

CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE DE DEUX EXTRAITS DE *Brocchia cinerea* Vis. (ASTERACEAE) PAR GC-MS: ACTIVITE ANTI-CLOSTRIDIUM

BOUZIANE Mebarka¹, MAHFOUD HADJ-Mahammed¹, BADJAH-HADJ-AHMED Ahmed Yacine² et OULD-ELHADJ-Mohamed Didi³

⁽¹⁾Laboratoire de Biogéochimie des milieux désertiques
Université de Ouargla, 30000 Ouargla, Algérie

⁽²⁾Department of Chemistry, College of Science, King Saud University
Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia

⁽³⁾Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides,
Université de Ouargla, 30000 Ouargla, Algérie. Email: bmebarka@yahoo.fr

Résumé.- Le présent travail constitue une contribution à l'élucidation de la composition chimique des parties aériennes de la plante *Brocchia cinerea* et à la mise en évidence de ses principes actifs ainsi que son activité anti-Clostridium. Deux extraits sont préparés par deux différentes méthodes d'extraction. L'une d'elles s'est effectuée par Soxhlet en utilisant le chloroforme, et l'autre technique réalisée par hydrodistillation pour l'obtention de l'huile essentielle. L'analyse des extraits par GC-MS a permis l'identification de 54 constituants; la présence des composés terpéniques a été dominante avec un pourcentage de 71%, notamment dans l'huile essentielle tels que: le camphre, la thujone et l'eucalyptol. De même, des acides (exemple de l'acide heptadécanoïque) et des esters gras (hexadécanoate), ont été identifiés. L'activité biologique de l'huile essentielle vis-à-vis de la souche bactérienne *Clostridium perfringens*, par la méthode de diffusion, a montré que cette huile est biologiquement bactériostatique.

Mots clés: *Brocchia cinerea*, huile essentielle, GC-MS, *Clostridium perfringens*, bactériostatique.

PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF TWO EXTRACTS OF *Brocchia cinerea* Vis. (ASTERACEAE) BY GC-MS: ANTI-CLOSTRIDIUM ACTIVITY

Abstract.- This work is a contribution to the chemical composition elucidation of *Brocchia cinerea* aerial parts, and its anti- *Clostridium* activity. Two extracts were prepared by two different methods, the first extract was obtained by Soxhlet using chloroform, and the second one is a crude essential oil obtained by hydro- distillation. Their analysis by GC-MS enabled identification of 54 components, the presence of the terpenes has been dominant, with a percentage of 71 %, particularly in essential oils such as camphor, thujone and eucalyptol. Similarly, fatty acids (heptadecanoic acid) and fatty esters (hexadecanoate) , were identified. Anti-*Clostridium* activity of the essential oil was verified by diffusion method. Essential oil showed bacteriostatic effect against *Clostridium perfringens* bacteria strain.

Key words: *Brocchia cinerea*, essential oils, GC-MS, *Clostridium perfringens*, bacteriostatic.

Introduction

La flore en zones arides, telle que montrée dans la littérature, est très diversifiée en particulier les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui appartiennent à différentes familles botaniques [1-2]. Parmi ces plantes, nous citons la plante spontanée *Brocchia cinerea* qui appartient à l'une des plus vastes familles dans le règne végétal: les Asteraceae [1-4]. Ses applications variées en médecine traditionnelle et les effets thérapeutiques qu'elle présente l'ont rendue très populaire dans les régions sahariennes Algériennes, entre autres la région de

Ouargla [3-5]. Dans cette région, *Brocchia cinerea* est préconisée, entre autres, dans le traitement des maladies broncho-pulmonaires, la diarrhée, etc. En outre, elle est utilisée dans l'aromatisation du lait et du thé [2].

Plusieurs autres activités biologiques sont attribuées aux extraits obtenus de la plante telle que celle collectée au Maroc où les activités: anti-inflammatoire, antiseptique, analgésique, anti-bactérienne et fébrifuge ont été signalées [6-9]. *Clostridium perfringens* Veillon et Zuber. (Clostrideaceae) [10] sont des bactéries anaérobiques strictes et sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux, mais on les rencontre fréquemment dans la nature en particulier dans le sol (bactéries telluriques)) et dans les matières organiques en cours de putréfaction. Ce germe est très souvent responsable de toxi-infections d'origine alimentaire après une mauvaise manutention/gestion d'un aliment après cuisson. Ces germes sont très résistants en raison de leur caractère sporulé. Ils sont souvent, quelquefois avec d'autres germes sporulés, les seuls survivants d'une contamination ancienne de l'aliment [11].

Dans ce travail nous présentons une étude analytique par GC-MS de deux extraits obtenus des parties aériennes de cette plante afin de caractériser sa composition chimique volatile, ainsi qu'une pré-évaluation de l'activité anti-Clostridium de son huile essentielle.

1.- Matériel et méthodes

1.1.- Collecte du matériel végétal

La plante *Brocchia cinerea* est récoltée en stade de floraison, à 10 km au Nord-Est de la localité de Ouargla (Algérie). Après son séchage à l'ombre dans un endroit aéré, les parties aériennes de la plante sont broyées à l'aide d'un broyeur mécanique (diamètre du tamis: 4mm), la poudre végétale ainsi obtenue a servi pour l'extraction par Soxhlet [12] et par hydrodistillation.

1.2.- Méthodes d'extraction

1.2.1.-Hydrodistillation

Cent grammes (100g) de la poudre végétale ainsi préparée, sont soumis à une hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger pendant 3h [13], pour obtenir de l'huile essentielle brute (HE). L'huile essentielle obtenue a été séchée sur sulfate de Sodium, pour éliminer toutes traces d'eau résiduelles dans l'huile après sa séparation de la phase aqueuse. HE a été conservée dans un flacon brun hermétiquement fermé à 4°C jusqu'à son utilisation.

1.2.2.-Extraction au Soxhlet

Vingt cinq grammes (25g) de la poudre issue des parties aériennes de la plante sont extraits au Soxhlet en utilisant 250 ml de chloroforme (CH_3Cl : $T_{\text{eb}} = 61.2^\circ\text{C}$). Après l'évaporation totale du solvant, 130 ml d'eau chaude sont ajoutés au résidu sec. Cette dernière solution, laissée au réfrigérateur durant une nuit, a subi une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (25ml x 4). La phase organique a été évaporée à sec et le résidu a été repris par 5ml de MeOH. L'extrait final (A) a été conservé dans un flacon hermétiquement fermé à 4°C jusqu'à son analyse [12].

