

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية

الحراش - الجزائر -

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

El Harrach – Alger –

**THESE**

En vue de l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT en Sciences Agronomiques**

**THEME**

**Extraits de douze plantes médicinales poussant en Algérie :  
Etude phytochimique, activité biologique et essai  
d'incorporation des extraits de deux plantes dans une huile  
d'olive**

Présenté par : ZIANI Borhane Eddine Cherif

le ; 15/11/2017

Jury

Président:	M. Benchabane Ahmed	Professeur à l'ENSA
Directeur de thèse:	M. Hazzit Mohamed	Professeur à l'ENSA
Examineurs :	M. Foudil-Cherif Yazid	Professeur USTHB
	M. Ait-Ouazzou Abdennour	MCA (U. Khemis Miliana)
	Mme Ferhat Zoulikha	Professeur ENSA

# *Dédicaces*

*A l'âme de ma Mère*

*Que Dieu l'accueille dans son vaste Paradis*

*A mon père, mon frère et mes  
sœurs*

*Je dédie ce travail*



## Remerciements

C'est avec une grande joie que j'ai débuté cette thèse, et une grande fierté que j'arrive aujourd'hui à écrire mes remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail assidu. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragé et soutenue durant tout le chemin parcouru pour en arriver à ce niveau. Je voudrais leur adresser ces quelques mots afin de les remercier...

Je tiens d'exprimer ma plus haute gratitude à Prof. **Isabel C.F.R. Ferreira**, Prof. A l'institut Polytechnique de Bragança (IPB), à l'Ecole Supérieure Agraire (ESA), Portugal, Coordinatrice du centre du Mountain Research Centre (CIMO) et investigatrice principale en Food Safety and Technology Group., pour m'avoir invité à rejoindre son équipe de recherche et m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de chimie appliquée et biochimie à l'ESA Portugal. Je lui suis reconnaissant pour la confiance et le soutien permanent qu'elle m'a témoigné, ses prestigieux conseils et toute l'importance accordée à ma thématique de recherche et principalement de m'avoir mis en contact avec des experts comme Dr. **Lillian Barros**, qui m'a donné d'extensives guidances en ce qui concerne l'aspect pratique de mon travail, pour son enseignement et ses conseils toujours très avisés, son enthousiasme et ses instructions précieuses.

J'adresse mes sincères remerciements à Dr **Calhelha Ricardo**, Dr **Heleno Sandrina**, Dr **Fernandes Angela**, et toutes les autres personnes du laboratoire de chimie appliquée et biochimie à l'ESA pour leurs disponibilités et leurs aides scientifiques durant toute la période de mon stage.

Je remercie mon Directeur de thèse Prof. **Hazzit M.** du département de technologie alimentaire de m'avoir encadré durant mon travail, aussi pour ses conseils et sa disponibilité.

Je suis particulièrement reconnaissant au Prof. **Benchabane A.**, Chef du département de technologie alimentaire à l'ENSA d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Ainsi aux membres du jury (Prof. **Ferhat Z.** de l'ENSA, Prof. **Foudil-Cherif Y.** de l'USTHB et Prof. **Ait-Ouazzou A.** de l'U. de Khemis miliana) d'avoir accepté de faire part de l'évaluation de mon travail de Doctorat. Qu'ils soient assurés de mes respectueuses considérations.

Je remercie mon père (Mr. **Ziani Mostapha**), mes sœurs (**Rima**, **Amina** et **Chaima**) et mon frère (**Khayro**) pour leurs encouragements et leurs soutiens morales durant les moments difficiles. Je remercie mon ami **Aymen** pour sa gentillesse et sa disponibilité pour toute aide possible. Comme j'adresse un remerciement spéciale à ma collègue **Rached Wahiba** pour sa présence son soutien et sa courtoisie, sans oublié mon ami **Omar** de Mechria l'homme du terrain pour son accompagnement, ses orientations et son savoir en medecine traditionnelle.

*Ziani Borhane E.C.*

# Avant-propos

Une partie des travaux relatés dans ce manuscrit de thèse a donné lieu à la publication d'un article scientifique dans un journal international à comité de lecture/ Elsevier, Science Direct ; Revue : Industrial Crops and Products ; Impact Factor :3,577

## Référence

- ✎ Borhane E.C. Ziani, Ricardo C. Calhelha, Joao C.M. Barreira, Lillian Barros, Mohamed Hazzit, Isabel C.F.R. Ferreira, 2015. Bioactive properties of medicinal plants from the Algerian flora: Selecting the species with the highest potential in view of application purposes. *Industrial Crops and Products*, pp 582–589.

Une partie des travaux a également été valorisée par six (07) communications orales dont 05 internationales et 02 nationales et 06 communications affichées dont 02 internationale et 04 nationales.

## Communications orales

- ✎ *Phytochemical composition and biological activities of the vegetal extracts of six aromatic and medicinal plants of Algerian flora and their uses in food and pharmaceutical industries*: International Conference on Pharmacognosy, Phytochemistry and Natural Products to be held in Istanbul, Turkey during November, 28-29, 2014;
- ✎ *Phytochemical composition and biological activities of the volatile and non-volatile extracts of AMP*. **Ziani Borhane, Eddine Cherif, Hazzit Mohamed** : 1st International Congress on Biodiversity and Wetland Knowledge, development, and health management, 2014, Université d'El taref-Algérie-.
- ✎ *Ethnobotanical survey and chemical composition of essential oils of nine Algerian medicinal plants*: **ZIANI borhane Eddine Cherif, HAZZIT Mohamed**, 5th International Scientific Days on the Valuation of Bioresources BIOLIVAL, Mai 2014, Monastir, Tunisia;
- ✎ *Phytochemistry and biological activities of many medicinal plants from the Algerian flora*. 1st Seminar on Green Chemistry and Industrial Environment in May 2014 Université de Souk ahras;
- ✎ *Use of plant biomolecules extracted from aromatic and medicinal plants of the Algerian flora in the food and pharmaceutical industry*, Bioactive Molecules and applications, pharmacy 12th Days, May 2014 U. hadj Lakhder Batna,
- ✎ *Chemotopic vegetal biodiversity of some aromatic and medicinal plants of the Algerian flora and their valorization in traditional and industrial applications* **Borhane E.C. Ziani - Mohamed Hazzit - Fazia Mouhouche**. BIOLIVAL, Mai 2015, Monastir, Tunis
- ✎ Analyses phytochimiques et propriétés des composés bioactifs: Amélioration d'une huile végétale par incorporation des extraits de plantes steppiées. **ZIANI borhane Eddine Cherif, Lillian Barros, Isabel C.F.R. Ferreira**, 8èmes Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des bioressources BIOLIVAL, Mai 2017, Monastir, Tunisia;

## Communications affichées

- ✎ Study of plant extracts of medicinal plants: chromatographic analyzes and assay of active ingredients, the first Scientific Day of Agricultural Sciences, Environment and Health. Tlemcen, on Wednesday May, 28th, 2014.
- ✎ Promotion of the use of plant extracts of medicinal plants in food industry and phytotherapy, ZIANI Borhane Eddine, 1st and 2nd Exhibition ethnobotany, introductory workshop on Phytotherapy June 7th, 2014, Hamma Garden, Algiers.
- ✎ Potentiel biologique et analyses chromatographiques par HPLC-UV-Vis et GC/MS des extraits phénoliques et des huiles essentielles de deux plantes endmiques de la steppe algérienne. **ZIANI borhane Eddine Cherif, Lillian Barros, Isabel C.F.R. Ferreira**. 8èmes Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des bioressources BIOLIVAL, Mai 2017, Monastir, Tunisia.

## LISTE DES ABREVIATIONS

A% : Pourcentage d'acidité,	FLD : Détecteur fluorescence,
A549 : Lignées tumorales du poumon,	Flv : Flavonoïdes,
ABTS: Radical cation 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate),	FD: Folin- Denis test,
ADR: Résistants aux médicaments antimicrobiens,	FDP : Farnésyldiphosphate,
AG : Acides gras,	FID : Détecteur à ionisation de flamme,
AGPI : Acides gras polyinsaturés,	FLU : Fluorescence,
Ald :Aldéhydes,	GAE : mg équivalents d'acide gallique par g d'extrait,
ASE : Accelerated solvent extraction,	GC: Gas chromatography,
A <sub>w</sub> : Activité de l'eau,	GI <sub>50</sub> : Growth Inhibition 50% of cancer cells,
BHA ou E320: Butylhydroxyanisole ,	GSH Px : Glutathion peroxydase,
BHT ou E321: Butylhydroxytoluène,	HCT116 : Le carcinome du côlon humain,
BuOH : Butanol,	Hela : Cancer cervical humain,
CAE : mg équivalent d'acide caféique par gramme d'extrait,	HepG2 : Carcinome hépatocellulaire,
CATPCA : Analyse catégorielle des composantes principales,	HL-60 : Cellules leucémiques,
CCC, Countercurrent chromatography,	HE : Huile essentielle,
CDK : kinases dépendantes des cyclines,	HO: Huile d'olive,
CL : Chimiluminescence ,	HOV : Huile d'olive vierge,
CIAE : mg équivalent d'acide chlorogénique par gramme d'extrait,	HT-29 : Les lignées tumorales du côlon,
CMI : La concentration minimale inhibitrice,	I (%) : L'inhibition du blanchiment B-carotène,
CO <sub>2</sub> : Le gaz carbonique,	I : initiateur,
CoA: Coenzyme A,	IA : L'indice d'acide,
COI : Conseil oléicole international,	IK : indice de Kovats,
CPG/SM : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse,	INT : Chlorure de p-iodonitrotétrazolium,
DAD : Diode array detector,	IP : Indice de peroxyde,
DPPH : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl ,	IPP: Diphosphate d'isopentényle,
Do : Densités optiques,	ISO : Organisation internationale de normalisation,
EAD: Electro-array detection,	K : Extinction spécifique,
EAU : Extraction assistée par ultrasons,	K <sub>232</sub> : Extinction spécifique à 232 nm,
EC <sub>50</sub> : Concentration d'inhibition de 50 % de radicaux libre,	K <sub>270</sub> : Extinction spécifique à 270 nm,
ECD : Electrochemical detection,	CAL -27 : Carcinome de l'oral humain,
ED : Détecteur électrochimique,	LC: Liquid chromatography,
ELSD : Diffusion de la lumière par évaporation,	LC-DAD/MS-ESI: Liquid chromatography-Diode array Detector coupled to Mass spectrometry-Electrospray ionization,
EOR : Espèces oxygénées réactifs,	LDL : Low density Lipid,
ES : Extrait sec,	LH : Acides Gras insaturés,
EtOAc : Ethyle acétate,	LNCaP, DU-145 : Les lignées tumorales de la prostate,
EtOH : Ethanol,	MAE, Microwave-assisted extraction,
F-C : Folin-Ciocalteu,	MCF-7 : Adénocarcinome du sein,
	MDA : Malonaldéhyde,
	MeOH : Methanol ,
	MG : Matière gras

MHB : Bouillon Mueller-Hinton,	SRB : Sulphorhodamine B,
MIC : Minimal inhibition concentration	ST : <i>S. saturooidies</i> Tieret,
MS : Mass spectrometric,	STAT1 : Transducteur de signal et activateur de transcription 1,
MS : Matière sèche,	StH : Sesquiterpenehydrocarbons,
MtH : Monoterpenehydrocarbons,	StO : Sesquiterpènes oxygénés,
MtO : Monoterpènes oxygénés,	SWE: Subcritical water extraction,
NCI-H460 : Cancer du poumon non à petites cellules,	T° : Température,
NJ : Variété d'huile Neb Djmel,	TBHQ : Tertiarybutylhydroquinone,
NMR: Nuclear magnetic resonance,	THBP : 2,4,5-trihydroxybutyrophenone,
NO• : Monoxyde d'azote,	TBA : L'acide thiobarbiturique,
NQO : Quinine oxydoréductase,	TBARS: Test Thiobarbiturique acid Reactive Species,
1O <sub>2</sub> : Oxygène singulet,	TBHQ : Le tert-butylhydroquinone,
<sup>3</sup> O <sub>2</sub> : L'oxygène à l'état fondamental (triplet ou atmosphérique),	TCA : Trichloracétique acid froid,
P : Pression,	TFC : Totale flavonoides compounds,
P450 : Cytochrome,	TI : Temps d'induction,
PDA: Photodiode array,	TPCs : Totale phénolique compound,
PFE: Pressurized fluid extraction,	Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid,
PH : Le potentiel hydroxyle,	EDTA : éthylène diamine tétra-acétique acide,
PLE : Pressurized liquid extraction,	TSB : Bouillon Tryptone Soja,
PLP2 : Cellule du foie porcin,	UAE : Ultrasound-assisted extraction,
Ppm : partie par million,	UGT : Glucuronyl-transferase,
PV : <i>Ptychotis verticillata</i> ,	UV : Ultraviolets-visibles,
QE : mg équivalents de quercétine par gramme d'extrait,	Vit C : Vitamine C,
R• : Rradical libre de lipide,	Vit E : Vitamine E (α-tocophérol),
RA : Radical alkyle,	
RH : Les lipides insaturés,	
RI : Indice de réfraction,	
RMN : La résonance magnétique nucléaire du carbone-13,	
ROO• : Le radical peroxy,	
ROS : Reactive Oxygen Species,	
RP : Réducing power,	
RP-HPLC : Reversed phase High performance liquid chromatography,	
SAS : <i>S. saturooidies</i> Asla,	
SBE : <i>S. saturooidies</i> Bedrous,	
SEB : <i>S. saturooidies</i> El-Baoid,	
Sens : Photosensibilisateurs,	
SFE: Supercritical fluid extraction,	
SH-SY5Y : Le neuroblastome,	
SK-MEL-28 et SK-MEL-1 : Mélanome,	
SM : <i>S. saturooidies</i> Méchria,	
SN: <i>S. saturooidies</i> El nâama,	
SOD : La superoxyde dismutase,	
SPE: Solid phase extraction,	

