Plants products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12 (4), 564-582.

Curtis, OF., Shetty, K., Cassagnol, G., Peleg, M., 1996. Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, eugenol, carvacrol and thymol) on a food spoilage yeast (*Debaromyces hansenei*). Food Biotechnology. 10, 55-73.

Cushnie, TP., Lamb, AJ., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. antimicrob. Ag. 26, 343-356.

D

Dastmalchi, K., Damien Dorman, HJ., Oinonen, PP., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., 2008. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. Food and science technology LWT. 41 (3), 391-400.

Dawidar, A.M., Ayyad, S.N., Abdel-Mogib, M., Alarif, W.M., 2005. Humulene sesquiterpene lactones from *Asteriscus schimperi*. J. of Saudi Chem. Soc. 9 (1), 137-142.

De Billerbeck, VG., 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Phytothérapie, 5 (5), 249-253.

Delaveau, P., 1974. Plantes agressives et poisons végétaux. Ed. Horizons de France, 1974, 237 p.

Département de l'environnement, 1997 : Etude nationale sur la biodiversité. Projet GEF 6105/92.

De Souza, P., Gasparotto, AJr., Crestani, S., Stefanello, MÉ., Marques, MC., Da Silva-Santos, JE., Kassuya, CA., 2011. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. Phytomedicine. 18 (10), 819-25.

De Whally, CV., Rankin, SM., Hoult, JR., Jessap, W., Leake, DS., 1990. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. Biochem. Pharmacol. 39, 1743-1750.

Deysson, G., 1954. Eléments d'anatomie des plantes vasculaires. Ed. SEDES, 268 p.

Diallo, MA., 2003. Contribution à l'étude de la composition en polyphenols de *Tephrosia pedicellata.bak*. Mémoire de DEA de chimie et biochimie des produits naturels. Université Cheikh Anta Diop Dakar, Sénégal.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, AA., Capasso, F., 1999. Flavonoids : old and new aspects of class of natural therapeutic drugs. Life Sciences. 65, 337-353.

Dobignard, A., Chatelain, C., 2010-11. Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord. vol. 1, 2, 3, vol. 4 et 5 *in prep*.

Dohou, N., Yamni, K., Badoc, A., Douira, A., 2004. Activité antifongique d'extraits de *Thymelaea lythroides* sur trois champignons pathogènes du riz. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 143, 31-38.

Domsch, KH., Gams, N., Anderson, NTH., 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press LTD, London, 859 p.

Dorman, HJD., Deans, SG., 2000. Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308-316.

Doskotch, RW., Elferaly, FS., Fairchild, E., Huang, C., 1957. Chem commun. 402 p.

Du, J., Gao, L., 1992. Chemical constituents of the leaves of *Acanthopanax trifoliatum* (Linn) Merr. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 17, 356-357.

Duthie, SJ., Dobson, VL., 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxydative attack *in vitro*. Eouro. J. Nutr. 38, 28-34.

E

Eckert, 1982 : Les maladies d'après récolte des fruits d'agrumes, des produits maraîchers et leur contrôle. University of Califonia USA. In : 1^{er} Séminaire sur le conditionnement, la conservation et l'emballage des agrumes, Edité par O.C.E, SASMA, IMEC. Casablanca.

Edris, AE., Farrag, ES., 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. Nahrung/ Food. 47, 117-121.

Egan, D., O'kenney, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., Thornes, D., 1990. Drug. Metabolism reviews. 22 (5), 503-529.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., 2004. *Botrytis spp.* and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. In : *Botrytis : Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1-9.

Elad, Y., Köhel, J., Fokkma, NJ., 1994a. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. Euro. J. Plant pathol. 100, 315-336.

Elad, Y., Köhel, J., Fokkma, NJ., 1994b. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology*. 84, 1193-1200.

El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amarti, F., Aberchane, M., 2008. Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc.* 12 (4), 345-351.

El-Dahmy, S., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Sarg, TM., 1985. New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*. 41 (2), 309-316.

Elangovan, V., Sekar, N., Govindasamy, S., 1994. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Lett.* 87, 107-113.

Elferaly, FS., Chan, Y.M., Fairchild, E., Doskotch, RW., 1977. Peroxycostunolide and peroxyparthenolide : two cytotoxic germacranolide hydroperoxides from *Magnolia grandiflora*. Structural revision of verlоторin and artemorin. *Tetrahedron lett.* 18 (23), 1973-1975.

ElMahi, M., Essassu, EM., Hmamouchi, M., 1998. Etude de l'activité antimicrobienne et antibilharienne du *Zizyphus vulgaris*. *Fitoterapia*. 68, 284-88.

Essawi, T., Srour, M., 2000. Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 70, 343-349.

F

Farkas, L., Nogradi, M., Sudarsanam, V., Herz, W., 1966. Constituents of *Iva* species. V. Isolation, structure, and synthesis of nevadensin, a new flavone from *Iva nevadensis* M.E. Jones and *Iva acerosa* (Nutt.) Jackson. *J Org Chem*. 31, 3228-32.

Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., Ochocka, JR., 2003. Antibacterial and antifungal activity of *Juniper berry* oil and its selected components. *Phytotherapy Research*. 17, 227-231.

Fitter, AH, 1986. Effect of benomyl on leaf phosphorus concentration in alpine grasslands : a test of mycorrhizal benefit. *New Phytologist*. 103 (4), 767-776.

Fennane, M., 2004. Proposition de Zones Importantes pour les Plantes au Maroc (ZIP Maroc). *Inst. Sci.* 25, 4-8.

Feresin, GE., Tapia, A., Gimenez, A., Ravelo, AG., Zacchino, S., Sortino, M., 2003. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 89, 73-80.

Flamini, G., Tebano, M., Cioni, PL; Ceccarini, L, Ricci, AS., Longo, I., 2007. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *J. Chromatogr. A*. 1143, 36-40.

Fravel, DR., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337-359.

Fuller, RW., Bokesch, HR., Gustafson, KR., Mckee, TC., Cradellina, JH., Mcmhon, JB., Cragg, GM., Sojaerto, D., Boyd, MR., 1994. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4 (16), 1961-1964.

Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Mihashi, K., Nakano, Y., Matsunaga, H., Ktano, M., Mori, M., 1999. Antiproliferative constituents from *Umbelliferae* plants. V. A new furanocoumarin and faltarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1), 96-100.