Le protocole entrepris pour cette extraction est résumé sur la figure (1).

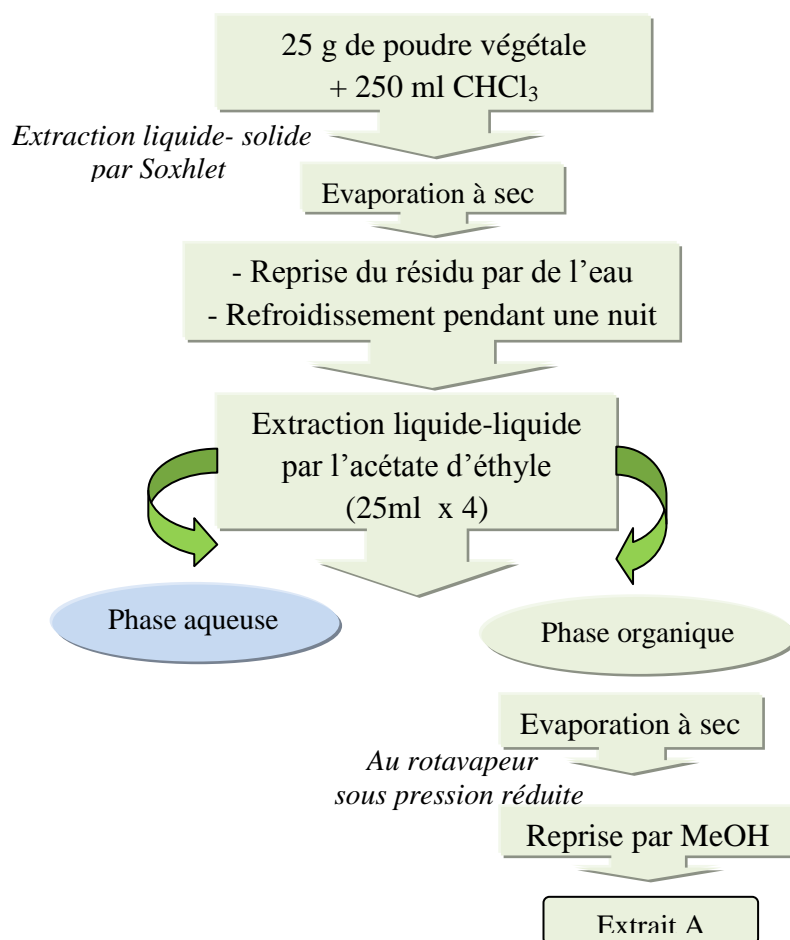


Figure 1.- Protocole d'extraction par Soxhlet [12]

1.3.- Analyse chromatographique GC-MS

L'huile essentielle (HE) a été analysée par un chromatographe en phase gazeuse de type Agilent HP6890 GC-MS, sur une colonne capillaire apolaire type: DB5 (30m x 0.25 mm, 0.25 μ m), sous les conditions chromatographiques suivantes:

- débit du gaz vecteur (He): 0.5 ml. min⁻¹,
- température de l'injecteur et du détecteur: 250 °C,
- Le gradient de température a débuté par 45°C pendant 8 min, suivi d'une élévation à 2°C/min jusqu'à 250°C et enfin, cette température a été maintenue pendant 14 min.

L'extrait A, a été analysé sous les conditions chromatographiques suivantes:

- un chromatographe de type GC 800Top muni d'une colonne capillaire apolaire ECTM-1 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m),
- un spectromètre de masse de type Finnigan MAT, Automass II,
- température de l'interface: 279°C,
- température de l'injecteur : 260°C,
- gradient de température: 100 °C pendant 5 min, 8 °C/min et enfin 260 °C pendant 20 min,
- débit du gaz vecteur: 40 ml.min⁻¹.

Dans les deux cas l'énergie de l'impact électronique a été 70 eV sur l'intervalle m/z: 29-550. L'identification des substances séparées s'est faite par deux méthodes:

- le calcul des indices de rétention selon l'équation de Van Den Dool en utilisant les temps de rétention de la série des n-alcanes injectés (C₅-C₃₀) sous les mêmes conditions de chaque échantillon, et leur confrontation avec ceux de la littérature [14-24];

$$I_K = 100 \times [(t_{R_s} - t_{R_Z}) / (t_{R_{(Z+1)}} - t_{R_Z})] + 100 \times Z \quad \text{équation de Van Den Dool}$$

où t_{R_s} , t_{R_Z} , $t_{R_{(Z+1)}}$ sont respectivement les temps de rétention du soluté et des alcanes à Z et (Z+1) atomes de carbones encadrant le soluté.

- par comparaison de leurs spectres de masse obtenus par GC-MS avec ceux fournis par les bibliothèques Wiley, NIST et la bibliothèque de CNRS Lyon-France.

1.4.- Analyses microbiologiques

1. 4. 1.- Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur la gélose

Plusieurs travaux antérieurs ont révélé que *Brocchia cinerea* possède un potentiel biologique très intéressant [6-9]. Il s'agit de tester l'effet de l'huile essentielle de la plante sur *Clostridium perfringens*.

La méthode utilisée permet d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (HE). Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs, en indiquant l'existence ou l'absence d'une action biologique.

La technique utilisée est une modification de la méthode citée dans la littérature [22]. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé dans l'huile essentielle, sur la culture bactérienne au tout début de sa croissance et de mesurer la surface où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre de la zone d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé [23;24].

Dans ce présent travail l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Brocchia cinerea* a été testée sur *Clostridium perfringens* IP 104880 de l'institut Pasteur de Lyon (France).

L'activité anti microbienne a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion agar-well. L'huile essentielle a été utilisée pure (SM: solution mère) avec des dilutions préparées dans le mélange DMSO/EtOH (v/v) à savoir: SM/10, SM/100, SM/1000, SM/10000. L'inoculum de bactéries, préparé à partir de la souche bactérienne *Clostridium perfringens* IP 104880 de l'institut Pasteur de Lyon (France), a été étalée sur la surface du milieu Hinton Muller agar, dans des jars totalement anaérobioses, par la suite des disques celluloseux stériles imprégnés pendant 30 min dans les différentes dilutions de l'huile essentielle, sont ensemencés. L'incubation des jars traitées à 37°C durant 72 heures.