## LISTE DES FIGURES

Figure 01. Principales structures sécrétrices d'huiles essentielles.....	5
Figure 02. Exemple de structures chimiques de quelques composés aromatiques des HE.....	9
Figure 03. Voie de biosynthèse des acides hydroxycinnamiques et de leurs esters avec le coenzyme A (CoA).....	13
Figure 04. Grandes lignes de la biosynthèse des principales classes de flavonoïdes .....	20
Figure 05. Stratégies pour la préparation et la caractérisation des extraits phénoliques .....	25
Figure 06. Schéma générale de l'oxydation des lipides .....	31
Figure 07. Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique .....	33
Figure 08. Origine des radicaux libres .....	34
Figure 09. Structure chimique de l'acide ascorbique. ....	36
Figure 10. Structure chimique du <i>Butylhydroxytoluène</i> et du <i>Butylhydroxyanisole</i> .....	37
Figure 11. Rôle des enzymes antioxydantes dans le processus d'inactivation de l'ion superoxyde ...	38
Figure 12. Mécanismes anticancéreux potentiels des composés phénoliques des plantes au cours du développement du cancer .....	42
Figure 13. structure chimique de l'hydroxytyrosol et le tyrosol .....	47
Figure 14. Structure chimique de l'oleuropéine (a) et du ligstroside (b).....	47
Figure 15. Structure chimique de la Lutéoline et de l'apigénine .....	47
Figure 16. <i>Prychotis. verticillata</i> .....	52
Figure 17. <i>Asteriscus. graveolens</i> .....	52
Figure 18. <i>Haloxylon scoparium</i> .....	52
Figure 19. <i>Haloxylon salicornicum</i> .....	52
Figure 20. <i>Herniaria hirsua</i> .....	52
Figure 21. <i>Arbutus unedo</i> .....	52
Figure 22. <i>Limoniastrum guyonianum</i> .....	53
Figure 23. <i>Saccocalyx satureioides</i> .....	53
Figure 24. <i>Thymus pallescens</i> .....	53
Figure 25. <i>Retama raetam</i> .....	53
Figure 26. <i>Ajuga iva</i> .....	53
Figure 27. <i>Themelea hirsute</i> .....	53
Figure 28. Schématisation de la démarche analytique .....	58
Figure 29. Structure chimique de la Lutéoline et de l'apigénine .....	47
Figure 30. Schéma simplifié du procédé d'extraction aqueuse par infusion.....	60
Figure 31. Schéma simplifié du procédé d'extraction par solvants.....	61
Figure 32. Principales étapes d'extraction des composés phénoliques de l'Huile d'olive. ....	63

---

Figure 33. Mécanisme de réaction de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	65
Figure 34. Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) .....	66
Figure 35. Schéma sur la réaction de réduction de fer .....	67
Figure 36. Réaction chimique produite lors du Test TBARS.....	69
Figure 37. Démarche de l'analyse chromatographique .....	73
Figure 38. Schématisation du processus d'enrichissement de l'huile d'olive .....	80
Figure 39. Rancimat metrom 743 .....	81
Figure 40. Teneur en phénols totaux (mg GAE/g extrait), de <i>S. satureioides</i> , <i>P. verticillata</i> et <i>L. guyonianum</i> en fonction du type du solvant.....	103
Figure 41. Teneur en flavonoïdes (mg CE/g extrait), de <i>S. satureioides</i> , <i>P. verticillata</i> et <i>L. guyonianum</i> en fonction du type du solvant.....	103
Figure 42. Chromatogramme GC/MS de <i>S. satureioides</i> (de Mechria) et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.....	109
Figure 43. Chromatogramme GC/MS de <i>S. satureioides</i> (Aouank djmel) et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.....	110
Figure 44. Chromatogramme GC/MS de <i>S. satureioides</i> (Asla Nâama) et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.....	111
Figure 45. Chromatogramme GC/MS de <i>P. verticillata</i> et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.....	111
Figure 46. Profils chromatographiques RP-HPLC d'acides phénoliques, de flavonoïdes des étalons mesurés à 280 nm et à 360 nm .....	118
Figure 47. Chromatogrammes HPLC-UV-Vis de l'extrait aqueux de <i>Ptychotis verticillata</i> représentant les composés phénoliques analysés à 280 nm et à 360nm .....	121
Figure 48. Chromatogrammes HPLC-UV-Vis de l'extrait aqueux de <i>Saccocalyx satureioides</i> représentant les composés phénoliques analysés à 280 nm et à 360nm .....	122
Figure 49. Chromatogramme LC/MS de l'infusion <i>T. pallescens</i> mesurés à deux longueurs d'ondes A : 280nm ;B :370nm .....	124
Figure 50. Chromatogramme LC/MS de l'infusion <i>L. guyonianum</i> mesurés à deux longueurs d'ondes A :280nm ;B :370 nm.....	127
Figure 51. Biplots de points d'objets et de charges de composants .....	130
Figure 52. Stabilité oxydative au Rancimat exprimée en temps d'inductions (h) des huiles enrichies par les différents extraits (en ppm) de <i>P. verticillata</i> .....	135
Figure 53. Stabilité oxydative au Rancimat exprimée en temps d'inductions (h) des huiles enrichies par les différents extraits (en ppm) de <i>S. satureioides</i> .....	136

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01. Classification des principaux monoterpènes et sesquiterpènes selon leur structure chimique.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Tableau 02. Principales classes de composés phénoliques .....	16
Tableau 03. Représentation de quelques acides hydroxybenzoïques.....	17
Tableau 04. Représentation de quelques acides hydroxycinnamiques .....	17
Tableau 05. Représentation de quelques coumarines .....	18
Tableau 06. Principales classes de Flavonoïdes.....	19
Tableau 07. Systématique des espèces végétales étudiées.....	52
Tableau 08. Caractérisation des espèces végétales étudiées et leur utilisation traditionnelle en Algérie .....	525
Tableau 09. Matériel et réactifs utilisés dans l'analyse expérimentale.....	526
Tableau 10. Rendements d'extraction des plantes étudiées par différents solvants .....	83
Tableau 11. Activité antioxydante des extraits d'infusions des plantes étudiées.....	87
Tableau 12. Activité antioxydante des extraits de solvants organiques de <i>S. satureioides</i> , <i>P. verticillata</i> et <i>L. guyonianum</i> .....	89
Tableau 13. Propriétés cytotoxiques des infusions préparées à partir des espèces des plantes étudiées .....	92
Tableau 14. Effet antibactérien des extraits aqueux de <i>S. satureioides</i> , <i>T. pallascens</i> et <i>P. verticillata</i> .....	97
Tableau 15. Phénols totaux, flavonoïdes, esters tartriques et flavanols quantifiés dans les infusions des plantes. ....	101
Tableau 16. Composition chimique des huiles essentielles des plantes identifiées par GC/MS.....	108
Tableau 17. Temps de rétention et $\lambda_{max}$ d'absorption des 14 composés phénoliques analysés par HPLC-UV-VIS.....	119
Tableau 18. Indices physicochimique des huiles d'olives vierges et la variété Neb Djmel testée. ....	133

## TABLE DES MATIERES



INTRODUCTION GENERALE.....	1
<b>I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I METABOLITES SECONDAIRES ET COMPOSES BIOACTIFS DES PLANTES.....</b>	<b>4</b>
<b>I. Huiles essentielles.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Répartition botanique et histologique des huiles essentielles .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Propriétés physico-chimiques et biologiques des huiles essentielles .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Propriétés physico-chimiques.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Propriétés biologiques .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Composition chimique et voie de biosynthèse.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Les terpénoïdes. ....</b>	<b>7</b>
<b>3.2. Les Sesquiterpènes .....</b>	<b>9</b>
<b>3.3. Les composés aromatiques .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Synergie entre les composés des huiles essentielles.....</b>	<b>9</b>
<b>5. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles .....</b>	<b>9</b>
<b>6. Domaines d'utilisation des huiles essentielles .....</b>	<b>10</b>
<b>7. Toxicité des huiles essentielles .....</b>	<b>11</b>
<b>II. Composés phénoliques .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Définition.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Rôle bioécologique des composés phénoliques.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Structure chimique.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Biosynthèse des composés phénoliques.....</b>	<b>13</b>
<b>5. Répartition cellulaire et tissulaire des composés phénoliques dans la plante .....</b>	<b>14</b>
<b>6. Facteurs influençant la teneur des plantes en composés phénoliques .....</b>	<b>15</b>
<b>6.1. Facteur intrinsèques.....</b>	<b>15</b>
<b>6.2. Facteurs extrinsèques.....</b>	<b>15</b>
<b>7. Formes chimiques et classification des composés phénoliques.....</b>	<b>16</b>
<b>7.1. Les formes simples.....</b>	<b>16</b>
<b>7.1.1. Phénols simples .....</b>	<b>16</b>
<b>7.1.2. Acides phénoliques .....</b>	<b>16</b>

7.1.3.	Les Coumarines .....	18
7.1.4.	Les Flavonoïdes.....	18
7.2.	Formes condensées .....	20
7.2.1.	Les Tannins .....	21
8.	Activité biologique des composés phénoliques.....	21
8.1.	Propriétés antiradicalaires et antioxydantes.....	21
8.2.	Propriétés chélatrices des ions métalliques .....	22
8.3.	Propriétés antimicrobiennes.....	22
8.4.	Propriétés antictumorales.....	22
III.	Extraction et analyses des composés bioactifs .....	23
1.	Extraction des molécules volatiles.....	23
1.1.	Méthodes d'extraction des composés volatils.....	23
2.	Paramètres influents l'extraction des huiles essentielles.....	24
3.	Extraction, caractérisation et dosage des composés phénoliques.....	24
4.	L'extraction des composés phénoliques par les solvants organiques.....	25
4.1.	Macération .....	25
4.2.	Extraction par fluides supercritiques .....	26
4.3.	Extraction par solvants accélérés.....	26
5.	Extraction assistée .....	26
5.1.	Par micro-ondes.....	26
5.2.	Par ultrason.....	26
6.	Dosage et Caractérisation .....	27
6.1.	Chromatographie .....	27
6.2.	La résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN).....	28
	Chapitre II : OXYDATION & ANTIOXYDANTS.....	29
1.	Oxydation des aliments .....	29
2.	Causes et conditions de l'oxydation .....	29
3.	Oxydation des lipides .....	30
4.	Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides.....	30
4.1.	Auto-oxydation .....	30
4.2.	Photo-oxydation.....	32
4.3.	Oxydation enzymatique .....	32
5.	Le stress oxydatif .....	33
5.1.	Les espèces oxygénées réactifs .....	33

5.2.	Les radicaux libres .....	33
5.2.1.	Origine des radicaux libres .....	34
5.2.2.	Dérivés oxygénés non radicalaires .....	34
6.	Les antioxydants .....	35
6.1.	Critères d'un bon antioxydant .....	35
6.2.	Classification des antioxydants .....	35
6.2.1.	Antioxydants naturels .....	35
6.2.2.	Antioxydants de synthèse .....	37
6.2.3.	Antioxydants enzymatiques .....	38
7.	Mécanismes d'action des antioxydants phénoliques .....	38
8.	Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant.....	39
9.	Facteurs influençant l'oxydation des lipides .....	40
9.1.	Facteurs intrinsèques .....	40
9.2.	Facteurs extrinsèque .....	41
<b>Chapitre III: ACTIVITE ANTITUMORALE.....</b>		<b>42</b>
1.	Les composés phénoliques naturels et le cancer .....	42
1.1.	Effets in vitro des composés phénoliques .....	43
1.2.	Effets In vivo des composés phénoliques .....	44
2.	Interférence des fonctions cellulaires de base par les composés phénoliques .....	44
<b>Chapitre IV: PHYTOCHIMIE DE L'HUILE D'OLIVE .....</b>		<b>46</b>
1.	Huile d'olive vierge (HOV) et composition chimique.....	46
2.	Les composés phénoliques de l'huile d'olive .....	46
2.1.	Les phénols simples .....	46
2.2.	Les dérivés sécoiridoïdes .....	47
2.3.	Flavonoïdes.....	47
<b>Chapitre V: ETUDE ETHNOBOTANIQUE, MONOGRAPHIE DES ESPECES VEGETALES.....</b>		<b>468</b>
1.	Etude ethnobotanique .....	48
<b>Partie II : ETUDE EXPERIMENTALE</b>		
<b>I. MATERIEL ET METHODES .....</b>		<b>54</b>
1.	Choix des plantes et authentification des espèces .....	54
2.	Échantillonnage .....	54
3.	Choix de la variété d'huile d'olive.....	54
4.	Produits chimiques et Réactifs .....	56