G

Ganapaty, S., Chandrashekhar, VM., Chitme, HR., Lakashmi Narsu, M., 2008. Free radical scavenging activity of gossypin and nevadensin : An *in vitro* evaluation. *Indian J Pharmacol.* 39 (6), 281-283.

Garcia-argaez, AN., Apan, TOR., Delgado, HP., Velazquez, G., Martinez-Vazquez, M., 2000. *Planta. Medica.* 66, 279-281.

Garg, SC., Siddiqui, N., 1992. Antifungal activity of some essential oil isolates. *Pharmazie*. 47 (6), 467-468.

Ghaleb, IA., 1990. Le cycle sexué *in vitro* de *Botryotinia fukeliana* (De bary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (pers). Thèse de doctorat l'université Lille 1, Lille. 228 p.

Ghfir, B., Dargent, R., 1995. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Hyssopus officinalis* sur *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) : Conséquences cytologiques et biochimiques. - Thèse de doctorat. Université de Toulouse 3. Toulouse, France, 213 p.

Gibault, T., 2001. Flavonoïdes et cœur. Equation-nutrition. n° 14 (APRIFEL).

Gindro, K., 2000. Etudes de la sporulation de *Botrytis cinerea* Pers. Fr.: purification, caractérisation et rôle d'une cutinase constitutive des conidies non germées. Thèse de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.

Goetz, P., 2004. Les plantes immunostimulantes adjuvantes de la thérapeutique antitumorale. *Phytothérapie*. 2 (6), 180-182.

Goutam, B., 2008 : *Limnophila (Scrophulariaceae)* : Chemical and pharmaceutical aspects. *The Open Natural Products Journal*. 1, 34-43.

Greenham, J., Vassiliades, DD., Harborne, JB., Williams, CA., Eagles, J., Grayer, RJ., 2001. A distinctive flavonoid chemistry for the anomalous genus *Biebersteinia*. *Phytochemistry*. 56, 87-91.

Greuter, WF., 1997. Save *Asteriscus*, sink *Nauplius* (*Compositae*). *Flora Mediterranea* [Palermol]. *Medit*. 7, 41-48.

Griffin, SG., Wyllie, SG., Markham, JL., Leach, DN., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*. 14, 322-332.

Grigonis, D., Venskutonis, PR., Sivik, B., Sandahl, M., Eskilsson, CS., 2005. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*. 33 (3), 223-233.

Guinard, J.L., 1979. Abrégé de biochimie végétale 2ème Ed; Masson, Paris. 1 (2), 193-197.

H

Hadolin, M., Hras, A.R., Bauman, D., Knez, Z., 2004. Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 5 (2), 245-248.

Harbone, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55, 481-504.

Hariri, E.B., Salle, G., Andary, C., 1991. Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). Protoplasma. 162, 20-26.

Hartwell, L.J., Abbott, B.J., 1969. Antineoplastic principles in plants : recent developments in the field. Adv. Pharm. Chem. 7, 117 p.

Hassall, K.A., 1990. Toxicological considerations. In : The biochemistry and uses of pesticides. 10-17. Hassal, K.A. (Eds). Macmillan.

Hatanaka, A., Kajiwar, T., Sekiya, J., 1987. Biosynthesis pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. Chem Phys Lipids. 44, 341-361.

Hendrickson, J.B., 1959. Stereochemical implications in sesquiterpene biogenesis. Tetrahedron. 7, 82-9.

Herz, W., 1977. Biogenetic aspects of sesquiterpenes lactones chemistry, Israel J. Chem. 19, 32.

Hiermann, A., Reidlinger, M., Juan, H., Sametz, W., 1991. Isolation of the antiphlogistic principle from *Epilobium angustifolium*. Planta Med. 57, 357-360.

Hiermann, A., Schramm, H.W., Laufer, S., 1998. Antiinflammatory activity of myricitin-3-O-beta-D-glucuronide and related compounds. Inflamm. Res. 47, 421-427.

Hill, R.A., 1993. In the chemistry of natural products, 2nd edition (Ed.R.H.Thomson), Blackie, Glasgow. 124 p.

Hmamouchi, M., Hmamouchi, J., Zouhdi, M., Bessiere, JM., 2001. Chemical composition properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. Journal of essentialoil research. 13, 298-302.

Holmes, GJ., Eckert, JW., 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. Phytopathology. 89, 716-721.

Hsiou, YD., Yang-ch, W., Hang-ch, L., 2000. Journal of the Chinese Chemical Society. 47, 561-566.

Hyun, J., Hyun, JK., Hyang, SC., 2007. Quntitative structure activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. Life Sciences. 80, 835-841.

I

Ibn Tattou, M., Fennane, M., 1989. Aperçu historique et état des connaissances sur la flore vasculaire du Maroc. Bull. Inst. Sci. 13, 85-94.

Idrissi Hassani, LM., 1985. Etude de la variabilité flavonique chez deux conifères méditerranéennes : Le pin maritime *Pinus pinaster* Ait. et le genévrier thurifière *Juniperus thurifera* L. Thèse de Doctorat de 3^e cycle. Université Claude Bernard Lyon I, France. 171 p.

Idrissi Hassani, LM., 2000. Contribution à l'étude phytochimique du harmel *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*) et étude de ses effets sur la reproduction et le développement du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk. Thèse Doctorat d'Etat, Université Ibn Zohr, Agadir, 214 p.

Idrissi Hassani, LM., Hermas, J., 2008. Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera, Acrididae). Zool. Baetica. 19, 71-84.

Idrissi Hassani, LM., Ould Ahmedou, ML., Mayad, EH. Bouaichi, A., 2002. Pouvoir insecticide de *Peganum harmala* sur *Schistocerca gregaria* : Effets de l'huile et des extraits de feuilles. Biologie et Santé. 2 (2), 122-133.

Ikan, R., 1969. Natural products. A laboratory guide. Academic Press; London, New York and San Fransisco. 17, 19 p.

Ippolito, A., El Ghaouth, A., Wilson, CL., Wisniewski, M., 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defence responses. Postharvest Biol. Technol. 19, 265-272.

Ippolito, A., Schena, L., Pentimone, I., Nigro, F., 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. Postharvest Biology and Technology. 36 (3), 245-252.

J

Jahandiez E., Maire R., 1931-1934. Catalogue des plantes du Maroc, 3 vols. Minera, le chevalier, Alger.

Jakupovic, J., Lehmann, L., Bohlmann, F., Hogdson, AA., 1987. Nerolidol derivatives from *Asteriscus sericeus*. Phytochemistry. 26 (10), 2854-2855.