L'activité antibactérienne est évaluée par observation et mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques après 24h, 48h et 72h.

2.- Résultats et discussions

Les analyses par GC-MS, en programmation de température, des deux extraits (par soxhlet (A) et l'huile essentielle (HE) obtenus à partir des parties aériennes de *Brocchia cinerea* ont fourni les chromatogrammes illustrés respectivement par les figures 2 et 3. Ces analyses révèlent le nombre important de produits contenus dans les deux extraits, bien que la

composition de HE est la plus riche. Ceci est dû aux méthodes d'extraction, à la nature et à la sélectivité des solvants organiques utilisés [12]. Le Soxhlet s'est révélé efficace dans l'entraînement d'un nombre important de constituants volatils lorsque des solvants tels que le CHCl_3 et l'acétate d'éthyle (AcOEt) sont utilisés. Cependant l'hydrodistillation reste la méthode la plus fiable pour l'entraînement de la majorité des substances terpéniques contenues dans le matériel végétal, ce qui est clairement exprimé, sur la figure 4, par les pourcentages des différentes classes terpéniques.

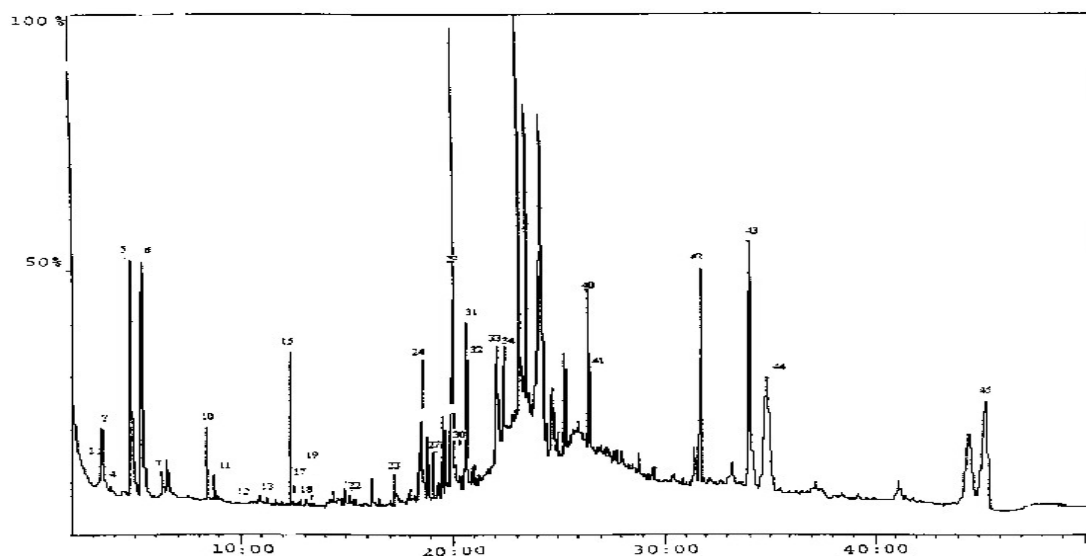


Figure 2.- Chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'extrait par Soxhlet

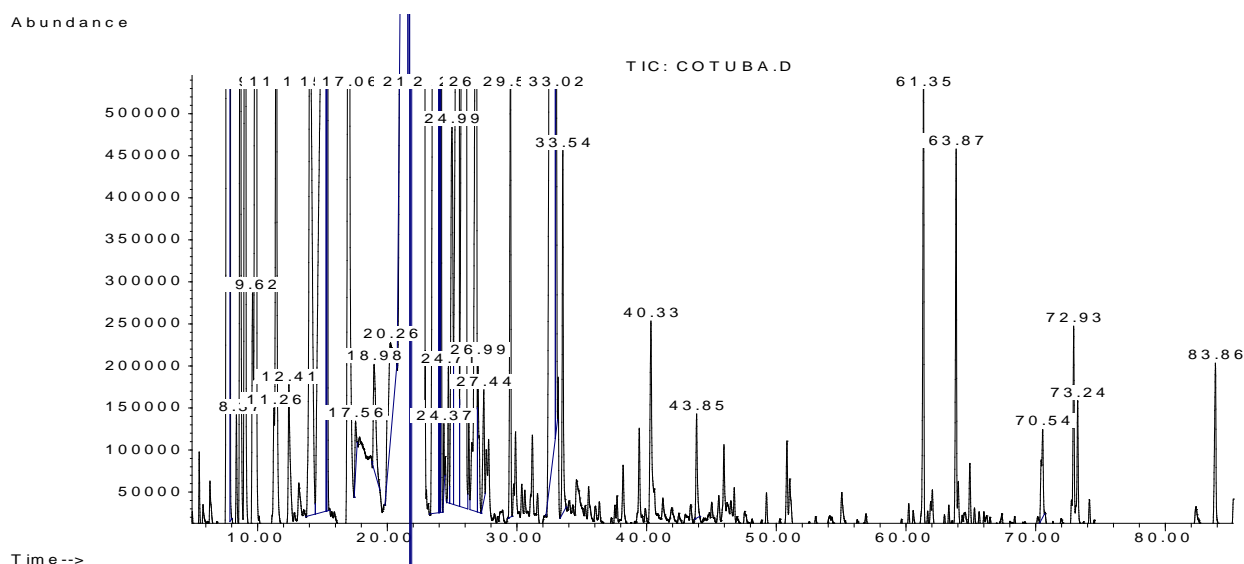


Figure 3.- Chromatogramme obtenu par GC-MS pour l'huile essentielle.

Après le calcul des indices de rétention et dépouillement des spectres de masse obtenus, les identifications des substances éluées sont regroupées dans les tableaux I et II dont les temps de rétention et/ou les indices de rétention, les données spectrales sont reportés et confrontés à ceux de la littérature.