<b>5. Méthodes et procédés d'analyse</b> .....	57
<b>5.1. Préparation des échantillons et extraction</b> .....	57
<b>5.1.1. Séchage et broyage des plantes</b> .....	57
<b>5.1.2. Extraction</b> .....	58
<b>5.2. Choix des solvants et technique d'extraction</b> .....	59
<b>5.3. Protocoles d'extraction</b> .....	60
<b>5.3.1. Infusion</b> .....	60
<b>5.3.2. Extraction par macération</b> .....	60
<b>5.3.3. Extraction des huiles essentielles</b> .....	62
<b>5.3.4. Extraction des composés phénoliques de l'huile d'olive</b> .....	63
<b>5.4. Préparation de la gamme des concentrations</b> .....	64
<b>6. Dosage des composés phénoliques</b> .....	64
<b>6.1. Dosage des phénols totaux</b> .....	64
<b>6.2. Dosage des flavonoïdes</b> .....	655
<b>6.3. Dosage des phénols totaux, esters tartriques et les flavonols dans les infusions</b>	65
<b>7. Activités biologiques</b> .....	66
<b>7.1. Evaluation de l'activité antioxydante</b> .....	66
<b>7.1.1. Test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)</b> .....	66
<b>7.1.2. Test de la réduction du fer (Fe<sup>3+</sup>)</b> .....	67
<b>7.1.3. Test de blanchiment de β-carotène/acide linoléique</b> .....	68
<b>7.1.4. Test Thiobarbiturique acid Reactive Species (TBARS)</b> .....	69
<b>7.2. Evaluation de l'activité antitumorale</b> .....	70
<b>7.2.1. Cytotoxicité dans les lignées de cellules tumorales humaines</b> .....	70
<b>7.2.2. Cytotoxicité dans la culture primaire des cellules du foie non tumorales</b>	71
<b>7.3. Evaluation de l'activité antibactérienne</b> .....	71
<b>7.3.1. Souches bactériennes</b> .....	71
<b>7.3.2. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques des taches de bactéries</b>	71
<b>7.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)</b> .....	72
<b>8. Analyses chromatographiques</b> .....	73
<b>8.1. Analyse des huiles essentielles par GC/MS</b> .....	73
<b>8.1.1. Conditions chromatographiques</b> .....	73
<b>8.1.2. Mode d'identification</b> .....	74
<b>8.2. Analyses des acides phénoliques et flavonoïdes par HPLC-UV-VIS</b> .....	74

8.2.1.	Conditions chromatographiques .....	74
8.2.2.	Identification des composés phénoliques .....	75
8.2.3.	Préparation de la solution des étalons .....	75
8.2.4.	Choix des longueurs d'ondes et des étalons.....	75
8.3.	Analyses par LC-DAD-ESI/MS.....	75
8.3.1.	Identification et quantification des composés phénoliques .....	76
9.	Incorporation des extraits de deux plantes dans une matrice alimentaire (huile d'olive) .....	77
9.1.	Analyses physico-chimiques de l'huile d'olive .....	77
9.1.1.	L'indice d'acide .....	77
9.1.2.	L'indice de peroxyde .....	78
9.1.3.	Extinction spécifique .....	79
9.2.	Test de l'activité antioxydante.....	79
9.3.	Enrichissement de l'huile d'olive .....	80
9.4.	Test Rancimat .....	80
10.	Analyses statistiques.....	81
II.	RESULTATS ET DISCUSSION .....	82
1.	Evaluation des rendements d'extraction des composés phénoliques .....	82
2.	Evaluation de l'activité antioxydante .....	86
3.	Evaluation de l'activité antitumorale .....	91
4.	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	96
5.	Dosage des composés bioactifs.....	100
5.1.	Dosage des composés bioactifs dans les infusions .....	100
5.2.	Dosage des composés phénoliques des extraits des solvants organiques .....	102
6.	Analyses chromatographiques .....	106
6.1.	Analyses chromatographiques des huiles essentielles par GC/MS .....	106
6.1.1.	Rendements en huiles essentielles .....	106
6.1.2.	Composition chimique des huiles essentielles.....	107
6.1.3.	Activité antioxydante des Huiles Essentielles.....	114
6.2.	Analyse des extraits phénoliques par chromatographie liquide.....	117
6.2.1.	Optimisation des conditions chromatographiques par RP-HPLC-UV/Vis .....	117
6.3.	Analyses par LC-DAD/MS-ESI.....	123
7.	Analyse statistique .....	129
	ENRICHISSEMENT DE L'HUILE D'OLIVE .....	131

<b>1. Analyses physico-chimiques de l'Huile d'olive .....</b>	<b>131</b>
<b>1.1. L'indice d'acide .....</b>	<b>131</b>
<b>1.2. L'indice de peroxyde .....</b>	<b>131</b>
<b>1.3. Extinction spécifique .....</b>	<b>132</b>
<b>2. Stabilité oxydative de l'huile d'olive .....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>139</b>

## Résumé

La multitude de structures phénoliques diverses ainsi que leur effet biologique au niveau moléculaire, permet leur utilisation en tant que facteurs antioxydants, antitumorales et antibiotiques. Pour un passage de l'utilisation traditionnelle vers une valorisation industrielle, une étude des extraits de douze (12) plantes médicinales de la flore algérienne choisies pour leurs vertus, a fait l'objet de ce travail de recherche. Les métabolites secondaires de ces plantes ont été explorés par des tests biochimiques in-vitro pour évaluer les limites de leur potentiel biologique et caractérisé par analyses chromatographiques (GC/MS, RP-HPLC et LC-DAD/MS-ESI) pour déterminer leur composition chimique ainsi que la relation qui lie leur structure à l'activité. Tandis qu'une étape d'amélioration par enrichissement d'une huile d'olive pauvre a été simulé par une thermo-oxydation forcée au Rancimat® après l'ajout de différentes fractions des extraits à l'échelle expérimentale. Ceci, permet de sélectionner les espèces avec la plus grande aptitude à être utilisé dans des buts spécifiques, tout en validant scientifiquement leurs revendications médicales et alimentaires. Au laboratoire, plusieurs extraits sont obtenus par l'eau (Extraits Aqueux : *infusions* ; huiles essentielles par *hydrodistillation*) ou par solvants organiques : éthanolique (EtOH) chloroformique (CHI), butanolique (BUt) et l'extrait d'acétate d'éthyle (Et-Ac). L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de plusieurs essais (DPPH, PR, B-carotène, TBARS) au même titre pour les tests de cytotoxicité contre des lignées cellulaires tumorales humaines MCF-7 (adénocarcinome du sein), NCI-H460 (cancer du poumon non à petites cellules), HeLa (cancer du col utérin Carcinome) et HepG2 (carcinome hépatocellulaire), pareille pour les cellules non tumorales (PLP2) ont été effectué, de même, sur six bactéries Gram-négatives et quatre Gram-positives pour déterminer les CMI. Les composés bioactifs ont également été quantifiés par plusieurs méthodes spectrophotométriques. Les résultats ont été analysés en considérant les variations individuelles de chaque paramètre, mais aussi dans une approche agrégée en appliquant l'analyse en composante principale (ACP) afin d'acquérir une connaissance approfondie sur le potentiel bioactif globale des espèces étudiés. En effet, *T. palleescens* majoré par : l'acide rosmarinique et le Kaempferol-*O*-glucuronide et *L. guyonianum* contenant principalement la Myricetin et ses dérivés comme la Myricetin-3-*O*-rhamnoside, ont montré la plus forte activité antioxydante (EC<sub>50</sub> allant de 29 à 229 µg/mL et 54 à 240 µg/mL, respectivement), tandis que *A. graveolens* a donné la meilleure cytotoxicité contre des lignées cellulaires tumorales humaines (valeurs d'GI50 allant de 11 au 29 µg/mL). *L. guyonianum* exhibe également une forte activité antibactérienne principalement contre les Gram-positives. L'espèce *T. palleescens* ressortaient comme espèces à teneurs les plus élevées en composés bioactifs (Phénols : 463 mg GAE, Flavonoïdes : 194 mg CE, Esters ; 186 mg CAE ; Flavonols : 85 mg QE, dans l'extrait hydrique). *S. satureioides* de six (06) régions et l'espèce *P. verticillata* étaient riche en huiles essentielles avec une prédominance du Thymol dans les deux plantes et du  $\alpha$ -Terpinéol et du Borneol principalement dans la première espèce. Ce qui favorise l'utilisation de ces deux plantes pour l'enrichissement de l'huile d'olive nebulisée où les extraits ont été ajoutés à 300, 500 et 900 ppm de niveau d'équivalence phénolique. Après oxydation on réévalue les paramètres physico-chimiques pour suivre la dégradation des échantillons d'huiles d'olive sujettes à la thermo-oxydation. Les résultats du Rancimat conduisent à conclure qu'une concentration moyenne en extrait pourra avoir des temps d'induction les plus élevés (18h +/- 0,5). D'un point de vue global, ces espèces seraient les matrices les plus appropriées compte tenu de leur bioactivité (en particulier la cytotoxicité) critère déduit à partir des données de l'ACP.

### Mots clés :

Composés phénoliques, infusions, Extraits par solvants organiques, activité antioxydante, activité antitumorale, cytotoxicité, activité antibactérienne, huile d'olive, Oxydation, enrichissement, Rancimat.

## Abstract

The multitude of various phenolic structures, as well as their biological effect at the molecular level, allow their use as antioxidant factors and as antitumor and antibiotic agents. For a transition from traditional use to industrial valorization, a study of the extracts of twelve (12) medicinal plants of the Algerian flora selected for their virtues was the subject of this research work. Secondary metabolites of these plants were explored by *in vitro* biochemical tests to assess their biological potential and characterized by chromatographic analysis (GC / MS, RP-HPLC and LC-DAD / ESI-MS) to determine their chemical composition as well as the relationship between their structure and activity. While, enrichment of a poor olive oil was simulated by a thermal oxidation forced by Rancimat® after adding various extracted fractions in experimental scale. This seeks to select the species with the greatest aptitude to be used for specific purposes, while scientifically validating their medical and food claims. In the laboratory, several extracts are obtained by water extraction (Aqueous Extracts: infusions, essential oils by hydrodistillation) or organic solvent extraction: ethanol (EtOH) chloroform (CHI), butanol (BUT) and the ethyl acetate extract (Et-Ac). The antioxidant activity was evaluated by several tests (DPPH, PR, B-carotene, TBARS) in the same way for the cytotoxicity tests against human tumor cell lines MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI- H460 (non-small cell lung cancer), HeLa (cervical cancer Carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma), similar for non-tumor cells (PLP2) were also performed on six Gram-negative bacteria and four Gram-positive to determine MIC. The bioactive compounds were also quantified by several spectrophotometric methods. The results were analyzed by considering the individual variations of each parameter, but also in an aggregate approach, using Principal Component Analysis (PCA) to gain a thorough knowledge of the overall bioactive potential of the species studied. Indeed, *T. pallescens* increased by: rosmarinic acid and Kaempferol-*O*-glucuronide and *L. guyonianum* mainly containing Myricetin and its derivatives such as Myricetin-3-*O*-rhamnoside, showed the highest antioxidant activity (EC<sub>50</sub> ranging from 29 to 229 µg / mL and 54 to 240 µg / mL, respectively), whereas *A. graveolens* gave the best cytotoxicity against human tumor cell lines (GI<sub>50</sub> values ranging from 11 to 29 µg / mL). *L. guyonianum* also exhibits strong antibacterial activity mainly against Gram-positive species. *T. pallescens* were listed as species with the highest bioactive compounds (Phenols: 463 mg GAE, Flavonoids: 194 mg CE, Esters, 186 mg CAE, Flavonols: 85 mg QE, in the water extract). *S. satureioides* from six (06) regions and the species *P. verticillata* were rich in essential oils with a predominance of Thymol in both plants and  $\alpha$ -Terpineol and Borneol principally in the first specie. This leads their use for the enrichment of neb djmel olive oil where the extracts have been added at 300, 500 and 900 ppm of phenolic equivalence level. After oxidation, the physicochemical parameters are re-evaluated in order to follow the degradation of the samples of olive oils subjected to thermo-oxidation. The results of the Rancimat lead to the conclusion that an average concentration of extract may have the highest induction times (18 h +/- 0.5). From a global perspective, these species would be the most appropriate matrices in view of their bioactivity (in particular cytotoxicity) criterion deduced from the CPA data.

### Keywords :

Phenolic Compounds, infusions, Organic solvent extracts, antioxidant activity, antitumoral activity, antimicrobial activity, olive oil, Oxidation, enrichment, Rancimat.