Janisiewicz, WJ., Roitman, J., 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepecia*. Phytopathology. 78, 1697-1700.

Janisiewicz, WJ., 1998. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits, Challenges and opportunities. In Plant-Microbe interactions and Biological control, ed. G.J., Boland, L.D., Kuykendall. 171-198. New York : Marcel Dekker.

Janisiewicz, WJ., Leverentz, B., Conway, WS., Saftner, RA., Reed, AN., Camp, MJ., 2003. Control of bitter rot and blue mold of apples by integrating heat and antagonist treatments on 1-MCP treated fruit stored under controlled atmosphere conditions. Postharvest Biology and Technology. 29, 129-143.

Javidnia, K., Miri, R., Moein, MR., Kamalinejad, M., Sarkarzadeh, H., 2006. Constituents of the essential oil of *Stachys pilifera* Benth. from Iran. The Journal of essential oil research. 18 (3), 275-277.

Jay, M., Gonnet, JF., Wollenweber, E., Voirin, B., 1975. Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxinomique. Phytochemistry. 14, 1605- 1612.

Jijakli, MH., Lepoivre, P., 1998. Characterization of an exo-b-1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*. 88, 335-343.

Jukić, M., Milos, M., 2005. Catalytic oxidation and antioxidant properties of Thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.). *Croatica Chemica Acta*. 78 (1), 105-110.

K

Kahlek, W., 1830. *Arch. Pharm.*, 34, 318, *Belsteins Handbuch der organischen Chemie*, (1933). 17, 499.

Kalemba, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813-829.

Kalt, C., 2000. *Agriculture et agroalimentaire Canada*, Centre de recherches de l'Atlantique sur les éléments de l'horticulture, Kentville, N. E. B4N 1J5.

Kayser, O., Kolodziej, H., 1997. Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Medica*. 63, 508-510.

Khalighi-Sigaroudi, F., Hadjiakhoondi, A., Shahverdi, AR., Mozaffarian, VA., Shafiee, A., 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ferulago bernardii* Tomik and M. Pimen. *DARU*. 13 (3), 100-104.

Khalil, I., Al Mughrabi, A., Talal, A., Aburjai, B. 2003. Fungitoxic activity of root extracts from *Ferula harmonis*. *Phytopathol. Méditerran.* 42, 141-148.

Khalouki, F., Hmamouchi, M., Younes, C., Soulimani, R., Bessiere, JM., Essassi, M., 2000. Antimicrobial and molluscicidal activities of essential oil of *Chrysanthemum viscidifolium*. *Fitoterapia*. 71, 413-16.

Kim, J., Marshall, MR., Wei, CI., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Agricultural and Food Chemistry*. 43, 2839-2845.

Kneki, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Heliovaara, M., Teppo, I., Pukkala, E., Aromaa, A., 1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms Am. J. Epidemiol. 146 (3), 223-230.

Koedam, A., 1982. The influence of some distillation conditions on essential oil composition. World Crops : Production, Utilization, Description. 7, 229-236.

Koedam, A., Scheffer, JJC., Svendsen, AB. 1980: Comparison of isolation procedures of essential oils. VI. Rosemary and sage. Riechstoffe, Aromen, Kosmetica. 30, 271-276.

Kofinas, C., Chinou, I., Loukis, A., Harvala, C., Roussakis, C., Maillard, M., Hostettmann, K., 1998. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. Planta. Medica. 64, 174-176.

Köller, W., Scheinpflug, H., 1987. Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors : a new challenge. Plant Dis. 71, 1066-1074.

Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., Yildirim, A., 2005. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. J. Agric. Food Chem. 53, 1408-1416.

Kordali, S., Kotan, R., Cakir, A., 2007. Screening of *in-vitro* antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes as plant disease control agents. Allelopathy J. 19, 373-392.

Kossouh, C., Moudachirou, M., Adjakidje, V., Chalchat, JC., Figueredo, G., 2008. Essential oil chemical composition of *Anacardium occidentale* L. Leaves from Benin. Nat Prod Commun. 20 (1), 5-9.

Kovat, E., 1958. Gas-Chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil I: Retentions-Indices aliphatischer Halogenide, Alkaloide, Aldehyde und Ketone. Helv. Acta. 41, 1915-1932.

Kukongviriyapan, U., Luangaram, S., Leekhaosong, K., Kukongviriyapan, V., Preeprame, S., 2007. Antioxidant and vascular protective activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. Biol Pharm Bull. 30, 661-6.

Kupchan, SM., Fessler, DC., Eakin, MA., Giacobbe, TJ., 1970. Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. *Science*. 168, 376-378.

Kupchan, SM., Eakin, MA., Thomas, AM., 1971. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* 14 (12), 1147-1152.

Kurkin, VA., 2003. Phenylpropanoids from medicinal plants : distribution, classification, structural analysis, and biological activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 39 (2).

Kwon, YS., Kobayashi, A., Kajiyama, SI., Kawazu, K., Kanzaki, H., Kim, CM., 1997. Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* roots. *Phytochemistry*. 44 (5), 887-889.

L

Lacoste, E., Chaumont, JP., Mandin, D., Plumel, MM., Matos, F., 1996. Les propriétés antiseptiques de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* Cham. Application à la microflore cutanée. 54 (5), 228-230.

Lahlou, M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18, 435-448.

Lahlou, M., Berrada, R., Agoumi, A., Hmamouchi, M., 2001a. The potential effectiveness of essential oils in the control of human head lice in Morocco. *International journal of Aromatherapy*. 10 (3-4), 108-28.

Lahlou, M., Berrada, R., Hmamouchi, M., 2001b. Molluscicidal activity of thirty essential oils on *Bulinus truncatus*. *Thérapie*.

Latorre, BA., Spadaro, I., Rioja, ME., 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*. 21, 957-961.

Lee, Y., Howard, LR., Villalon, B., 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Food Sci.* 60 (3), 473-476.

Lebreton, PH., Jay, M., Voirin, B., Bouchez, MP., 1967. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chim. Anal. Fr.* 49, 175-383.

Lebreton, P., Meneret, G., 1964. Elements de chimiotaxonomie bonatique. I. Généralités ; notion d'espèce biochimique ; cas des flavonoides chez *Humulus lupulus*. L Bull. Soc. Bot. 111, 70-80.

Le Floc'H, E., 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Pub. Sci. Tunis. Programme Flore et Végétation Tunisiennes. 2 Part. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, 402 p.

Leroux, P., 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. Biomedical and Life Sciences. 195-222.

Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., Arras, G., 1999. Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23, 223-229.

Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R., De Cicco, V., 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semicommercial conditions. Eur. J. Plant Pathol. 109, 341-349.

Lino, CS., Traveira, ML., Viana, GSB., Matos, FJA., 1997. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents : Coumarin and umbelliferone. Phytother. Res. 11, 211-215.

Lucchesi, ME., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W., Chemat, F., 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L : A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. J. of Food Engineer. 79, 1079-1086.

M

Maach, A., Jemali, A., 1986. Etude des caractéristiques physico-chimiques des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc : Menthe Naa Naa Abdi, Coriandre. Bulletin de l'IAV Hassan II, Rabat, Maroc.

Macheix, JJ., Fleuriet, A., 1993. Phenolics in fruit products : progress and prospects in Polyphenolic Phenomena, Ed. A. Scalbert, INRA Paris, 157-163.

Malo, N., 1991. 10^{ème} Journées Internationales HE, Digne-Les-Bains 5-6-7. 28 p.

Marchal, JA., Wuts, PGM., 1978. Stereocontrolled total synthesis of alpha.- and beta.-santonin. J. Org. Chem. 43 (6), 1086-1089.

Marles, RJ., Pazos-Sanou, CL., Compadre, CM., Pezzuto, JM., Bloszyk E., Arnason, JT., 1995. Sesquiterpene lactones revisited : recent developments in the assessment of biological activities and structure relationships. Recent Advances in Phytochemistry. 29, 333-356.

Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., Dessi, A., 2004. Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*. Phytoter. Res. 18, 789-792.

Materska, M., Piacenteb, S., Stochmalc, A., Pizzab, C., Oleszekc, W., Peruckaa, I., 2003. Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L. Phytochemistry. 63 (8), 893-898.

Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satomi, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., 1993. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. Cancer Res. 53, 1328-1331.

Meccia, G., Rojas, LB., Velasco, J., Díaz, T., Usubillaga, A., 2007. Composition and antibacterial screening of the essential oils of leaves and roots of *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. 2.(12), 1221-1224.

Melekmi, N., Saad, A., Belboukhari, N., Cheriti, A., 2006 : Antimicrobial activity of the essential oil of *Bubonium graveolens*. Annales de l'Université de Bechar n° 2. 22-24.

Mengal, P., Beh, D., Bellido, G.M., Monpon, B., 1993. VHMD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes. Parfums Cosmétiques Arômes. 114, 66-67.

Middleton, JE., Kardasnam, C., 1993. The flavonoids, advances in research Ed. J. B.

Mikani, A., Etebarian HR., Sholberg, PL., O'Gorman, DT., Stokes, S., Alizadeh A., 2008. Biological control of apple grey mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. Postharvest Biology and Technology. 48(1), 107-112.

Miller, MW., Jerves, TM., 1979. The persistence of benomyl tolerance in *Botrytis cinerea* in glass house tomato crops. Plant Pathol. 28, 119-122.

Min-Ha, K., Jin, HP., Hyosing, W., Choug, WP., 2000. Flavonoid chemistry and chromosome numbers of fallopian section *Pleuropterus (Polygonaceae)*. Rev Can Bot. 78 (9), 1136-1143.

Milcent, R., Chau, F., 2003. Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentale, chimie et biochimie des principaux composés naturels. EDP sciences.

Mitscher, LA., Hasenhuettl, G., 1975. Phytochemistry. 9, 243-283.

Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara, Y., Tomita, I., 1995. Effects of various natural antioxidants on the Ca^{2+} mediated oxidative modification of low density lipoprotein. Biol. Pharm. Bull. 18, 1-4.

Miura, S., Tomita, T., Watanabe, T., Hirayama, T., Fukui, S., 1998. Active oxygens generation by flavonoids. Biol. Pharm. Bull. 21, 93-96.

Modzelewska, A., Sur, S., Kumar, K.S., Khan, S.R., 2005. Sesquiterpenes : Natural products that decrease cancer growth. Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents. 5, 477-499.

Moll, Manfred., Moll, Nicole., 1998. Additives alimentaires et auxiliaires technologiques Dunod. Paris. 25-26, 55-56.

Mohammadi, M., Yousefi, M., Habibi, Z., 2010. Essential oils from stem and leaves of *Angelica urumiensis* (Mozaffarian) from Iran. Nat Prod Res. 24 (14), 1347-51.

Monteil, CH., 1953. La legende du Wagadou et l'origine des Sarakole. Melanges ethnologiques. Memoires IFAN. n° 23. Dakar, 359-408.

Morel, I., Abalea., Sergent, O., Cillard, P., Cillard, J., 1998. Involvement of phenoxyl radical intermediates in lipid antioxydant action of myricetin in iron-treated rat hepatocyte culture. Biochem. Pharmacol. 55, 1399-1404.

Morin, P., Gunther, C., Peyron, L. et Richard, H. 1985. Physical and chemical phenomena involved in steam distillation. Bulletin de la Societé Chimique de France. 5, 921-930.

Moroh, JLA., Bahi, C., Dje, K., Loukou, YG., Guede-Guina, F., 2008. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-redheat (*Rubiaceae*) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 77, 44-61.

Mouffok, S., 2011. Étude de métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* spp. *Omphalotricha Asteraceae*. Mémoire de Magister en chimie organique. Université Hadj Lakhdar Batna. Faculté des sciences. Algérie. 178 p.

Murakami, A., Tanaka, T., Lee, JY., Surch, YJ., Kim, HW., Kawabata, K., Akamura, Y., Jiwajinda, S., Ohigashi, H., 2004. Zerumbone, a sesquiterpene en subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. International journal of cancer. 110, 481-490.

Muriel, KA., Félix, TZ., Figueredo, G., Chalard, P., N'guessan, YT., 2011. Essential oil of three *Uvaria* species from Ivory Coast. Nat Prod Commun. 6(11). 1715-8.

N

Nance, MR., Setzer, WN., 2011. Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus* L.) commonly used in beer brewing. Journal of Brewing and Distilling. 2 (2), 16-22.

Nezhadali, A., Parsa, M., 2010. Study of the volatile compound in *Artemisia sagebrush* from Iran using HS/SPME/GC/MS. International Journal of Environmental Science and Development. 1 (3), 287-289.