Tableau I.- Résultats d'analyse par GC-MS de l'extrait par Soxhlet
[tr (min): temps de rétention, MS(exp): spectre de masse expérimental,
MS (ref): spectre de masse référentiel, Nist (ref): N° de référence Nist]

Composés identifiés	Tr (min)	MS (exp)	MS (ref)	Nist (ref)
α -thujone	4:45	110(100), 81(75), 95(66), 109(53), 67(40), 68(39), 69(38), 55(24), 152(5)	110(100), 81(88), 95(70), 67(68), 68(58), 69(53), 109(43), 55(32), 70(25)	776014
Camphre	5:17	95(100), 81(75), 95(66), 109(53), 67(40), 68(39), 69(38), 55(24), 152(5).	95(100), 81(88), 108(39), 69(39), 55(38), 27(35), 83(33), 109(28)	151971
4-carvomenthenol	6:13	71(100), 111(75), 93(70), 86(25), 91(25), 55(20)	71(100), 93(51), 111(49), 55(27), 86(25), 69(23), 67(18)	157898
1,3,8-para-menthatriène	8:21	119(100), 91(45), 93(35), 79(26), 105(25), 77(20), 134(15), 121(15)	119(100), 91(74), 134(66), 105(21), 77(21), 92(17), 79(16), 93(16)	
Bornyl acetate	8:41	95(100), 93(45), 121(44), 136(30), 108(15), 80(11), 69(9), 55(9), 154(5).	95(100), 93(45), 136(39), 121(34), 80(17), 55(15), 108(134), 69(131).	249545
Dodéc-6-yn-5-one.	10:55	109(100), 124(95), 95(71), 71(39), 81(34), 55(29), 132(30), 117(9), 143(8)	109(100), 124(91), 53(62), 55(42), 81(40)	267000
Isocaryophyllène.	11:43	93(100)133(86), 109(62), 79(55), 91(50), 120(44), 105(44), 95(40), 81(40), 67 (37), 148(20), 161(20), 119 (32)	93(100), 69(76), 133(67), 161(56), 79(53), 105(47), 81(41), 107(38)	140072
1-Méthyl-4-(5-méthyl-1-méthylène-4-hexenyl) cyclohexène	12:20	69(100), 93(81), 133(31), 120(26), 79(25), 91(25), 81(24), 67(21), 55(16), 107 (15), 161(9), 204(2), 148(2)	69(100), 93(69), 94(27), 67(26), 204(25), 109(24), 79(24), 107(18), 161(17).	9219
Cadina -1,4-diène	12:49	119(100), 57(50), 105(30), 91(30), 79(15), 161(15), 134(14), 77(14), 85(30)	119(100), 105(68), 161 (51), 204(26), 91(22), 121 (22),91(22),120(19), 92 (18)	9229
Dihydroactinolide	13:06	111(100), 137(29), 67(16), 124(10), 95(9), 81(8), 152(5)	111(100), 109(43), 137 (39), 67(30), 110(21), 59(7)	7400
(2E,6E)Acétate de Farnésyl.	13:25	69(100), 93(32), 121(21), 81(21), 107(16), 55(14), 136(11), 163(9), 145(5)	69(100), 81(30), 93(29), 136(26), 68(26), 67(11), 107(11), 121(10)	164111
Citrate d'éthyle.	15:23	157(100), 115(72), 111(16), 129(14), 203(14), 87(11), 139(5)	157(100), 115(47), 203(28), 111(12), 158(11), 87(10), 129(9)	189977

Acide Tétradécanoïque.	17:14	73(100), 60(78), 129(63), 57(60), 55(55), 71(35), 69(34), 83(30), 85(27), 97(26), 87(25), 115(20), 185(18), 228(16), 143(13), 171(6), 199, 157(3)	73(100), 60(92), 55(75), 57(65), 129(38), 69(34), 71(33).	113060
Acide 2,5-Octadéca-2,5-diynoate de méthyle.	19:14	91(100), 105(60), 131(50), 117(49), 79(45), 77(44), 145(25), 159(24), 202(10), 188(9), 230(9), 215(5), 173(6)	91(100), 105(71), 117(61), 79(47), 77(45), 55(43), 67(37), 131(35).	35988
2-hydroxy-3-(1-propenyl) Naphthalen-1,4-dione	19:28	214(100), 115(76), 156(62), 129(50), 102(50), 76(44), 185(31), 87(25), 143(24), 55(24), 171(21), 199(6), 50(25).	214(100), 199(58), 76(57), 171(50), 115(50), 77(46), 158(42), 50(42), 51(41).	9971
Acide Heptadécanoïque.	19:58	73(100), 60(74), 55(54), 129(54), 85(35), 97(34), 115(24), 256(23), 213(14), 157(11), 71(9).	73(100), 60(78), 57(60), 55(46), 69(35), 71(35), 129(33), 83(25).	73673
Hexadécanoate d'éthyle.	20:22	88(100), 119(95), 101(75), 55(65), 73(52), 113(26), 185(20), 157(19), 133(19), 145(14), 207(14), 256(14), 171(7), 227(5), 241(6)	88(100), 101(70), 55(50), 57(40), 69(23), 73(22), 71(19), 70(15)	43659
2-methyl, 6-(p-tolyl) hept-2-énol.	20:33	119(100), 132(76), 145(39), 105(36), 95(20), 55(11), 81(10), 157(4), 199(4)	119(100), 132(62), 105(36), 91(35), 93(23), 120(19), 121(18), 117(17)	141052
(4E)2,2,6-triméthyl-1-(2-méthyl-2-cyclobuten-1-yl) hepta -4,6-dièn-3-one	20:57	95(100), 81(90), 93(66), 67(47), 107(44), 119(43), 123(42), 55(34), 134(20), 135(10), 161(12), 187(9), 201(2)	95(100), 81(85), 123(66), 67(64), 119(58), 105(38), 91(37), 93(36)	188728
Acide octadéca-9-ynoate de méthyle.	21:59	81(100), 67(96), 95(85), 82(70), 96(64), 55(60), 79(46), 109(44), 111(34), 123(19), 150(15), 280(10), 136(9)	81(100), 67(95), 55(86), 68(74), 95(70), 82(67), 54(60), 69(47)	36329
Tétracosane	26:26	57(100), 71(85), 85(75), 99(31), 113(20), 127(10), 141(5), 155(2)	57(100), 71(80), 85(72), 43(62), 99(26), 41(25), 55(22), 113(20), 127(14), 69(14)	195773
E,E,E,E,E-2,6,10,15,19,23-hexaméthyl tétracosane-1,6,10,14,18,22-hexaen-	31:44	69(100), 81(69), 95(24), 121(16), 109(14), 136(14), 149(5)	69(100), 81(62), 93(39), 107(27), 55(23), 68(19), 135(18), 67(18)	162138

3- ol				
2,6,10,14,18-pentaméthyl- Eicosane	33:57	57(100), 71(85), 85(80), 99(35), 113(22), 218(10), 141(6), 169, 203, 239(1)	57(100), 71(81), 85(51), 113(26), 127(25), 99(23), 56(18), 55(17), 70(17), 183(17)	5179416 2
β -Amyrin	34:15	218(100), 203(44), 95(30), 69(26), 107(25), 119(25), 135(20), 189(20), 147(10), 175(7)	218(100), 203(26), 219(18), 189(10), 95(9), 69(8), 109(8), 135(7), 81(6), 207(6)	63149

La présence des substances terpéniques est remarquable, ce qui reflète la forte odeur aromatique (camphrée) dégagée par le matériel végétal.