ان وفرة الهياكل الفينولية ، بالإضافة لتأثيرها البيولوجي على المستوى الجزيئي، يتيح استخدامها كعوامل فعالة مضادة للأكسدة وعوامل مضادة للأورام وكالمضادات حيوية. ومن أجل الانتقال من الاستخدام التقليدي إلى التثمين الصناعي، كانت دراسة مستخلصات من اثني عشر (12) نباتا طبييا من النباتات الجزائرية المختارة لفضائلها العلاجية، موضوع هذا البحث. تمت دراسة مركبات الأيض الثانوي لهذه النباتات من خلال بعض الاختبارات البيو كيميائية لتقييم خصائصها البيولوجية وتوصيفها بواسطة التحليلات الكروماتوغرافية (GC/MS، RP-HPLC، LC-MS/ESI) وتوضيح العلاقة بين التركيبة الكيميائية ونشاطها البيولوجي. في حين تم دراسة إثراء إضافة تلك المستخلصات لتحسين زيت الزيتون تفتقر للمركبات المضادة للأكسدة وذلك عن طريق تفعيل الأكسدة الحرارية المسرعة بفعل جهاز Rancimat® بعد إضافة أجزاء مختلفة من المستخلصات إلى النطاق التجريبي. وهذا ما يجعل من الممكن تحديد الأنواع النباتية ذات أكبر قدر من الكفاءة لاستخدامها لأغراض محددة، تحت تحقيق علمي لتحديد المتطلبات الطبية والغذائية. على مستوى المختبر، تم الحصول على عدة مستخلصات مائية: منقوع، والزيتون العطرية بواسطة hydrodistillation أو المذيبات العضوية: الإيثانول (EtOH) الكلوروفورم (CHI)، بيوتا نول (But) والاثيل أسيتات (ET-Ac). تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام عدة اختبارات (DPPH، RP، B-carotène، TBARS) في نفس الطرق لاختبارات السمية الخلوية ضد خطوط الخلايا السرطانية MCF-7 مغذية الثدي، NCI-H460 سرطان الرئة الخلايا غير الصغيرة، HeLa سرطان عنق الرحم، HepG2، سرطان الكبد، على غرار الخلايا غير السرطانية PLP2، واختبار على ستة من البكتيريا سالبة الجرام وأربعة إيجابية الجرام لتحديد CMI. كما تم تحديد كميات المركبات النشطة بيولوجيا بواسطة عدة طرق، مجموع الفينولات/ بواسطة F-C، فلافونويد بواسطة AICI3 واسترات وفلافونولز. تم تحليل النتائج من خلال النظر في الاختلافات الفردية لكل معلمة، ولكن أيضا في نهج تجميعي باستخدام تحليل المكونات الرئيسية (ACP) لاكتساب معرفة دقيقة على القدرة النشطة بيولوجيا الشاملة للأنواع المدروسة. في الواقع، *T. pallescens* متكون من حمض rosmarinic و *Kaempferol-O-glucuronide* كما تحتوي *L. guyonianum* أساسا على Myricetin ومشتقاته مثل 3-Myricetin *O-rhamnoside* أظهرت أعلى نشاط مضاد للأكسدة EC50 تراوح من 29-229 ميكروغرام / مل و 54-240 ميكروغرام / مل على التوالي. في حين أعطى *A. graveolens* أفضل السمية الخلوية ضد خطوط الخلايا السرطانية قيم GI<sub>50</sub> تتراوح من 11 إلى 29 ميكروغرام / مل. أيضا *L. guyonianum* يعرض نشاط قوي مضاد للبكتيريا أساسا ضد إيجابية الغرام. في حين تبين ان *T. pallescens* كأغنى الأنواع وفقا لأعلى مستويات المركبات النشطة بيولوجيا: الفينولات: 463 ملغ GAE، الفلافونويدات: 194 CE، 186 ملغ CAE، الفلافون 85 ملغ QE في منقوع الماء. *S. satureioides* مأخوذ من ستة 06 مناطق *P. Verticillata* كانت غنية بالزيوت الأساسية مع هيمنة الثيمول في كل منها و  $\alpha$ -ثيربينول وبورنيول أساسا في النوع الأول *S. satureioides* هذا يفضل استخدامها لإثراء زيت الزيتون *neb Djmel*، حيث تم إضافة مقتطفات في 300 و 500 و 900 جزء في المليون من مستوى التكافؤ الفينولية. بعد الأكسدة، يتم إعادة تقييم المعلمات الفيزيوكيميائية من أجل متابعة تدهور عينات زيت الزيتون الخاضعة للأكسدة الحرارية. نتائج Rancimat تؤدي إلى استنتاج أن متوسط تركيز المستخلص قد يكون أعلى مرات الحث (18 د +/- 0.5). على أساس التحليلات الإحصائية، أثبتت الأنواع المدروسة لتكون الخيار المفضل كمصدر للمركبات الحيوية النشطة مع قدرة عالية، فإن هذه الأنواع تكون مصفوفات أنسب بالنظر النشاط الحيوي لها (خصوصا السمية الخلوية) مستمدة من بيانات ACP.

#### الكلمات المفتاحية:

المركبات الفينولية، منقوع، مستخلصات المذيبات العضوية، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للخلايا السرطانية، نشاط مضاد للميكروبات، زيت الزيتون، الأكسدة، الإثراء، رانسيمات.

## Introduction générale

---

La nature a fourni l'humanité avec des produits naturels depuis des siècles et continue d'être la source la plus riche de composés bioactifs utiles pour le développement de médicaments et d'aliments fonctionnels modernes (Cseke et al., 2006; Hans-Jorg, 2011). Les plantes terrestres, en particulier, ont été utilisées comme base de pharmacopée traditionnelle dès 2600 avant JC (Croteau et al., 2000). Récemment, l'Organisation Mondiale de la Santé estime, qu'environ 80% des habitants de la planète utilisent des médicaments traditionnels pour leurs soins et qu'environ 25% des médicaments prescrits contiennent des extraits ou des métabolites végétaux (Merghoub, 2011).

En chimie verte, les plantes sont considérées comme des producteurs d'une vaste gamme de métabolites secondaires à fonctions bioécologiques importantes (Croteau et al., 2000; Quideau et al., 2011), dès lors exploités, par les humains comme sources de médicaments, des agents aromatisants, des parfums et pour un large spectre d'applications (Benarba, 2016; Makkar et al., 2007). Des progrès rapides ont été accompli dans la compréhension des produits naturels, ainsi que leur biosynthèse, la régulation, la fonction et l'évolution de leur diversité métabolique (Cavalcanti et al., 2013; Osbourn et Lanzotti, 2009). Il est opportun de porter cette information ainsi que les progrès contemporains dans la chimie, la biologie végétale, l'écologie, l'agronomie et la santé humaine pour fournir un guide complet de produits naturels d'origine végétale (Ozcan et al., 2014).

La flore Algérienne se révèle donc riche et diversifiée, ce qui constitue un important atout dans le criblage de nouvelles molécules à visée thérapeutique et agroalimentaire (Azzi et al., 2012; Djeridane et al., 2006; Rached et al., 2016). La variété des étages bioclimatiques permet l'installation d'une flore riche et variée avec un endémisme marqué (Reguieg, 2011). A côté de ce contexte naturel particulièrement favorable et prometteur, l'Algérie dispose d'un savoir-faire ancestral, qui a été préservé au cours des siècles : la médication par les plantes, leur utilisation pour l'aromatisation et la conservation des aliments, ainsi que pour l'extraction des principes aromatiques destinés à l'usage familial ou commercial (Bakchiche et al., 2013; Benarba, 2016; Reguieg, 2011). Cependant, ce savoir-faire, permet d'orienter les recherches scientifiques vers l'étude des biomolécules à potentiel biologique intéressant.

L'oxydation des lipides est l'un des phénomènes les plus importants qui affectent la durée de conservation et les attributs nutritionnels des aliments (Atmani et al., 2011; Da Silva et Jorge, 2014; Hennebelle et al., 2004). Ça peut entraîner une diminution de la qualité organoleptique du produit (altération d'odeurs et de saveurs par rancissement) mais essentiellement une détérioration de la qualité nutritionnelle à travers la formation de radicaux libres, peroxydes, d'aldéhydes, de cétones et d'esters (Carocho & Ferreira, 2013a; Halliwell, 2007). Ces éléments constituent, pour la plupart, des composés toxiques, voir cancérigènes, favorisant un stress oxydatif au niveau physiologique menant au développement de plusieurs maladies (Armstrong, 2010; Dai et Mumper, 2010; Hennebelle et al., 2004). Des antioxydants chimiquement synthétisés sont largement utilisés pour retarder la dégradation oxydative des lipides. Cependant, suite aux risques toxicologiques associés, le consommateur tend à éviter les additifs alimentaires de synthèse qui sont suspectés d'engendrer de sérieuses complications sur la santé voir même des effets cancérigènes (Carocho et Ferreira, 2013a; Estevinho et al., 2003) pour ainsi s'orienter vers les antioxydants naturels sans risque sur l'organisme (Quideau et al., 2011; Shahidi et Ambigaipalan, 2015). De ce fait, l'industrie agroalimentaire converge vers le développement et l'utilisation des antioxydants d'origine biologique (Shahidi et Ambigaipalan, 2015; Sharangi, 2009), tel que les composés phénoliques qui captent actuellement l'intérêt des recherches afin de trouver de nouvelles matières bioactives.

Diverses recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification des constituants de plusieurs matrices naturelles à savoir les plantes médicinales (Sarker & Nahar, 2009). La grande variété structurale de leurs métabolites secondaires annonce une certaine difficulté à connaître l'intérêt de ces molécules, en tant que tels :

- œ *Quelles propriétés viennent de la nature phénolique d'une molécule et que doit-on aux particularités structurales de chaque molécule ?*
- œ *Quelle est la fraction responsable des bioactivités et quelle est la relation structure/activité ? Quels sont les méthodes d'extractions préconisées pour cibler les composés bioactifs et quelles analyses faut-il envisager pour exhiber leur potentiel biologique ?*

Ce travail met la lumière sur la recherche des biomolécules d'origine végétale dans douze (12) espèces de plantes médicinales de la flore Algérienne (principalement désertique), montrant également les potentiels biologiques de leurs extraits et les

mécanismes d'action par des tests chimiques et biologiques *in-vitro* au même titre que la caractérisation phytochimique en utilisant des techniques chromatographiques tel que la RP-HPLC, la LC-DAD/MS-ESI et la GC/MS.

Cependant, les plantes médicinales choisies lors de cette étude ont des intérêts médicaux multiples, récoltées de plusieurs régions sur le territoire Algérien après des enquêtes ethnobotaniques et ethno-pharmacologiques pour orienter le choix des analyses à partir de l'usage traditionnel par les populations locales lors des prospections d'une part et à travers une recherche bibliographique d'autre part. Le mode d'administration le plus courant est sous forme d'infusion, ceci permet de choisir ce moyen d'extraction comme méthode adaptée pour l'analyse de toutes les plantes choisies. D'autant plus, la méthode d'extraction influe directement sur la quantité et la nature des structures chimiques extraites ainsi que leur activité (Santos-buelga et al., 2012). Dans cette perspective, on a également choisie d'extraire les composés de plantes choisie par des solvants organiques : Hydroéthanolique, l'éthylacétat, le Chloroforme et le Butanol et les huiles essentielles par Hydrodistillation.

Une d'estimation des limites de leurs activités biologiques (antioxydante, antitumorale et antibactérienne) est tout de même effectuée par des tests biochimiques référenciés *in-vitro* afin de pouvoir délimiter leur zone d'activité ( $EC_{50}$ ,  $GI_{50}$  et CMI). Tandis que les résultats obtenus seront utilisés pour leur valorisation dans l'amélioration de la résistance d'une huile d'olive à l'oxydation par l'ajout de ces composés à des doses bien déterminée. Le suivi de l'oxydation accélérée par Rancimat avant et après enrichissement de l'huile d'olive permet de déterminer des degrés de protections engendrés par les composés phénoliques. Cependant, seulement après l'étape de caractérisation qu'on pourrait constituer un protocole pour l'utilisation des extraits de plantes en tant qu'additifs alimentaires naturels antioxydants.

Finalement ce travail s'inscrit dans la thématique des ressources biologiques de l'Algérie dont l'objectif fondamentale est le développement de la connaissance, la valorisation et la préservation du patrimoine phytogénétique local. Cet axe couvre aussi bien les espèces spontanées, endémiques ou non de la région steppique, dont on présente ici certains qui révèlent un intérêt médical et alimentaire important.

Partie I :

Etude

Bibliographique

## Chapitre I

---

### METABOLITES SECONDAIRES ET COMPOSES BIOACTIFS DES PLANTES

Les plantes produisent une grande variété de produits naturels avec une grande diversité de structures communément appelé «*métabolites secondaires*» par opposition aux «*métabolites primaires*» qui sont essentiels pour la croissance des plantes et leur développement (Wink, 2015). Les métabolites secondaires étaient autrefois considérés comme des "déchets" sans fonction physiologique pour la plante. Cependant, ces produits naturels remplissent des fonctions importantes dans l'interaction entre les plantes et leur environnement biotique et abiotique. Ils peuvent servir à la défense contre les herbivores et les pathogènes, à la pollinisation des fleurs par attraction des insectes pollinisateurs, aussi comme des hormones ou de molécules de signalisation (Heleno et al., 2015b; Wink, 2015). En plus de leur fonction physiologique chez les plantes, les produits naturels ont également un fort impact sur la culture humaine et ont été utilisés tout au long de l'histoire humaine comme condiments, des pigments et des produits pharmaceutiques (Kalra, 1998).