Ngassoum, MB., Ngamo Tinkeu, LS., Ngatanko, I., Tapondjou, LA., Lognay, G., Malaisse F., Hance, T., 2007. Chemical composition, insecticidal effect and repellent activity of essential oils of three aromatic plants, alone and in combination, towards *Sitophilus oryzae* L. (*Coleoptera: Curculionidae*). Natural Product Communications. 2 (12), 1229-1232.

Nugon-Baudon, L., 1994. Toxic-Bouffe. Enquête sur les aliments d'aujourd'hui. Marabout, ed Jean-Claude Latté. 76, 227.

Nuriddinov, KR., Khodzimatov, KK., Aripov, KN., Ozek, T., Demirchakmak, B., Basher KHC., 1997. Essential oil of *Perovskia scrophulariifolia*. Chemistry of Natural Compounds. 33 (3), 299-300.

O

Okada, Y., Miyauchi, N., Suzuki, K., Kobayashi, T., Tisutsui, C., Mayuzumi, K., Nishibe, S., Okuyama, T., 1995. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. Chem. Pharm. Bull. 43 (8), 1385-1387.

Ono, K., Nakane, H., 1990. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerises by several flavonoids. J. Biochem. 108, 609-613.

Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, JC., Barre-sinoussi., 1990. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverses transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. Eur. J. Biochem. 190, 469-476.

Oyama, Y., Fuchs, PA., Katayama, N., Noda, K., 1994. Myricetin and quercetin, the flavonoids constituents of *Ginkgo biloba* extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca^{2+} loaded brain neurons. Brain Res. 635, 125-129.

P

Palou, L., Usall, J., Munoz, JA., Smilanick, JL., Viñas, I., 2002. Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. Postharvest Biology and Technology. 24, 93-96.

Paris, M., Hurabielle, M., 1981. Abrégé de matière médicale Tome I. Masson, 82-101, 104, 105, 153.

Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios. 89, 3946.

Pauli, A., 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. Int. J. Aromather. 11, 126-133.

Peeking, A., Picand, B., Hacene, K., Lokiec, F., Guérin, P., 1987. Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. 6, 512-3.

Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* strawberry. Can. J. Plant Pathol. 13, 247-257.

Pharmacopée française, 1984. Edition Maison neuve les moulins, Paris.

Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042.

Polach, F.J., Abawi, G.S., 1975. The occurrence and biology of *Botryotinia fuckliana* on beans in New York, Phytopathology. 65, 657-660.

Polatoglu, K., Demirci, F., Demirci, B., Gören, N., Başer, K.H., 2010. Antibacterial activity and the variation of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Essential oils from Turkey. J Oleo Sci. 59 (4).177-84.

Pommer, E.H., Lorenz, G., 1987. Dicarboximide fungicides. In : Modern selective fungicides : Properties, application and mechanisms of action. 91-106. Lyr, H. (Eds). L.S.T.

Porter, N., 2001. Essential oils and their production. Crop et Food Research. n° 39.

Prusky, D., 1985. Development, persistence, survival, and strategies for control of thiabendazole-resistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruits. Phytopathology. 75, 877-882.

Punja, Z., Utkhede, R., 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends Biotechnol. 21, 400-407.

Q

Qiuyin, C., Ronald, O R., Ruiwen, Z., 1997. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. Cancer Lett. 119, 99-107.

Quezel, P., Médail, F., 1994. La région circum-méditerranéenne, centre mondial majeur de biodiversité végétale. Actes 6^{ème} Rencontre de l'A.R.P.E. : 152-161, Gap, France.

R

- Raal, A., Kaur, H., Orav, A., Arak, E., Kailas, T., Müürisepp, M., 2011. Content and composition of essential oils in some *Asteraceae* species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. 60 (1), 55-63.
- Ramdani, M., Lograda, T., Chalard, P., Figueredo, G., Chalchat, JC., Zeraib, A., 2011. Essential oil variability in natural Hahadjerine population of *Cupressus dupreziana* in Tassili n'Aïer (Algeria). *Forest Research Open Access*. 1 (1), 1-4.
- Randerath, K., 1971. *Chromatographie sur couches minces*. Paris : Édition Gauthier-Villars. 337-339.
- Rauter, AP., Branco, I., Bermejo, J., Gonzalez, AG., Garcia-Gravalos, MD., San Feliciano, A., 2001 : Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. *Phytochemistry*. 56, 167-171.
- Reddy, GB., Melkhani, AB., Kalyani, GA., Rao, JV., Shirwaikar, A., Kotian, M., 1991. Chemical and pharmacological investigation of *Limnophila conferta* and *Limnophila heterophylla*. *Int J Pharmacog*. 29, 145-53.
- Reighard, TS., Olesik, SV., 2006. Bridging the Gap between supercritical fluid extraction and liquid extraction techniques : alternative approaches of the extraction of solid and liquid environmental matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 26 (2 et 3), 1-39.
- Ribeiro, M.A., Bernardo-Gil, MG., Esquivel, MM., 2001. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical Fluids*. 21, 51-60.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie*. Paris : Édition Dunod, 254 p.
- Richter, G., 1993. *Métabolites des végétaux, physiologies et biochimie*. Press Polytechnique et Universitaire Romandes. 317-339.
- Rizk, AM., 1982. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*. 52 (2), 35-42.

Roberts, RG., 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. Phytopathology. 80, 526-530.

Roussel, M., Lemarchand, M., Benard M., Dreyfus, J., 2007. La patuline. Fiche technique du service régional de la protection des végétaux de Haute-Normandie.

Rozzi, NL., Phippen, W., Simon, JE., Singh, RK., 2002. Supercritical fluid extraction of essential oil components from Lemon-Scented Botanicals, Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 35, 319-324.

Ruzicka, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia. 9, 357-396.

S

Sajjadi, SE., 2006. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. DARU. 14 (3), 128-130.

Salah-Fatnassi, BK., Salim-Bannour, A., Harzallah-Skhiri, F., Mohamed-Ali, M., Mighri, Z., Chaumont, JP., Aouni, M., 2010. Activités antivirale et antioxydante *in vitro* d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie. Acta Botanica Gallica. 157 (3), 433-444.

Salamci, E., Kordali, S., Kotan, R., Cakir, A., Kaya, Y., 2007. Chemical composition, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. Biochem. Sys. Ecol. 35, 569-581.

Sanderson, PG., 2000. Management of decay around the world and at home. 16th Annual Postharvest Conference, Yakima, WA March 14-15.

San Feliciano, A., Barrero, AF., Medarde, M., Del Corral, JM., Ledesma, E., Sanchez-Ferrando, F., 1982. Humulanolide from *Asteriscus aquaticus*. Tetrahedron Letters. 23, 3097-3100.