Tableau II.- Résultats d'analyse de l'huile essentielle par GC-MS
[Ir (exp): indice de rétention expérimental, MS (exp): spectre de masse expérimental, MS (ref): spectre de masse référentiel]

Composés identifiés	Ir (exp)	SM (exp)	SM (ref)
Hexanal	800	44(100), 56(79), 41(60), 43(55), 29(35), 27(33), 72(15)	44(100), 56(82), 41(66), 43(53), 29(38), 27(33), 72(19)
Cis-Salvène	837	41(100), 67(98), 81(96), 68(80), 69(60), 55(50), 39(45), 109(40)	41(100), 67(72), 81(64), 55(38), 109(22), 95(10), 124(1)
Isoamyl acétate	864	43(100), 70(45), 55(42), 41(20), 42(18), 32(12), 61(10)	43(100), 55(43), 73(38), 41(37), 42(33), 61(27)
Santolinatrienne	907	93(100), 121(80), 79(70), 91(50), 77(47), 67(40), 105(32), 41(25)	93(100), 41(72), 79(70), 121(55), 77(51), 67(49), 53(34)
Tricyclène	916	93(100), 79(32), 91(30), 79(32), 92(30), 77(30), 41(29), 121(25), 136(20), 39(20)	93(100), 91(31), 92(27), 79(25), 41(24), 39(22), 77(22), 121(20).
α -thujène	921	93(100), 91(60), 77(47), 92(43), 79(15), 136(15), 41(10)	93(100), 77(23), 91(21), 92(20), 41(15), 39(14), 79(10), 121(5)
α - Pinène	928	93(100), 91(35), 92(32), 77(29), 79(25), 121(19), 41(15), 39(10)	93(100), 92(35), 91(32), 77(29), 79(23), 41(20), 39(19), 121(14)
Camphène	942	93(100), 121(75), 79(40), 91(37), 67(35), 107(32), 77(30), 41(20)39(18), 136(15)	93(100), 121(58), 79(40), 91(37), 39(34), 41(32), 67(29), 77(28)
4-méthylène-1-(1-méthylethyl) bicyclo[3,1,0] hexane.	965	93(100), 77(50), 91(50), 41(40), 57(39), 79(40), 39(30), 136(15)	93(100), 41(61), 69(35), 39(32), 91(31), 77(28), 79(27), 27(21)
β -Pinène	968	93(100), 69(40), 41(39), 79(37), 77(36), 91(36),	93(100), 41(61), 69(35), 39(32), 91(31), 77(28),

		121(18), 136(15)	79(27), 27(21)
α - Phellandrène	998	93(100), 91(60), 77(55), 92(40), 136(30), 41(25), 32(22), 39(20), 57(18), 79(18), 85(15)	93(100), 91(33), 77(31), 91(25), 136(16), 41(14), 39(11), 27(10)
Eucalyptol	1027	43(100), 81(98), 108(90) 154(85), 111(80), 139(75), 71(70), 84(68), 93(65), 55(50)	43(100), 93(55), 81(55), 71(47), 69(40), 84(38), 68(38), 108(36)
γ -terpinène	1053	93(100), 91(50), 77(35), 136(35), 121(30), 43(20), 39(10)	93(100), 91(33), 77(32), 136(29), 121(27), 39(23), 43(23), 27(23)
α -Thujone	1115	110(100), 81(95), 95(80), 67(60), 69(57), 68(55), 109(55), 41(48)	110 (100), 81(88), 95(70), 67(68), 68(58), 41(58), 69(53), 109(43)
8-méthylène-3-oxatricyclo[5,2,0,0(2,4)]nonane	1136	79(100), 91(95), 96(75), 77(73), 39(55), 109(55), 81(50), 41(50), 69(53), 93(45)	79(100), 92(83), 39(69), 91(62), 77(57), 41(50), 27(47), 93(41)
Camphre	1150	95(100), 81(82), 108(45), 69(40), 152(42), 55(35), 41(38)	95(100), 41(73), 81(74), 108(39), 69(39), 55(38), 27(35), 39(34)
Borneol	1166	95(100), 41(20), 110(22), 55(12), 67(11), 139(10), 121(8), 93(9)	95(100), 41(18), 110(16), 93(12), 55(11), 67(10), 139(10), 121(9)
α -Thujénal	1186	79(100), 77(40), 107(35) 105(30), 108(18), 91(17) 106(17), 41(15), 43(14)	79(100), 107(51), 77(33), 105(29), 108(29), 106(28) 41(17), 43(16)
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1189	43(100), 135(85), 91(27), 67(20), 39(15), 41(17), 79(18), 55(12), 82(9), 105(7)	43(100), 135(52), 91(21), 39(9),
<i>p</i> -menth-1-en-8-ol	1194	59(100), 93(60), 121(49) 136(45), 81(33), 43(31), 67(20)	59(10), 93(60), 121(49), 136(45), 81(33), 43(31), 67(16) , 92(17)
Trans-Piperitol	1207	84(100), 83(40), 41(35), 139(32), 55(25), 91(20), 79(20), 67(15)	84(100), 41(27), 83(27), 136(26), 93(25), 43(22), 55(20), 77(18), 69(17), 67(8)
Cis-3-hexenylisovalerate	1232	82(100), 67(99), 57(98), 41(35), 85(32), 55(20), 54(9)	82(100), 67(77), 57(73), 85(55), 41(48), 55(27), 43(22), 29(22)
Lyratyl acétate	1280	119(100), 43(67), 91(50), 93(47), 79(45), 77(38), 105(35), 134(22)	119(100), 43(67), 134(47), 93(42), 91(41), 79(34), 105(26), 77(22)
Bornyl acétate	1281	95(100), 43(58),	95(100), 43(76), 93(45),