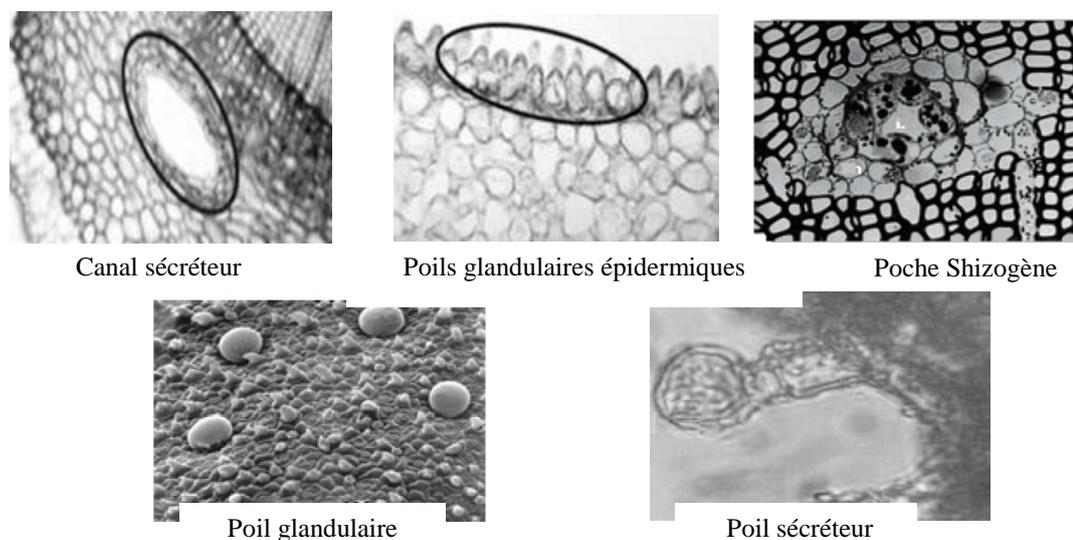
#### I. Huiles essentielles

##### STRUCTURE CHIMIQUE, VOIES DE BIOSYNTHESE ET PROPRIETES

Plusieurs huiles essentielles (H.E.) sont connues actuellement, commercialisées et utilisées en parfumerie et dans le domaine du cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire et phytothérapie comme des remèdes naturel (Ben et al., 2015). De nombreux travaux scientifiques dévoilent le potentiel biologique des H.E. des plantes aromatiques et la relation avec leur composition chimique (Bousbia, 2013). Anton, Lobstein, (2005) précise que les H.E. ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc...) contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser. Tandis que, le terme «essentielle» fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (Dumortier, 2006). Une définition plus large attribuée par Badavari (1996) : « *Nom générique pour tous les produits lipophiles, volatils, préexistants dans une plante ou une drogue végétale. Une Huile Essentielle est constituée de nombreuses substances chimiques peu solubles dans l'eau* ».

## 1. Répartition botanique et histologique des huiles essentielles

Les H.E. sont produites chez certains végétaux: 17 500 espèces aromatiques appartenant à un nombre limité de familles, dont notamment les *Myrtacées*, les *Lauracées*, les *Lamiacées*, les *Astéracées* (Hans-Jorg, 2011). D'après Cseke et al., (2006), ces familles sont particulièrement riches en H.E. Leur biosynthèse et leur accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées principalement réparties dans un nombre de familles limitées telles que les *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae* et *Piperaceae*. Croteau et al., (2000) précisent que les H.E. sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices (Fig.01) et s'accumulent en général dans les cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont stockées soit dans des cellules transformées en cellules à essence (*Lauracées*, *Zingibéracées*,...), dans des poils glandulaires épidermiques (*Lamiacées*, *Géraniacées*, *Verbénacées*,...), des poches sphériques sécrétrices Shizogènes (*Astéracées*, *Rutacées*, *Myrtacées*,...), des canaux glandulaires sécréteurs (*lysigènes*) voire des papilles (*Conifères*, *Ombellifères*,...).



**Figure 01.** Principales structures sécrétrices d'Huiles essentielles (Hans-Jorg, 2011).

## 2. Propriétés physico-chimiques et biologiques des huiles essentielles

### 2.1. Propriétés physico-chimiques

Selon Azimova & Vinogradova, (2013), les H.E. forment un groupe très homogène en ce qui concerne leurs propriétés physico-chimiques, ce sont généralement, des liquides d'odeur et de saveur forte, rarement colorés et volatils à température ambiante, sans

aspect gras ni onctueux ce qui les différencie des huiles fixes, de densité inférieure à celle de l'eau (à l'exception des HE de *Clou de girofle*, de *sassafras*, et de *cannelle*) et faible pour les HE à forte teneur en monoterpènes, solubles dans la plupart des solvants organiques et les lipides, mais peu solubles dans l'eau, l'indice de réfraction dépend essentiellement de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une teneur élevée en monoterpènes donnera un indice élevé ; La solubilité dans l'éthanol est inversement proportionnelle avec la teneur en hydrocarbures aliphatiques, mono- et sesquiterpènes ; la forme asymétrique de quelques composés est responsable de leur pouvoir rotatoire ; stables dans les bonnes conditions de stockage (à l'abri de l'air, de lumière et les variations de température).

## 2.2. Propriétés biologiques

Plusieurs travaux scientifiques ont révélés les multiples propriétés biologiques des H.E. (Lin et al., 2012). Pibiri (2006), indique que la diversité des formes chimiques composant ces substances leur confère plusieurs propriétés biologiques, ils possèdent des propriétés antiseptiques leur permettant d'exercer des actions antibiotiques ou inhibitrices (Ben et al., 2015). Certaines H.E. possèdent des propriétés anti-inflammatoires conférées en particulier par les aldéhydes aromatiques tel l'exemple de l'aldéhyde *cuminique* du romarin ou le *Citronellol* de l'eucalyptus qui ont un pouvoir d'agir sur l'inflammation de l'épiderme causée par une blessure, une brûlure ou encore une piqûre d'insecte (Kim et al., 2003). Par ailleurs, plusieurs composants aromatiques ont des propriétés antalgiques, le menthol de la menthe poivrée calme les douleurs occasionnées par un traumatisme et agit sur les maux de tête (Lahrech, 2010).

## 3. Composition chimique et voie de biosynthèse

Les principaux composés proviennent principalement de trois voies de biosynthèse seulement, la voie mévalonate conduisant à sesquiterpènes, la voie méthyl-erithrytol menant aux mono- et diterpènes, et la voie de l'acide shikimique conduit vers le phénylpropène (Croteau et al., 2000). Néanmoins, il y a un nombre presque incalculable de substances simples et une variation considérable dans la composition des H.E. Elles sont de véritables concentrés de substances aromatiques puissantes et de principes actifs, pouvant concentrer jusqu'à 100 fois certains principes actifs de la plante fraîche (Wink, 2015). Leurs constituants appartiennent de façon, quasi exclusive, à deux familles chimiques (tab.01): les terpénoïdes (mono- et sesquiterpènes de faible poids moléculaire) et dans une moindre

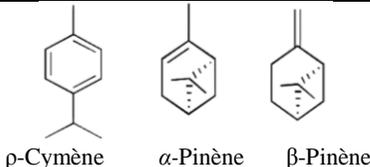
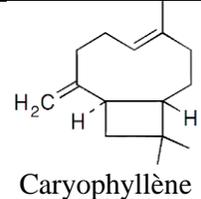
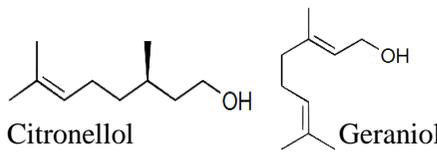
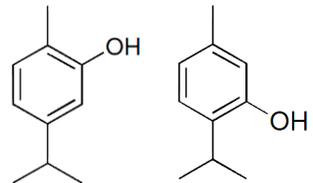
proportion, les phénylpropanoïdes (Raymond et Nicola, 2015). L'acide shikimique est une clé intermédiaire synthétique pour les plantes, car il est le précurseur clé tant pour les flavonoïdes et de la lignine. Il est synthétisé à partir phosphoénolpyruvate et l'érythrose 4-phosphate, donc sa biosynthèse commence à partir de la voie de glucides (Croteau et al., 2000). Ces mélanges naturels complexes, provenant du mévalonate et/ou du méthyl-erithrytol contiennent plusieurs composés avec des concentrations très différentes et généralement caractérisés par 2 ou 3 composés majoritaires à fortes concentrations (20-70%) déterminant les propriétés biologiques des H.E. (Bakkali et Idaomar, 2008).

**3.1. Les terpénoïdes** ou les terpènes  $R_1-HC=CH-R_2$  (Tab.01), constituent une famille de composés chimiques structurellement et fonctionnellement différentes, avec une particularité structurale de présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ).

La biosynthèse des terpènes consiste tout d'abord à la biosynthèse d'un précurseur IPP (*diphosphate d'isopentényle*). Grâce aux compartiments ; cytoplasme, mitochondries et plastes, la conversion de l'IPP se fait par une addition cumulative. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion sont hydrosolubles ou membranaires forme le *prenyldiphosphate*, précurseur des diverses classes de terpènes. En effet, ce dernier subit deux dernières modifications enzymatiques par la *terpène spécifique synthétase* et les *enzymes redox* pour acquérir les propriétés fonctionnelles des différents terpènes (Bakkali et Idaomar, 2008). Les divers squelettes terpéniques sont classés par le nombre de chaînons isopréniques en Monoterpènes ( $C_5 \times 2$ ), Sesquiterpènes ( $C_5 \times 3$ ), Diterpènes ( $C_5 \times 4$ ), Triterpènes [ $(C_5 \times 3) + (C_5 \times 3)$ ], Tétraterpènes [ $(C_5 \times 4) + (C_5 \times 4)$ ].

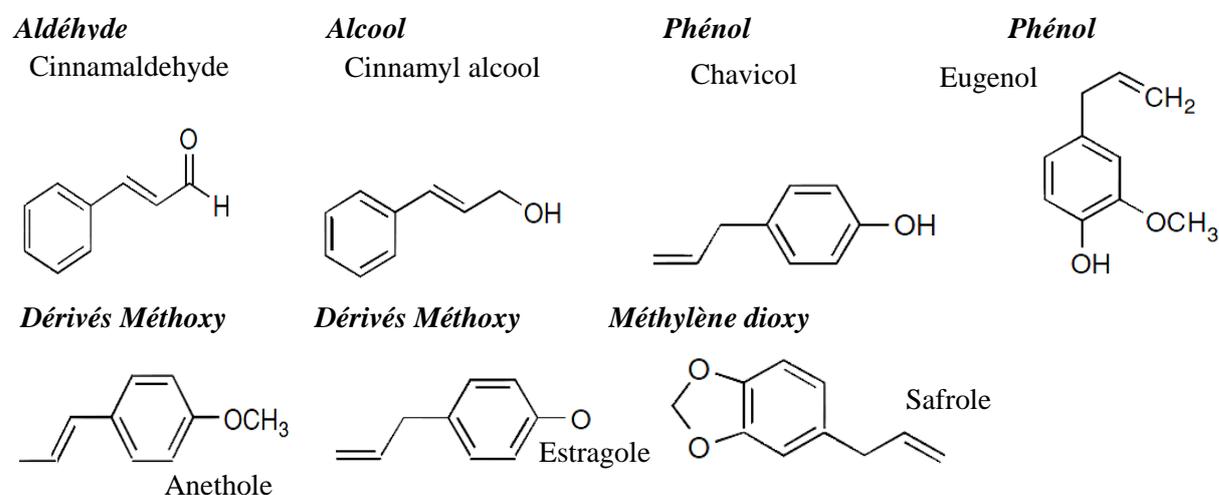
- **Les monoterpènes ( $C_{10}$ )**, ces composés sont presque toujours présents, à faible masse moléculaire (Croteau et al., 2000), formés par l'assemblage de deux unités d'isoprène ( $C_{10}$ ), ce sont les molécules les plus représentatifs (90%) des H.E., volatils, entraînés à la vapeur d'eau et renferment plusieurs structures (*acycliques, monocycliques ou bicycliques*) et plusieurs fonctions (Bakkali et Idaomar, 2008).

**Tableau 01** : Classification des principaux monoterpènes et sesquiterpènes selon leur structure chimique (Bakkali et Idaomar, 2008).

Cycle	Monoterpènes			Structure	Sesquiterpènes	Structure
	Acycliques	Monocycliques	Bicycliques			
Carbures	<i>myrcene, ocimene, etc</i>	<i>Terpinenes, p-cymene, phellandrenes, etc</i>	<i>pinenes, -3-carene, camphene, sabinene, etc</i>	 <p> <chem>CC1=CC=C(C)C=C1</chem>    <chem>CC1=C(C)CC2=C1C=C(C)C2</chem>    <chem>CC1=C(C)CC2=C1C=CC2</chem>            p-Cymène    α-Pinène    β-Pinène         </p>	<i>azulene, b-bisabolene, cadinenes, b-caryophyllene</i>	 <p>Caryophyllène</p>
Alcools	<i>geraniol, linalol, citronellol, lavandulol, nerol, etc.</i>	<i>menthol, a-terpineol, carveol</i>	<i>borneol, fenchol, chrysanthenol, thuyan-3-ol</i>	 <p> <chem>CC(=C)CC(C)CCO</chem>    <chem>CC(=C)CC(C)C=CCO</chem>            Citronellol    Geraniol         </p>	<i>bisabol, cedrol, b-nerolidol</i>	
Aldéhydes	<i>geranial, neral, citronellal, etc.</i>					
Cétones	<i>tegetone, etc</i>	<i>menthones, carvone, pulegone, piperitone,</i>	<i>camphor, fenchone, thuyone, ombellulone,</i>		<i>germacrone, nootkatone, b-vetinone, turmerones</i>	
Esters	<i>linalyl acetate or propionate, citronellyl acetate</i>	<i>menthyl or a-terpinyl acetate, etc</i>	<i>isobornyl acetate, etc</i>			
Epoxyde					<i>caryophyllene oxide, humulene epoxides, etc</i>	
Ethers		<i>1,8-cineole, menthofurane, et</i>				
Phénols		<i>Thymol, carvacrol, etc</i>		 <p> <chem>CC1=C(C)C=C(O)C=C1</chem>    <chem>CC1=CC=C(C)C(O)=C1</chem>            Thymol    Carvacrol         </p>		

**3.2. Les Sesquiterpènes (C<sub>15</sub>),** sont formés par l'assemblage de trois unités d'isoprènes (C<sub>5</sub>). L'extension de la chaîne carbonique accroît le nombre de cyclisations ce qui donne lieu à diverses structures ils sont dérivés du farnésyldiphosphate « FDP », et la diversité structurale de cette classe est plus grande que celle des monoterpènes (Cseke et al., 2006).