San Feliciano, A., Barrero, AF., Medarde, M., Del Corral, JM., Aizpiri, AA., Sanchez-Ferrando, F., 1984. Astericunolides A, B, C and D, the first humulanolides; two pairs of conformationally stable stereoisomers. *Tetrahedron Letters*. 40, 873-878.

San Feliciano, A., Barrero, AF., Medarde, M., Del Corral, JM., Aramburu, A., Perales, A., 1985a. The stereochemistry of asteriscunolides. An X-Ray based correction. *Tetrahedron Letters*. 41, 5711-5717.

San Feliciano, A., Barrero, AF., Medarde, M., Del Corral, JM., Aramburu, A., Perales, A., Fayos, J., 1985b. Asteriscunolide A : sesquiterpene lactone with a new natural skeleton. *Tetrahedron Letters*. 26, 2369-2382.

San Feliciano, A., Medarde, M., del Corral, JM., Aramburu, A., Gordaliza, M., Barrero, AF., 1989. Aquatolide A new type of humulane-related sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Letters*. 30, 2851-2854.

Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, RG., Nishibe, S., Daneshtalab, M., 1999. Synthesis and activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorg. Med. Chem.* 7 (9), 1933-1940.

Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A, Aafi, A., Fougrach, H., Boukhriss , B., Bousta, D., Talbi, M., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus* Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 146, 85-96.

Schwämmle, B., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S., Steiner, W., 2001. Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. *Biotechnol.* 39 (4), 341-345.

Schwinn, FJ., 1982. Socioeconomic impact of fungicide resistance. *In* : Fungicide resistance in crop protection. 16-23. Dekker. J. And Georgopoulos, S.G. (Eds). Pudon.

Seaman, FC., 1982. Sesquiterpenes lactones as taxonomic characters in *Asteraceae*. *In* the Botanical Review. Botanical Garden, New York. 48, 121.

Sefidkon, F., 2001. Essential oil of *Nepeta glomerulosa* Boiss. From Iran. *J. Essent. Oil Res.* 13, 422-423.

Seliger, B., 1997. The effects of coumarins and its metabolites on cell growth and developement. Immunol Today. 93-102.

Sergeeva, V., Nair, NG., Verdanega, JR., Shen, C., Barchia, I., Spooner-Hart, R., 2002. First report of anilinopyrimidine-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* on grapevines in Australia. Australasian Plant Pathology. 31, 299-300.

Sertié, JA., Basile, AC., Panizza, S., Matida, AK., Zelnik, R., 1990. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. Planta Med. 56 (1), 36-40.

Sharma, S., Sangwan, NS., Sangwan, RS., 2003. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. Current Science. 84 (4-25), 544-550.

Sharopov, FS., Sulaimonova, VA., Setzer, WN., 2011. Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Tajikistan. Rec. Nat. Prod. 6 (2), 127-134.

Shiv, SK., Lebreton, P., Bailly, A., 1998. Needle flavonoid variation in coastal Douglas Fir population. Rev Can Bot. 76 (12), 2076-2083.

Sholberg, PL., Conway, W.S., 2004. Post harvest pathology. In Gross, K.C., Wang, C.Y., Saltveit, M., (Eds). Agriculture Handbook n° 66 : The Commercial storage of fruits, vegetables and florist and nursery stocks.

Shukla, HS., Dubey, P., Chaturvedi, RV., 1989. Antiviral properties of essential oils of *Foeniculum vulgare* and *Pimpinella anisum* L. Plant Pathology. Agronomie. 9, 277-279.

Sibirina, S., 2010. Effet inhibiteur in vitro et in vivo de l'extrait de poudre et de l'huile essentielle de *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* f. sp radicis-lycopersici (Forl), champignon parasite des cultures de tomate. European Journal of Scientific Research. 39 (2), 279-288.

Song, JY.; He, XZ., Chen, XF., Hu, JY., Luo, GY., Mo, YZ., 1985. Hypotensive effect of nevadensin. Acta Pharmacol Sin. 6, 99-102.

Sousa, EMBD., Chiavone-Filho, O., Moreno MT., Silva, DN., Marques MOM., Meireles, MAA., 2002. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides*

Cham using pressurized carbon dioxide. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 19 (02), 229-241.

Spadaro, D., Gullino, M.L., 2003. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. Int. J. Food Microbiol. 91, 185-194.

Stokes, S.L., Cole, R.A., Rangelova, M.P., Haber, W.A., Setzer W.N., 2007. Cruzain inhibitory activity of the leaf essential oil from an undescribed species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. Natural Product Communications. 2 (12), 1211-1213.

Sutton, J.C., 1990. Epidemiology and management of *Botrytis* leaf blight of onion and gray mold of strawberry : a comparative analysis. Can. J. Plant Pathology. 12, 100-110.

Svoboda, K.P., Hampson, J.B., 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

Swain, T., 1963. Chemical plant taxonomy, Academic Press, New York. In Ribéreau-Gayon, P et Peynaud, E., 1968.

Swiader, K., Lamer-Zarawska., 1996. Flavonoids of rare *Artemisia* species and their antifungal properties. Fitoterapia. 67, 77-79.

Stevens, J.F., Miranda, C L., Buhler, D.R., Deinzer, M.L. 1998. Chemistry and biology of hop flavonoids. J. Am. Soc. Brew. Chem. 56, 136-145.

Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Legault, J., 2007. Volatile leaf constituents and anticancer activity of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. essential oil. Natural Product Communications. 2 (12), 1273-1276.

T

Tahrouch, S., 2000. Etude des composés phénoliques et des substances volatiles de *Argania Spinosa* (Sapotaceae). Adaptation de l'arganier à son environnement. Thèse de doctorat d'état. Université Ibn Zohr. Agadir 124 p.

Taqarort, N., 2008. Recherche de moyens de lutte contre *Penicillium digitatum*, agent de la pourriture verte des agrumes. Thèse de Docteur en sciences. Faculté des Sciences Agadir. Université Ibn Zohr. Agadir. 136 p.

Tchoumboungang, F., Jazet Dongmo, PM., Sameza, ML., Nkouaya Mbanjo, EG., Tiako Fotso, BR., Amvam Zollo, PH., Menut, C., 2009. Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. Biotechnol. Agron. Soc. 13 (1), 77-84.

Tkachenko KG., 2006. Antiviral activity of the essential oils of some *Heracleum* L. species. Journal of Herbs, Spices. Medicinal plants. 12 (3), 1-12.