		93(48), 121(45), 136(40), 41(20), 80(18), 55(18)	136(39), 121(34), 41(27), 80(17), 55(15)
Lavandulyl acétate	1289	69(100), 43(85), 93(75), 41(65), 68(45), 91(25), 121(23), 67(20), 136(10)	69(100), 43(74), 93(73), 41(50), 68(46), 121(24), 67(20), 136(12)
Carvacrol	1296	135(100), 150(35), 91(38), 43(48), 32(45), 79(28), 77(25), 107(19), 115(18), 136(10)	135(100), 150(31), 91(13), 136(10), 77(7), 107(7), 117(6), 115(5)
Neryl acétate	1359	69(100), 43(67), 41(65), 3(45), 68(40), 67(27), 121(25), 80(19)	69(100), 41(67), 43(45), 68(37), 93(35), 67(18), 80(13), 121(11)
Geranyl acétate	1379	69(100), 43(65), 41(62), 68(45), 93(24), 121(18), 138(14), 67(20)	69(100), 43(65), 41(63), 68(49), 93(24), 136(22), 121(14), 67(13)
Cis jasmone	1392	79(100), 91(75), 110(75), 164(68), 55(65), 149(62), 41(61), 93(60), 77(60), 122(58), 135(58)	79(100), 91(98), 39(97), 77(64), 164(60), 91(58), 93(54), 53(50), 55(49), 110(45), 149(42), 135(40), 122(40)
Spathulenol	1566	43(100), 41(63), 91(62), 119(57), 205(50), 93(48), 105(48), 159(38)	43(100), 41(63), 205(61), 119(57), 91(50), 93(48), 159(43), 105(40)
Caryophyllène oxide	1570	43(100), 41(97), 79(82), 93(70), 91(54), 69(45), 55(42), 09(35), 121(25), 135(10)	43(100), 41(97), 79(82), 93(70), 91(54), 69(45), 55(42), 109(35), 121(25), 135(10)
Methyljasmonate	1643	83(100), 41(58), 151(40), 67(40), 95(40), 55(43), 93(35), 109(38)	83(100), 41(53), 151(46), 67(33), 95(32), 55(29), 93(28), 109(28)

Les monoterpènes notamment les oxygénés sont les prédominants en présence et en quantités avant les 30 min comme il est illustré sur les deux chromatogrammes (fig. 2 et 3), ce qui est aussi confirmé par leurs pourcentages de présence dans la composition chimique figurants sur l'histogramme (fig. 4) pour chaque extrait soit: 21% dans A et 42% dans HE. En plus des monoterpènes oxygénés, dont certains ont déjà été cités dans la littérature [25] tels que: le camphre, l'eucalyptol et la thujone (principes actifs très utilisés en thérapie [26]). Il est noté la présence d'hydrocarbures monoterpéniques avec un pourcentage de 30% dans HE et seulement 3.5% dans l'extrait A. Ce faible pourcentage dans l'extrait A revient probablement aux conditions d'extraction par le Soxhlet où les petites molécules peuvent s'échapper du montage ce qui influe sur leur rendement ou bien la non-conformité de la polarité des solvants utilisés et/ou le gradient de température sous lequel l'extrait A est analysé par GC-MS (température initiale élevée soit 100°C pendant 5min).

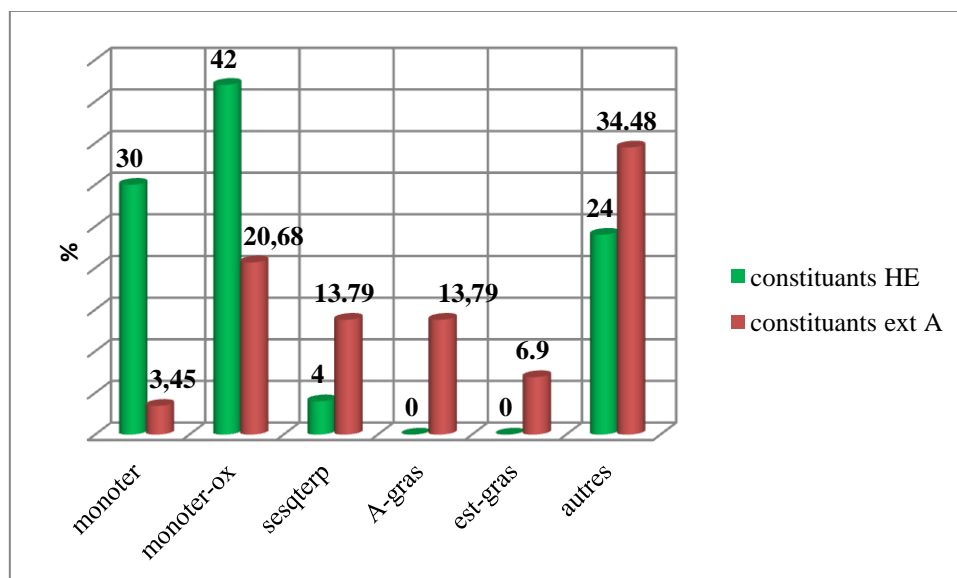


Figure 4.- Histogramme des familles chimiques présentes dans l'huile essentielle (HE) et l'extrait par Soxhlet (A) (Monoterp: hydrocarbures monoterpéniques, Monote-ox: monoterpènes oxygénés, sesquiterp: sesquiterpènes, A-gras: acides gras, est-gras: ester gras, autres: autres composés)

Les sesquiterpènes contribuent par environ 4% dans HE et à un taux plus important dans l'extrait A qui est de 14%. D'autres composés sont identifiés dans HE mais n'ont pu être caractérisés dans l'extrait A et inversement. Parmi ceux-ci, il faut noter pour l'extrait A, des esters gras $C_{17}H_{28}O_2$, $C_{18}H_{36}O_2$, $C_{19}H_{30}O_2$, $C_{19}H_{34}O_2$, une lactone $C_{11}H_{16}O_2$, le citrate d'éthyle et des acides gras $C_{14}H_{28}O_2$ et $C_{17}H_{34}O_2$. La figure 4 signale les taux significatifs des constituants qui n'ont pas pu être identifiés (24% dans HE et 34.48% dans l'extrait A).

La figure 5 représente les chemins de fragmentation proposés pour le camphre et la thujone respectivement.