**3.3. Les composés aromatiques** sont dérivés du *phenylpropane* (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents. ils comprennent (fig. :02) : des « *Aldéhydes* » R-CHO : cinnamaldéhyde,..., des « *Alcool s* » R-OH : cinnamique alcool,..., des « *Phénols* » C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-OH: chavicol, eugénol,..., des « *Dérivés Méthoxy* »: anéthole, elemicine, estragol, Methyl Eugenol dioxy méthylène (Raymond et Nicola, 2015).



**Figure 02.** Exemple de structures chimiques de quelques composés aromatiques des HE (Bakkali et Idaomar, 2008).

#### 4. Synergie entre les composés des huiles essentielles

L'action des H.E. est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs qui reflètent très bien les propriétés biophysiques (fragrance, densité, texture, couleur et aussi la pénétration cellulaire) et biologiques des H.E. d'où ils sont isolés (Croteau et al., 2000). Toutefois, l'activité des H.E. est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'H.E. de composition semblable (Raymond et Nicola, 2015).

#### 5. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles

Azimova & Vinogradova, (2013) et Raymond & Nicola, (2015) évoquent que la composition chimique des H.E. est éminemment variable et que plusieurs facteurs influencent leurs profils phytochimiques qu'ils soient d'ordre naturel, d'origine intrinsèque

(génétique, localisation, maturité), d'ordre extrinsèque (sol, climat...) ou d'ordre technologique (modes d'exploitation du matériel végétal).

**Génétiques** : la composition en molécules allélochimiques varie d'une espèce à l'autre mais aussi, au sein d'une même espèce, en raison de l'existence de chimiotypes très fréquents chez les plantes à H.E.

- **Physiologiques** : le métabolisme secondaire de la plante n'est pas identique à tous les stades de son développement.
- **La partie de la plante** : Selon Ben et al., (2015), les différentes parties de la plante n'ont pas la même composition en H.E., polymorphisme phytochimique (Johnson et al., 2004). Cette forme de polymorphisme semble pas fréquemment se produire, les différences dans la composition entre les glandes sécrétrices d' H.E. sont plus souvent liées à l'âge des glandes (Grassi et al., 2004; Johnson et al., 2004;. Novak et al, 2006).
- **Pédologiques et climatiques** : ces paramètres influencent aussi directement le métabolisme secondaire de la plante (acidité du sol, chaleur, photopériode, hygrométrie, etc.). De même, les facteurs géographiques (altitude, latitude, etc.) sont autant de paramètres responsables de variations (Znini et al., 2012) ;
- **Technologique** : les différents procédés d'obtention des H.E. interfèrent sur les constituants extraits elles peuvent subir de profondes modifications lors de leur exploitation (Raymond et Nicola, 2015) : récolte, séchage et stockage du matériel végétal, hydrodistillation, conditionnement.

## 6. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les domaines d'application des H.E. diffèrent selon la plante d'origine et surtout de la structure végétale dont elles sont extraites (Bousbia, 2013). D'une manière générale, les essences extraites des racines sont reconnus pour leur action sur le système nerveux et celles extraites des graines et des fleurs pour leur impact sur l'ensemble de système digestif et celles issues des feuilles pour leurs bienfaits sur le système respiratoire et cardiaque (Chamorro et al., 2012). Par ailleurs, l'utilisation des H.E. en pharmacologie parviens face au problème soulevé par la résistance des bactéries et champignons aux antibiotiques de synthèse (Vadhana et al., 2015).

Dans l'industrie Agro-alimentaire une attention particulière est attribuée par le fait que les nombreuses propriétés naturelles des H.E. en font à la fois leur usage en tant qu'ingrédients nutraceutiques ou des agents de conservation très prometteurs aussi comme arômes alimentaires d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés « *généralement*

*reconnus comme sains* » (Zouari et al., 2011), aussi comme additifs alimentaires présentant une activité antioxydante en tant que conservateurs contre l'oxydation des matières grasses (Stefanovits et al., 2003). Pareil, pour l'industrie des biopesticides d'origine végétale dans la lutte intégrée comme insecticides affectant le cycle de reproduction chez plusieurs insectes nuisibles (Regnault-Roger, 2008).

## **7. Toxicité des huiles essentielles**

L'action de l'H.E. est assimilée à l'action de l'un de ses composants ou certains de ses composants, ainsi qu'aux métabolites issus des transformations lors de l'extraction de ces composés (Rialdi, 1993). Cependant les principes actifs des H.E. s'additionnent et leur assimilation totale par l'organisme nécessite un certain temps à respecter (Cseke et al., 2006). C'est par la synergie moléculaire des H.E. véritables, c'est-à-dire non reconstituées synthétiquement, que la toxicité de ces molécules s'avère toute relative car les effets des uns compensent et équilibrent les effets des autres (Wink, 2015). En effet, les phénols sont dermatotoxiques et hépatotoxiques. Elles brûlent la peau et détruisent les cellules hépatiques ; les *cétones* sont neurotoxiques et épileptisantes car elles détruisent les gaines de myéline (Rachid, 2013; Skandrani et al., 2009). Leur toxicité se manifeste par un effet cumulatif, elles sont abortives et très toxiques par voie orale (Skandrani et al., 2009).

## II. Composés phénoliques

### STRUCTURE, BIOSYNTHESE ET PROPRIETES

Les composés phénoliques sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus répandus dans la plante. Les polyphénols végétaux ont attiré une attention croissante en raison de leurs puissantes propriétés antioxydantes et leurs effets marqués dans la prévention de diverses maladies associées au stress oxydatif telles que le cancer (Carocho et Ferreira, 2013b). Cette vision donne un aperçu actualisé et complet sur l'extraction, la purification, l'analyse et la quantification ainsi que les propriétés biologiques de ces métabolites secondaires (Sarker et Nahar, 2009).

#### 1. Définition

Les composés phénoliques sont des molécules possédant un ou plusieurs noyaux aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (Quideau et al., 2011). Ils sont omniprésents dans tous les organes végétaux et font donc partie intégrante de l'alimentation humaine et en partie responsable des propriétés organoleptiques globales des aliments d'origine végétale (Shahidi et Ambigaipalan, 2015). Ils sont aussi des constituants importants des plantes médicinales.

#### 2. Rôle bioécologique des composés phénoliques

Selon plusieurs auteurs, les composés phénoliques sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou d'agression par des agents pathogènes, les parasites et les prédateurs (Wink, 2015). Ils participent activement aux interactions de la plante avec son environnement et ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés et un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Cseke et al., 2006).

#### 3. Structure chimique

L'appellation « *composés phénoliques* » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules issues du métabolisme secondaire et divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Quideau et al., 2011). Selon Liang & Fang, (2006); Merghem, Jay, Viricel, Bayet, & Voirin, (1995), les représentants les plus nombreux (*plus de 5 000 molécules isolées*) et les plus connus des polyphénols en sont les « *flavonoïdes* ». Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, tels que les acides phénoliques, tannins hydrolysables, coumarines, lignanes, quinones et autres phloroglucinols. Il est à

noter que certains composés appartenant à ces groupes chimiques ne comportent en fait aucun hydroxyle libre (Dias et al., 2016).

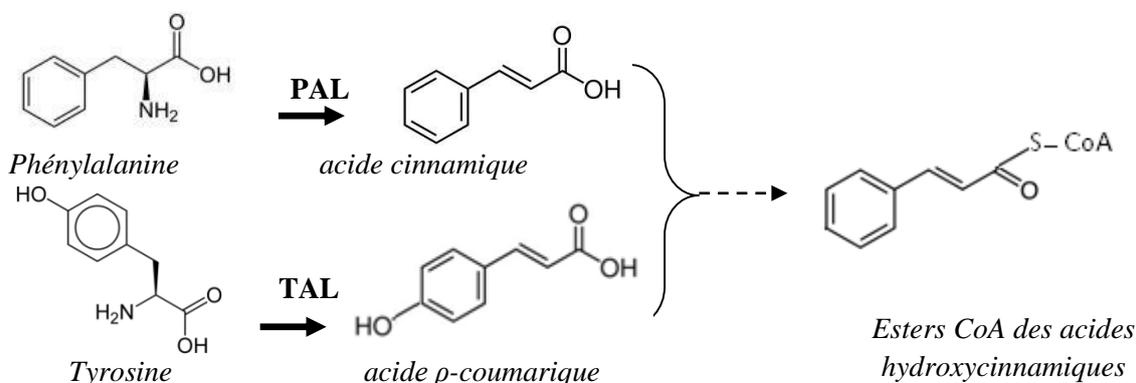
#### 4. Biosynthèse des composés phénoliques

Plusieurs approches ont été utilisées afin d'établir avec précision les grandes lignes du métabolisme phénolique et de montrer comment il est relié au métabolisme primaire (Harkati, 2011; Ozcan et al., 2014; Wink, 2015). Ces grandes lignes de biosynthèse des composés phénoliques sont maintenant bien connues.

Selon Inês et al., (2015); Quideau et al., 2011; Shahidi & Ambigaipalan, (2015), les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies de genèse :

- La voie la plus courante est celle qui, via le Shikimate (*l'acide shikimique*), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (*phénylalanine et tyrosine*) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines... ;

Les deux acides aminés aromatiques, *phénylalanine* et la *tyrosine*, sont alors à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux (Shahidi et Ambigaipalan, 2015). La désamination de la phénylalanine conduit à la formation de l'acide cinnamique, molécule non encore phénolique mais qui est directement à l'origine de la séquence biosynthétique généralement dénommée voie des *phénylpropanoïdes*, qui permet la formation des *acides hydroxycinnamiques* : acide *p-coumarique* (et ses isomères *o-* et *m-coumariques*), *caféique*, *férulique* et *sinapique* (Cavalcanti et al., 2013). L'acide *5-hydroxyférulique* est un intermédiaire fugace qui ne s'accumule pas chez les végétaux (Azimova et Vinogradova, 2013; Carocho et Ferreira, 2013a). Les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques sont leurs esters avec le *coenzyme A (CoA)* qui permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques, (fig.03).



**Figure 03:** la voie de biosynthèse des acides hydroxycinnamiques et de leurs esters avec le coenzyme A (CoA), (Raymond et Nicola, 2015).

- L'autre voie part de l'acétate et conduit à des poly- $\beta$ -cétosters de longueur variables -les polyacétates- qui engendrent, par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, despsides, depsidones, xanthones, quinones...etc , (Cseke et al., 2006; Quideau et al., 2011).

Le métabolisme générale de Phénylpropanoïdes dans la plante fournit une série d'acides hydroxycinnamiques (C6-C3) qui diffèrent les uns des autres par le nombre de groupes hydroxy et un groupe méthoxy des groupes sur leur unité de phényle (acide p-coumarique, l'acide férulique, l'acide sinapique, l'acide caféique). Ces acides monophénolique carboxylique sont souvent trouvés estérifiés aux polyols (Quideau et al., 2011).

## 5. Répartition cellulaire et tissulaire des composés phénoliques dans la plante

La biosynthèse des composés phénoliques dans les différents organes, leur utilisation et/ou leur dégradation, sont les paramètres qui déterminent leur niveau d'accumulation dans la plante (Azimova et Vinogradova, 2013; Quideau et al., 2011). Ces métabolites secondaires peuvent éventuellement se déplacer dans la plante, dans le cas des flavonoïdes la biosynthèse et l'accumulation ont lieu dans les mêmes cellules (Croteau et al., 2000; Saldanha et al., 2013).

Selon Zhang et al., (2013) et Liang & Fang, (2006), les composés phénoliques s'accumulent principalement au niveau de deux sites à savoir, la *paroi cellulaire* où sont présentes les lignines (et quelquefois certains flavonoïdes associées aux lignines comme l'acide férulique) et la *Vacuole* où sont stockés les phénols solubles (acides chlorogénique, anthocyanes, flavonols, tannins,...). Au niveau tissulaire une répartition inégale des composés phénoliques est également observée dans les différents tissus d'une plante (Taylor et al., 2005). Les *anthocyanes* et les pigments de type *flavonols* sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, les *esters hydroxycinnamiques* peuvent également être très inégalement répartis dans les différents tissus (Dias et al., 2016). Des différences très marquées existent également entre les différents organes d'une plante donnée, chacun d'entre eux (*feuille, fruit, graine, racine...*) pouvant souvent être caractérisé par son profil polyphénolique (Carvalho et al., 2013; Dias et al., 2016; Quideau et al., 2011).

## 6. Facteurs influençant la teneur des plantes en composés phénoliques

La teneur des végétaux en composés phénoliques est très variable en fonction de nombreux paramètres intra et extrinsèques ( Dai & Mumper, 2010; Liang & Fang, 2006).