Touati, D., 1985. Contribution à la connaissance du profil biochimique des dicotylédones buissonnantes et arbustives de méditerranée. Thèse de Doctorat de troisième cycle. Université Claude Bernard. Lyon I. 155 p.

Tronsmo, A., 1980. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. Plant Dis. 64, 1009.

Tsao, R., Coats, J.R., 1995. Starting from nature to make better insecticides. Chemtech. 25, 23-28.

Tuset, VM., Lozano, IJ., Gonzales, JA., Pertusa, JF., Garzia-Diaz, MM., 2003. Shape indices to identify regional differences in otolith morphology of comber, *Serranus cabrilla* (L., 1758). Journal of Applied Ichthyology. 19, 88-93.

V

Vagi, E., Rapavi, E., 2005. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. J Agric Food Chem. 53, 17-21.

Valnet, J., 2005. L'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. ISBN : 2-253-03564-5.

Velickovic, AS., Ristic, MS., Velickovic, DT., Ilic, S., Mitic, ND., 2003. The possibilities of the application of some species of sage (*Salvia* L.) as auxiliaries in the treatment of some diseases. J.Serb. Chem. Soc. 68 (6), 435-445.

Voirin, B., 1983. UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3', 4') or tri-(3', 4', 5')-substituted rings. *Phytochemistry*. 22 (10), 2107-2145.

W

Wallach, O., 1887. Zur kennriffs der terpene und der atherischen Oele. *Ustus. Liebigs Ann. Chem.* 239, 1-54.

Wang, H., Strasburg, MG., Chang, YC., Brooren, A., Gray, JI., Dewitt, DL., 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Nat. Prod.* 62, 294-296.

Wang, L., Waller, CL., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*. 17, 300-312.

Wender, PA., Lechleiter, JC., 1980. J. Total Synthesis of (+/-) Isabelin. *Amer Chem.Soc.* 102, 6340.

Wedworth, SM., Lych, S., 1995. Dietary flavonoids in atherosclerosis prevention. *Ann. Pharmacother.* 29, 627-628.

Wilson, CL., Solar, JM., El Ghaouth, A., Wisniewski, ME., 1977. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 81 (2), 204-10.

Y

Yang, YZ., Ranz, A., Pan, HZ., Zhang, ZN., Lin, XB., Meshnich, SR., 1992. Daphnetin : a novel antimalarial agent with *in vitro* and *in vivo* activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46 (1), 15-20.

Yu, T., Wang, L., Yin, Y., Wang, Y., Zheng, X., 2008. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 122 (1-2), 29, 44-48.

Z

Zand, RS., Jenkins, DJA., Diamandis, E., 2000. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res. Treat.* 62, 35-49.

Zheng, GQ., Kenney, PM., Lam, LKT., 1992. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J. Nat. Prod.* 55 (7), 999-1003.

Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Mazouz, H., Tomi, P., Paolini, J., Costa, J., 2011. Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Nat Prod Commun.* 6 (11), 1763-8.

F- ANNEXES

I- Réactifs utilisés

* Mayer :

0.5g de l'iodure de potassium
1.36g de bichlorure de mercure
Eau distillée (QSP 100 ml)

* Dragendorff :

0.85g de sous nitrate de bismuth
40 ml d'eau distillée
10 ml d'acide acétique

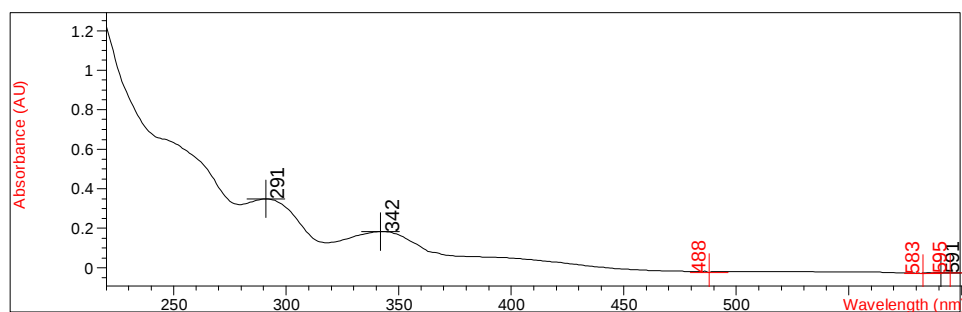
* Iodoplatinate de potassium :

8g d'iodure de potassium
20 ml d'eau distillée

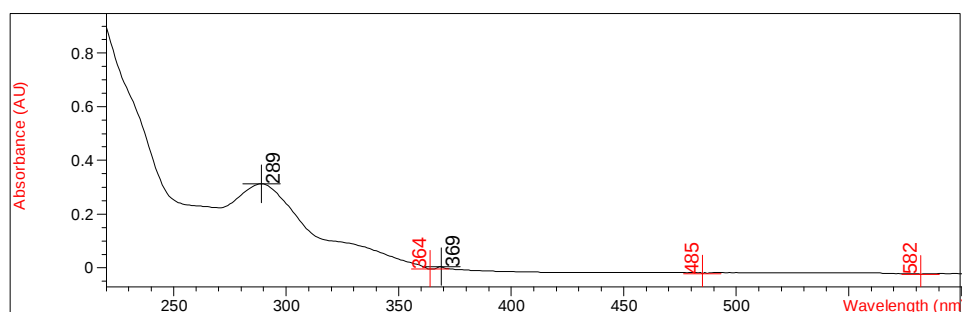
* NEU : 2 aminoéthyl-diphénylborate

95 ml de Diphenylboric éthanolamine
5 ml de méthanol

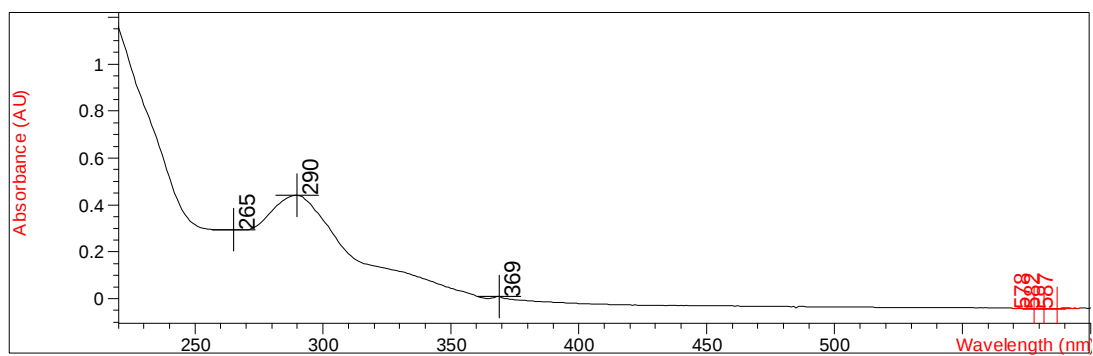
II- Groupe des acides phénols des feuilles d'*Asteriscus imbricatus*