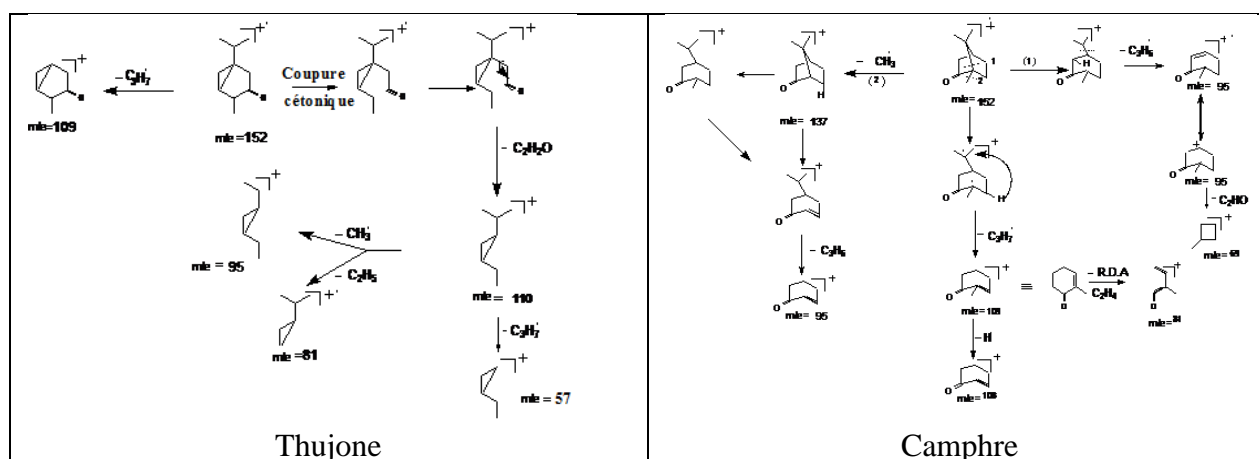


Figure 5.- Schémas de fragmentations proposés pour les deux molécules majoritaires de l'huile essentielle: le camphre et la thujone, analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) en mode impact électronique

En ce qui concerne l'évaluation de l'action biologique de l'huile essentielle vis-à-vis de *C. perfringens*, réalisée dans ce travail, l'observation de la zone d'inhibition autour des disques après 24 h, 48 h et 72 h, n'a montré aucun changement.

Les résultats ainsi obtenus figurant sur la photo 1 ont montré que l'huile essentielle est sans aucun effet bactéricide en milieu solide, l'action bactériostatique [27] de l'huile essentielle pure et quelques unes de ses dilutions se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques où il apparait un arrêt de l'augmentation de la population [27]. En effet, le diamètre de cette zone autour du disque saturé par l'huile pure SM a été 40mm et 30mm autour du disque imbibé par SM/10 avec une absence d'activité pour les deux dernières dilutions SM/100 et SM/1000.

La résistance de la souche de *C. perfringens* à l'huile testée est attendue puisque cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides (les terpènes contenus dans l'huile) qui est en relation avec la nature de sa membrane externe (Gram +) [10,28]

Les huiles essentielles disposent d'une variété d'activités biologiques (antibactérienne, antiseptiques,..) et cela revient à leur richesse en composés terpéniques porteurs de divers groupes fonctionnels (alcools, carbonyles,...) et à leurs effets synergiques entre eux [29,30].

L'activité de ces molécules est liée, à la fois, au caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et au caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées [26,31,32] à titre d'exemple les composés carbonylés tels que la thujone, le camphre et l'eucalyptol sont décrits comme très actifs vis-à-vis d'un large spectre de microorganismes dont *C. perfringens* fait partie [26; 31;32]. Des fractions très riches de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L, dont les composés majoritaires sont α -pinene, 1,8-cineole, camphre et borneol (présents aussi dans l'huile essentielle de *Brocchia cinerea*) et verbenone, ont été cités biologiquement actifs contre une variété de microorganismes, bactéries (Gram+ et Gram-), avec une activité plus notable pour celles qui sont plus riches en camphre, borneol, et verbenone [33].

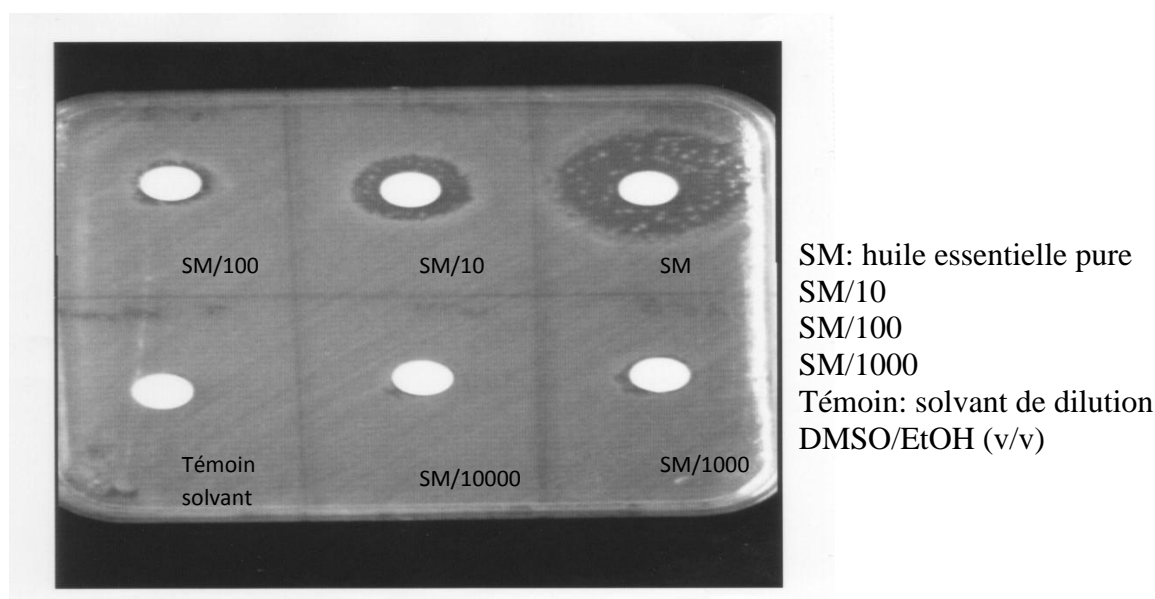


Photo 1.- Représentation de l'activité anti-Clostridium de l'huile essentielle de *Brocchia cinerea* Vis

Conclusion

Le présent travail a permis de mettre en évidence la composition chimique de la constitution volatile de la plante *Brocchia cinerea* Vis. par des analyses GC-MS de deux extraits obtenus de cette plante à savoir l'huile essentielle et l'extrait par Soxhlet. Les composés terpéniques, ont montré une présence notable dans cette composition. Certains constituants ont été confirmés dans les deux extraits obtenus par Soxhlet et par hydrodistillation tels que: α - thujone, Camphre, 1,3,8-para-menthatriène et Bornyl acétate. Notons aussi la caractérisation d'autres composés tels que l'hexadecanoate d'éthyle et l'acide heptadecanoïque.