### 6.1. Facteur intrinsèques,

En fonction du stade physiologique on marque des variations qualitatives et quantitatives très particulières de la teneur en polyphénols des plantes (Aminzadeh et al., 2010). A l'exception des *anthocyanes* et de quelques composés particuliers, les organes jeunes sont quelquefois plus riches en composés phénoliques que les organes âgés dont la teneur en ces composés à diminuer au cours de la croissance (*l'acide chlorogénique* des pommes, *l'acide caféoyltartrique* du raisin, les *tannins* de nombreux fruits...) (Guimarães et al., 2014; Quideau et al., 2011). Selon Ansari et al., 2013 et Quideau et al., 2011, ces variations des teneurs en composés phénoliques sont souvent considérables d'une espèce à l'autre et à l'intérieur même d'une espèce, selon les variétés ou cultivars considérés.

### 6.2. Facteurs extrinsèques

Certains facteurs externes comme la lumière et la température peuvent influencer nettement sur la teneur des plantes en polyphénols, en agissant sur leur métabolisme phénolique (Heleno et al., 2015b; Quideau et al., 2011). La lumière intervient d'une part par l'intensité du flux lumineux et les rayons lumineux agissent directement, par l'intermédiaire des radiations bleues et rouges et du pigment végétal phytochrome, sur l'induction de la biosynthèse de plusieurs enzymes du métabolisme phénolique et tout particulièrement de la *phénylalanine ammonialyase* (Cseke et al., 2006; Liang et Fang, 2006). De même, la température est également un facteur de régulation de l'expression du métabolisme phénolique. La régulation pourrait intervenir au niveau de la *phénylalanine ammonialyase* elle-même, des inhibiteurs de l'enzyme pouvant être mis en place sous l'effet des températures élevées (Croteau et al., 2000). Cependant, la contamination du végétal par des micro-organismes pathogènes entraîne également une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, correspondant à la mise en place de mécanismes de défense de la plante (Cushnie et Lamb, 2005; Parsaeimehr et al., 2010; Wink, 2015). Les traitements appliqués par l'homme sur la plante (traitement hormonaux, fertilisation, irradiations,...) peuvent moduler la teneur de la plante en composés phénoliques surtout lors de la croissance végétale (Cavalcanti et al., 2013; Dehak, 2013).

## 7. Formes chimiques et classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tab.02) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple  $C_6$  à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autre métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...). Cette classification permet alors de distinguer principalement deux grandes formes de composés phénoliques (simples et condensées).

### 7.1. Les formes simples

Ce sont les formes phénoliques qui présentent des structures chimiques allant du simple phénol en  $C_6$  (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en  $C_{15}$  et à des molécules proches (Cseke et al., 2006; Stalikas, 2010)

#### 7.1.1. Phénols simples

Selon Ozcan et al., (2014) et Stalikas, (2010), les phénols simples (*catéchol*, *guaiacol*, *phloroglucinol*, ...) sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (*Ericaceae*, *Rosaceae*...), le plus souvent à l'état de glucoside du diphérol (arbustoside) ou de son *monométhyléther*. Les *alkylphénols* et leurs depsides, issus du métabolisme d'un poly- $\beta$ -cétoester, sont caractéristiques des Lichens.

**Tableau 02:** Principales classes de composés phénoliques (Macheix et al., 1990)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
$C_6$	<i>Phénols simples</i>	Catéchol	Nombreuses espèces
$C_6-C_1$	<i>Acides hydroxybenzoïques</i>	$p$ -hydroxybenzoïque	Epice, fraise
$C_6-C_3$	<i>Acides hydroxycinnamiques</i>	Acide caféique	Pomme de terre, pomme,
	<i>coumarines</i>	Scopolétine	Citrus
$C_6-C_4$	<i>Naphtoquinones</i>	Juglone	Noix
$C_6-C_2-C_6$	<i>Stilbènes</i>	Resvératrol	Vigne
$C_6-C_3-C_6$	<i>Flavonoïdes</i>	Quercétine, Catéchine,	Fruits, légumes, fleurs,
	<i>Isoflavonoïdes</i>	cyanidine	soja, pois
		Daidzéine	
$(C_6-C_3)_2$	<i>Lignanes</i>	Pinorésnol	Pin
$(C_6-C_3)_n$	<i>Lignines</i>		Bois, fruits à noyau
$(C_6-C_3-C_6)_n$	<i>Tannins condensés</i>		Raisin, Kaki

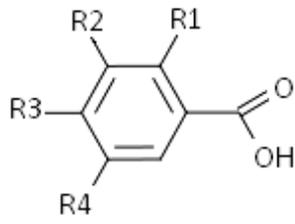
#### 7.1.2. Acides phénoliques

Une classe importante de composés phénoliques est les acides phénoliques (Santos-buelga et al., 2012). Ils décrivent en général, les phénols qui possèdent au moins une

fonctionnalité acide carboxylique. ils se réfèrent à un groupe distinct d'acides organiques qui contiennent deux cadres de carbone distinctifs: le hydroxybenzoïques et les structures hydroxycinnamiques (Tab 03). Tel le cas de l'acide chlorogénique (5-O-caféoylquinique acide) qui est l'acide caféique estérifié avec de l'acide quinique.

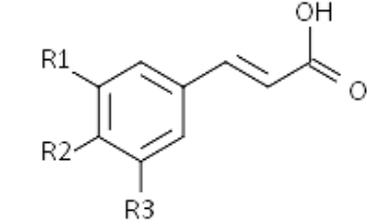
- **Les acides hydroxybenzoïques** (Tab. 03) sont des dérivés de l'acide benzoïque possédant une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) et existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (Sarker et Nahar, 2009; Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

**Tableau 03:** Représentation de quelques acides hydroxybenzoïques (Stalikas, 2010)

Structure générale	R1	R2	R3	R4	Nom
	H	H	H	H	Acide benzoïque (non phénolique)
	H	H	OH	H	Acide p-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatéchique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

- **Les acides hydroxycinnamiques** (Tab. 04) dérivent de l'acide cinnamique ils ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) et existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules (Santos-buelga et al., 2012).

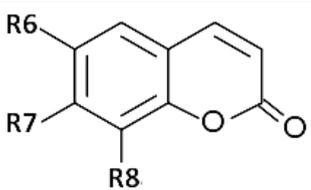
**Tableau 04:** Représentation de quelques acides hydroxycinnamiques (Santos-buelga et al., 2012)

Structure générale	R1	R2	R3	Nom
	H	H	H	Acide cinnamique (non phénolique)
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	Acide férulique
	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	Acide sinapique

### 7.1.3. Les Coumarines

Dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Tab. 05), ils ont fréquemment un rôle écologique et/ou biologique (Cseke et al., 2006).

**Tableau 05:** Représentation de quelques coumarines (Cseke et al., 2006)

Structure générale	R6	R7	R8	Nom
	H	OH	H	<i>Umbelliférol</i>
	OH	OH	H	<i>Aesculol</i>
	OCH3	OH	H	<i>Scopoléol</i>
	OCH3	OH	OH	<i>Fraxéol</i>
	H	OH	OH	<i>Daphnéol</i>

### 7.1.4. Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes (Sarker et Nahar, 2009). Ils ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C<sub>3</sub> en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Andersen et Markham, 2006). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> en formant une structure de type *diphényle propane* dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Andersen et Markham, 2006; Hussein et al., 1997; Saldanha et al., 2013).

## 7.1.4.1. Classification

Les principales classes des Flavonoïdes sont représentées dans le **tab. 06** ;

**Tableau 06** : Principales classes de Flavonoïdes (Santos-buelga et al., 2012)

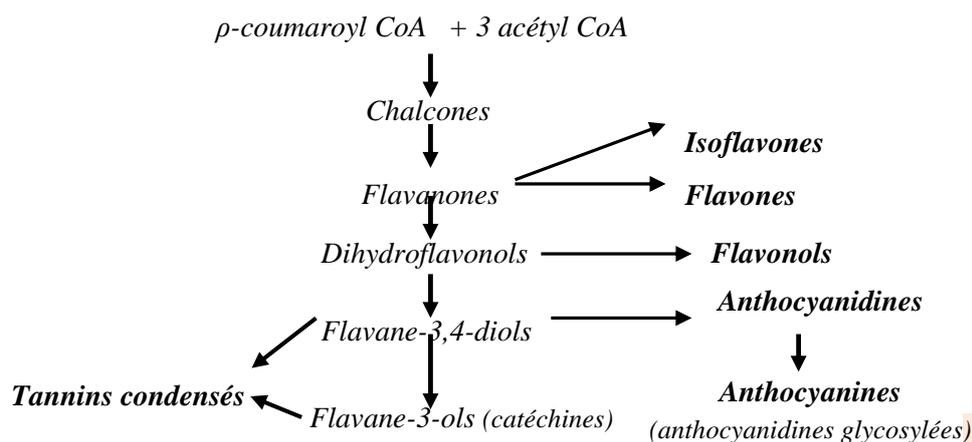
Classe	Structure générale	R3'	R4'	R5'	Nom
Flavones		H	OH	H	<i>Apigénine</i>
		OH	OH	H	<i>Lutéoline</i>
		OH	OCH <sub>3</sub>	H	<i>Diosmétine</i>
Flavonols		H	OH	OH	<i>Kaempférol</i>
		H	OCH <sub>3</sub>	OH	<i>Quercétine</i>
		OH	H	H	<i>Myrecétine</i>
Flavanols		OH	OH	H	<i>Catéchine</i>
Flavanones		H	OH	H	<i>Naringénine</i>
		OH	OH	H	<i>Eriodictyol</i>
Anthocyanidines		H	OH	H	<i>Pelargonidine</i>
		OH	OH	H	<i>Cyanidine</i>
		OH	OH	OH	<i>Delphénidine</i>
Isoflavones		R5	R7	R4'	<i>Genisteine</i>
		OH	OH	OH	<i>Daidezine</i>
		H	O-Glu	OH	

### 7.1.4.2. Localisation et répartition

Selon Sarker & Nahar, (2009), les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants. Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont généralement synthétisés et répartis en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement (Andersen et Markham, 2006). Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (Quideau et al., 2011).

### 7.1.4.3. Voie de biosynthèse des flavonoïdes

Le squelette moléculaire de base est une chalcone qui a une origine biosynthétique mixte : d'une part 3 molécules d'*acétyl CoA* (apporté sous forme de malonyl CoA) pour le cycle A et d'autre part une molécule de *p-coumaroyl CoA* pour le cycle B et l'hétérocycle C (Quideau et al., 2011). Chacune des deux voies (celle de l'*acétate* et celle de l'*acide shikimique*) conduisant, dans la molécule du flavonoïde final, à la formation d'un cycle benzénique plus ou moins hydroxylé (Andersen et Markham, 2006). Selon Quideau et al., (2011), à partir de la chalcone, la biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, méthylations, oxydations, réductions, glycosylations, etc.



**Figure 04 :** Les grandes lignes de la biosynthèse des principales classes de flavonoïdes (Dias et al., 2016).

### 7.2. Formes condensées

Ce sont les composés qui résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées. Selon la nature des constituants impliqués et

selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes pouvant encore présenter une hydrosolubilité ou un caractère lipophile (Makkar et al., 2007).

### 7.2.1. Les Tannins

Les tannins sont des polyphénols de structure complexe, à poids moléculaire s'étendent de 500 à 3000 (Quideau et al., 2011). Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (Peña-neira et al., 2009). Grâce aux différents groupes phénoliques. Ils peuvent se diviser en deux classes, les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Makkar, Siddhuraju, & Becke, 2007).

- **Tannins hydrolysables** peuvent être dégradé par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique, où ils libèrent une fraction non phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique d'où ils se partagent en deux sous-groupes qui sont les tannins galliques (galotannins) et les tannins ellagiques (elagitannins).
- **Tannins condensés** sont des oligomères ou des polymères de Flavane-3-ols (éventuellement de Flavane-3,4-diols) ; résistants à l'hydrolyse, mais non aux fortes attaques chimiques ;

## 8. Activité biologique des composés phénoliques

Les composés phénoliques ont toujours prouvé leur efficacité dans différents domaines, où on leur reconnaît des propriétés *antioxydantes*, *antimicrobiennes*, *anti-inflammatoires*, *antiallergiques* et *antitumorales* (Guimarães et al., 2014; Heleno et al., 2015b; Ozcan et al., 2014; Parsaeimehr et al., 2010).

### 8.1. Propriétés antiradicalaires et antioxydantes

Les composés phénoliques agissent principalement comme antioxydants primaires (Carocho et Ferreira, 2013a; Choe et al., 2012), ils sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux moins réactifs par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle (Ben Farhat et al., 2013). Selon Carocho & Ferreira, (2013a), ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénés réactives comme l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ) ou l'oxygène singulet et inhiber la lipoxygénase. Ils sont aussi de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique, ce qui est un élément important pour la protection des membranes

cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (Shahidi et Ambigaipalan, 2015). D'après, Carocho & Ferreira, (2013a); Catarino, Talhi, Rabahi, Silva, & Cardoso, (2016), la propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à :

- Une structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure) ;
- La double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire ;
- Les groupements hydroxyles libres en C<sub>3</sub> et C<sub>5</sub>.

### **8.2. Propriétés chélatrices des ions métalliques**

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu<sup>+2</sup> est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Carocho et Ferreira, 2013a). Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (Stalikas, 2010). La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux. Le site situé entre le groupe 3'OH et le groupe 4' OH du cycle B, celui entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C et entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C (Huang et al., 2005b).