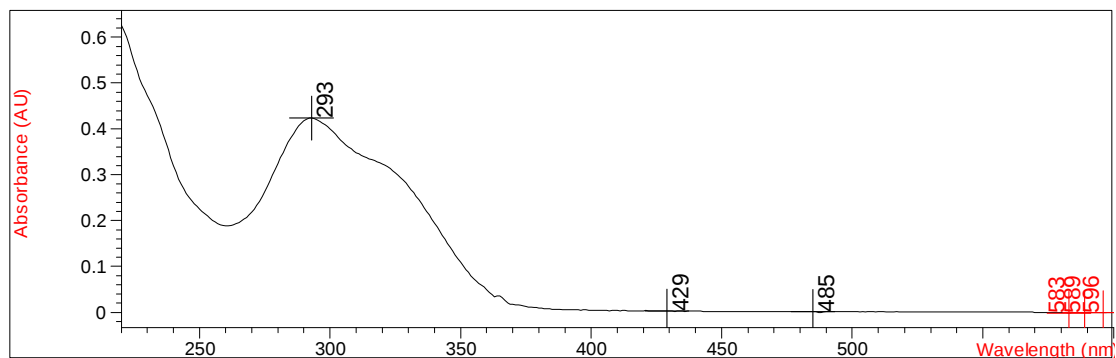
B1 Non identifiée



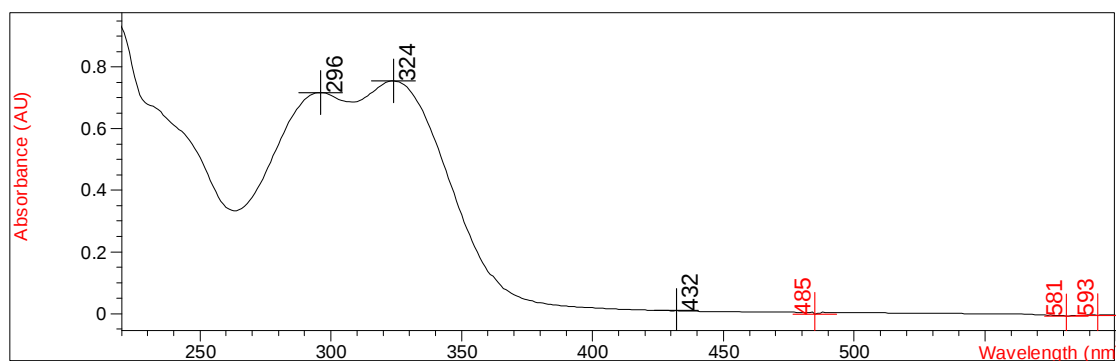
B2 Non identifiée



B3 Non identifiée

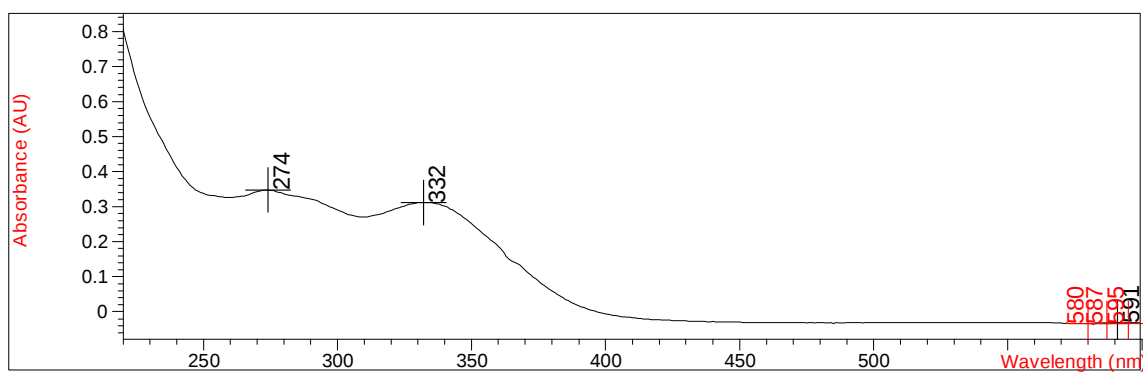


B4 Non identifiée

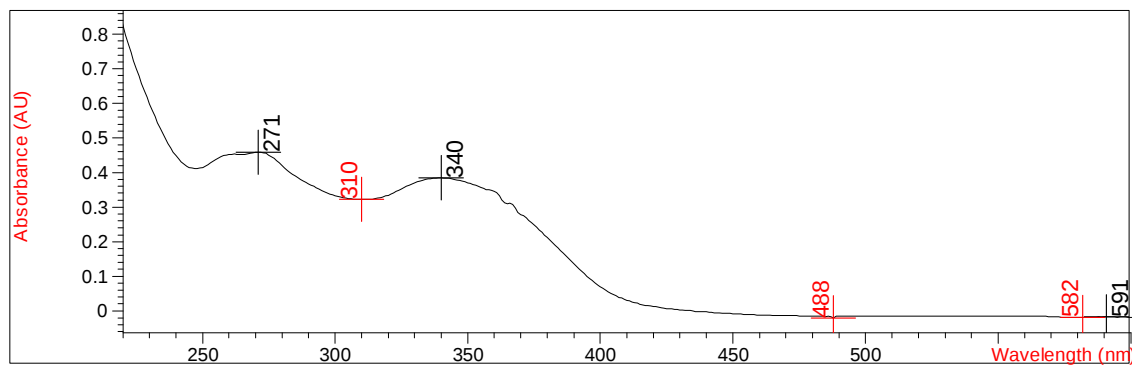


B5 Non identifiée

III- Groupe des aglycones flavoniques des feuilles d'*Asteriscus imbricatus*



B1 Non identifiée



B2 Non identifiée

IV- PDA : Potato Dextrose Agar

Extrait de pomme de terre	4g
D-glucose	20g
Agar bactériologique	15g
Eau distillée	1000ml