L'huile essentielle de *Brocchia cinerea* Vis. a montré un effet bactériostatique sur *Clostridium perfringens* avec un diamètre de zone d'inhibition égale à 4cm.

Références bibliographiques

- [1].- Ozenda P., 1993.- Flore et végétation du Sahara. Ed. CNRS, Paris, 162 p.
- [2].- Maiza K., Brac De La Perrière R.A., Hammiche V., 1993.- Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. 2th European Ethnopharmacology Colloquium and 11th International Ethnomedicine Conference, Heidelberg, Germany: 169-171.
- [3].- Ould El Hadj M.D., Hadj Mahammed M., Zabeirou H., 2001- Inventaire et recherche de l'usage des plantes spontanées médicinales de la pharmacopée traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional Est algérien), Annales de l'Institut National Agronomique El Harrach, vol. 22, N°1-2: 97-123.
- [4].- Chehma A., 2006.- Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Ed. Dar El Houda, Algérie, 158 p.
- [5].- Hammiche V. et Maiza K., 2006.- Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. Ethnopharmacology, 105 (3): 358-367.
- [6].- Larhsini M., Markouk M., Jaouhari J.T., Bekkouche K., Lazrek H.B., Jana M., 2002.- Phytotherapy Res., 16 (Suppl 1), 97-98.
- [7].- Markouk M., Radwane A., Lazrek H.B., Jana M., Benjama A., 1999.- Fitoterapia, 70: 314-316.
- [8].- Markouk M., Lazrek H.B., Larhsini M., Bekkouche K., Jana M., 1999-. Therapie, 54 (6): 759-761.
- [9].- Markouk M., Lazrek H.B., Jana M., 1999- Phytotherapie. Res, 13: 229-230.
- [10].- http://fr.wikipedia.org/wiki/Clostridium_perfringens.
- [11].- Cuq J-L., 2007.- Contrôle microbiologique des aliments, Manuel technique. Polytech Département STIA, Univ Montpellier II, 52 p.

- [12].- Bouziane M., 2002.- Caractérisation de la composition chimique de la plante *Cotula cinerea* de la région de Ouargla. Mémoire de Magister, univ de Ouargla, 152 p.
- [13].- Zaim A., El Ghadraoui L., Farah A., 2012.- Effets des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* sur la survie des criquets adultes d'*Euchorthippus albolineatus* (Lucas, 1849). Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie, 34 (2), 127-133.
- [14].- Javidinia K., Miri R., Kamalinejad M., Jamalian A., 2004.- Chemical composition of the essential oils of *Anthemis altissima* L. grown in Iran. J Flavour and Frag, 19: 213-216.
- [15].- Yu H.H., Kim Y.H., Kil B.S., Kim K.J., Jeong S.I., You Y.O., 2003.- Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Artemisia iwayomogi*. Planta Med, 69 (12):1159-62.
- [16].- Sahin F., Gulluce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G., Ozer H., 2004.- Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control, 15: 549-557.
- [17].- Shang C., Hu Y., Deng C. Hu K., 2002.- Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction. J. Chromatogr A, 942: 283-288.
- [18].- Goodner. K.L., 2008.- Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. LWT, 41: 951-958.
- [19].- Lee S.J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K.G., 2005.- Identification of volatile components in Basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chem., 91: 131-137.
- [20].- Adams R.P., 1989.- Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. Appendix I, II, Academic Press, N. York, 116 p.
- [21].- http://www.flavornet.org/d_kovats_ov101.html Accessed 10 June 2000.
- [22].- Hayes A.J., Markovic B., 2002.- Toxicity of Australian essential oil *Backhousiacitriodora* (Lemonmyrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. Food ChemToxicol, 40 (4), 53: 5-43.
- [23].- Guynot Me., Ramos AJ., Seto L., Purroy P., Sanchis V., Marin S., 2003.- Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products, J.Appl. Micobiol, 94 (5): 893-899.

- [24].- Kalembe D., Kunicka A., 2003.- Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*, 10 (10):813-29.
- [25].- Fournier G., Baghdadi H., Ahmed S.S., Paris M., 1989.- Contribution to the Study of *Cotula cinerea* Del Essential Oil. *Planta Medica*, 55, 580 p.
- [26].- Sökmen A., Vandar-Ünlü G., Polissiou M., Daferera D., Sökmen M., Dönmez E., 2003.- Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae). *Phytotherapy. Res.* (7): 1005-1010.
- [27].- Boulahbal F, 1993.- Microbiologie clinique .Ed Ben aknoun, OPU, 169 p.
- [28].- Grigore A., Colceru-Mihul S., Parschiv I., Nita S., Christof R., Iuksel R., Ichim M., 2012.- Chemical analysis and antimicrobial activity of indigenous medicinal species volatile oils. *Romanian Biotechnological Letters*, 17 (5): 7620-7627
- [29].- Sienkiewicz M., Denys P., Kowalczyk E., 2011.- Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol.*, vol. 17: 1-2.
- [30].- Jaime A., Da Silva T., 2004.- Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*, vol. 3 (12): 706-720.
- [31].- Bencheqroun H. K., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Chaouch A., 2012.- Antimicrobial activity of the essential oil of an endemic plant in Morocco *Artemisia mesatlantica*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, vol. 81: 4-21.
- [32].- Pierozan M. K., Pauletti G. F., Rota L., Atti Dos Santos A. C., Alberto L., Diluccio M., Oliveira J. V., 2009.- Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(4): 764-770.
- [33].- Santantoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans FJ., Reglero G., 2005.- Chemical composition and antimicrobial activity of *rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food. Prot.*, vol. 68 (4):790-795.