### **8.3. Propriétés antimicrobiennes**

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (Estevinho et al., 2003). Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Wink, 2015).

### **8.4. Propriétés antictumorales**

Des recherches récentes démontrent que les composés phénoliques sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Carocho et Ferreira, 2013b). Toutefois d'autres études ont montré que certains flavonoïdes particulièrement ; *lutéoline*, *quercétine*, *kaempférol*, *apigénine*, *taxifoline* inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose (Chen et al., 2016; Rodrigues et al., 2012).

### III. Extraction et analyses des composés bioactifs

#### EXTRACTION, ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES METABOLITES SECONDAIRES

##### 1. Extraction des molécules volatiles

L'extraction des molécules aromatiques peut se faire par différents procédés, cette diversité de techniques est liée à la sensibilité de certains de leurs constituants qui peuvent être modifiés pendant les processus de préparation (Bousbia, 2013). De ce fait, le choix du procédé d'extraction varie selon plusieurs paramètres à savoir la nature de la matière première, la richesse en substances aromatiques, la fragilité et la sensibilité de certains constituants aux températures élevées et également l'action de l'eau et la solubilité dans les solvants organiques (Dehak, 2013). Cependant, il existe des techniques physiques et chimiques d'extraction (Sarker et Nahar, 2009).

##### 1.1. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Ces techniques suivent les principes physiques d'extraction solide-liquide en utilisant la chaleur et/ou la pression pour libérer les essences contenues dans les structures cellulaires plus ou moins accessibles (Hans-Jorg, 2011).

- 1.1.1. **Expression à froid** : cette méthode n'est applicable que pour les écorces fraîches très riches en H.E., comme celles des agrumes (Citron, orange, limette,...),
- 1.1.2. **L'entraînement à la vapeur** : appelée également « *distillation à la vapeur saturée* », cette technique ne met pas en contact direct l'eau et le végétal. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur une grille.
- 1.1.3. **Distillation à l'eau (hydrodistillation)** : C'est la méthode normée pour l'extraction des HE (AFNOR, 2002). C'est le procédé le plus utilisé pour extraire les H.E. et pouvoir les séparer à l'état pur, mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Ce procédé consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'H.E. sera alors séparée par différence de densité dans une ampoule à décanter (Holmes, 1992).
- 1.1.4. **Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide** : C'est une technique récente, rapide et économique qui consiste à extraire l'H.E. entraînée dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre au produit traité (Veillet et al., 2010). L'irradiation micro-onde des cellules, chauffe les traces d'eau contenues dans les

glandes, les vaporisent et sous la pression engendrée par la vapeur d'eau (Chemat et al., 2016).

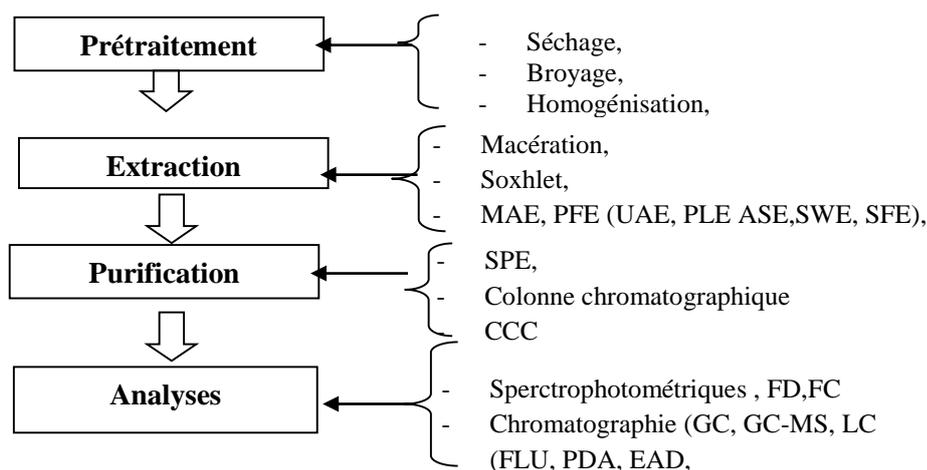
**1.1.5. Extraction au CO<sub>2</sub> liquide ou supercritique :** Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) comprimé sous pression (P<sub>C</sub>=73,82 bars) jusqu'à 300 fois la pression atmosphérique et à température modérée (environ 30°C). Dans ces conditions de T° et de P critiques ou supercritiques, le CO<sub>2</sub> présente un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les *HE*, les *arômes*, les *colorants naturels* (Sarker et Nahar, 2009).

## **2. Paramètres influents l'extraction des huiles essentielles**

De nombreux facteurs influencent l'extraction des HE dont principalement la durée de l'extraction qui dépend de la quantité de l'huile qu'on veut obtenir, elle est en fonction des tissus histologiques de biosynthèse et d'accumulation dans la plante (Bousbia, 2013). Par ailleurs, la température de distillation est liée à la solubilité et à l'évaporation de l'H.E. Plus la température de condensation augmente plus la solubilité des H.E. dans l'eau diminue suite à la diminution de sa densité, par conséquent sa séparation est meilleure (Dehak, 2013). Le temps d'extraction influe sur la quantité de distillat recueillie. La quantité de vapeur d'eau utilisée pour extraire l'huile influe également sur le rendement, elle est exprimée en Kg de vapeur/Kg d'HE (Croteau et al., 2000).

## **3. Extraction, caractérisation et dosage des composés phénoliques**

Grâce aux propriétés chimiques des composés phénoliques (présence de cycles benzéniques hydroxylés), les étapes de prétraitement, extraction, purification et analyses se basent sur le matériel végétal utilisé (Sarker et Nahar, 2009). La plupart des phénols simples ou complexes peuvent aisément être extraits avec des solvants de différentes polarités ou mélanges de solvants (Santos-buelga et al., 2012). Après évaporation sous vide du solvant, l'extrait global ainsi obtenu, est purifié afin d'obtenir la fraction phénolique pure (Vagiri et al., 2012).



**Figure 05.** Stratégies pour la préparation et la caractérisation des extraits phénoliques Abréviations : MAE, microwave-assisted extraction; UAE, ultrasound-assisted extraction; PFE, pressurized fluid extraction; PLE, pressurized liquid extraction; ASE, accelerated solvent extraction; SWE, subcritical water extraction; SFE, supercritical fluid extraction; SPE, solid phase extraction; CCC, countercurrent chromatography; FD, Folin- Denis test (FD), F-C, Folin-Ciocalteu test; GC, gas chromatography; LC, Liquid chromatography; FLU, fluorescence; PDA, photodiode array; EAD, electro-array detection; ECD, electrochemical detection; MS, mass spectrometric; NMR, nuclear magnetic resonance. (Dai et Mumper, 2010).

#### 4. L'extraction par les solvants organiques

Les deux aspects qui contrôlent le processus d'extraction par solvants sont l'état d'équilibre et le taux de transfert de masse (Sarker et Nahar, 2009). Les composés phénoliques procèdent à l'équilibre à partir d'une concentration qui peut se dissoudre dans le solvant. Le taux d'extraction peut être considérablement amélioré avec une augmentation du gradient de concentration, un coefficient de diffusion plus important, ou une taille des particules plus petites (Yang et al., 2015). Augmenter la température et la diminution du coefficient de viscosité augmente également les diffusivités (Taylor et al., 2005).

##### 4.1. Macération

Par extraction au solvant organique, le matériel végétal broyé est ajouté au solvant à faire varier solvant à divers rapports solide/liquide. Le mélange est ensuite constamment agité jusqu'à diffusion totale des molécules à extraire dans le solvant. Si une grande surface est présente, l'extraction se produit rapidement. Après un laps de temps approprié, le solvant est filtré de la suspension et l'extrait final est évaporé sous vide au moyen du rotavapor (Sarker et Nahar, 2009).

## **4.2. Extraction par fluides supercritiques**

Les fluides supercritiques remplacent de plus en plus les solvants organiques, par exemple le n-hexane, le chloroforme, le dichlorométhane ou le méthanol, qui sont classiquement utilisés dans les opérations d'extraction industrielle, de purification et de recristallisation en raison des pressions réglementaires et environnementales. Dans l'extraction et l'isolement des produits naturels, l'extraction de fluide supercritique (SFE), en particulier l'utilisation de CO<sub>2</sub> supercritique, est devenue un choix populaire. Les technologies modernes sophistiquées permettent une régulation précise des changements de température et de pression, et donc la manipulation de la propriété solvatante du SCF, qui aide à l'extraction de produits naturels d'une large gamme de polarités (Dai et Mumper, 2010).

## **4.3. Extraction par solvants accélérés**

L'extraction accélérée des solvants (ASE®), introduite en 1995, est une technique automatisée d'extraction rapide qui utilise des solvants communs à température et pression élevées, augmentant ainsi l'efficacité de l'extraction des composés organiques des matrices solides et semi-solides (Note, 2014). ASE® permet des extractions pour des échantillons de 1-100 g en minutes, réduit considérablement les utilisations de solvant et peut être appliqué à une large gamme de matrices, y compris des produits naturels (Sarker et Nahar, 2009).

# **5. Extraction assistée**

## **5.1. Par micro-ondes**

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) ou simplement l'extraction par micro-ondes est une technique d'extraction relativement nouvelle qui combine l'extraction par micro-ondes et par solvants traditionnels. Consiste à l'application de micro-ondes pour le chauffage des solvants et des tissus végétaux dans le processus d'extraction, qui augmente la cinétique d'extraction. Le MAE présente un certain nombre d'avantages (un temps d'extraction plus court, moins de solvant, un taux d'extraction plus élevé et un coût plus faible), par rapport au procédé traditionnel d'extraction de composés phénoliques provenant de diverses matrices (Santos-buelga et al., 2012).

## **5.2. Par ultrason**

Cette technique est utilisée pour induire une action mécanique par les ondes ultrasons sur les cellules induisant la production de cavitations dans l'échantillon. La dégradation cellulaire augmente la solubilisation des métabolites dans le solvant et améliore les rendements d'extraction. L'efficacité de l'extraction dépend de la fréquence de l'instrument, du temps d'action et de la température de sonication (Chemat et al., 2016).

## 6. Dosage et Caractérisation

Le dosage et la caractérisation des composés phénoliques nécessitent la complémentarité de plusieurs tests et techniques chimiques. Cependant, une estimation rapide et sur-évaluée de la teneur en phénols totaux peut être obtenue particulièrement par l'utilisation d'un mélange de *phosphomolybdate* et de *phosphotungstate* commercialisé sous la dénomination de réactif de Folin-Ciocalteu, ce réactif est réduit en un complexe coloré bleu que l'on peut doser par colorimétrie vers 720 nm (Dai et Mumper, 2010; Yang et al., 2015).

La séparation et le dosage des polyphénols se fait principalement par :

- Chromatographie sur papier, couches minces et colonnes pour une première approche qualitative ;
- Chromatographie liquide à haute performance (CLHP), électrophorèse capillaire, CLHP/UV, CLHP/SM (Matei et al., 2015);
- Détermination de la structure des composés phénoliques par les méthodes physico-chimiques modernes (différentes hydrolyses, SM, résonance magnétique nucléaire, ...),

### 6.1. Chromatographie

La chromatographie est l'une des méthodes les plus puissantes, largement utilisée pour une bonne séparation des mélanges. Selon Almela, Blas, Fern, Roca, & Rabe, (2006); Dai & Mumper, (2010); Terpin, (2016) le contenu en composés phénoliques dans des extraits biologiques peut être déterminé par diverses méthodes instrumentales d'analyse, telles que la chromatographie en phase gazeuse, la Chromatographie sur couche mince et l'électrophorèse capillaire. Cependant, la Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a révélé être la plus appropriée en raison de la similitude de structure et de la diversité des composés phénoliques, permettant l'analyse avec une précision suffisante, une bonne sélectivité et en délai raisonnable. L'HPLC a généralement un trait d'union avec les détecteurs aux ultraviolets-visibles (UV), réseau de photodiodes (DAD), la spectrométrie de masse (MS), électrochimique (ED), la fluorescence (FD), chimiluminescence (CL), l'indice de réfraction (RI), et diffusion de la lumière par évaporation (ELSD) cette technique a été la meilleure méthode de choix pour l'analyse de routine des composés phénoliques dans la plupart des études publiées jusqu'ici (Hajslova et al., 2011). La technique d'analyse à employer, ne dépend pas que de la composition prévue de l'échantillon et la désignation d'analyse, mais aussi certainement sur la disponibilité de l'instrument (Vagiri et al., 2012). Parmi tous les détecteurs couplés par HPLC pour la détermination des composés phénoliques, MS est le plus performant (Hajslova et al., 2011). En effet, un grand nombre

de documents précédents existait qui sont sur la détection de composé phénolique par HPLC par UV ou la détection de DAD, mais il est un universel phénomène qui est la longueur d'onde de détection non-uniformes adoptées pour déterminer la même ou similaire des composés phénoliques (Matei et al., 2015). En fait,, les longueurs d'onde de détection optimale pour la détermination de composés phénoliques par HPLC-DAD-UV doivent bien être fixées pour une quantification précise, en outre, ces longueurs d'ondes des composés phénoliques peuvent différer en raison de leurs groupes d'absorbance caractéristiques. Pour obtenir la teneur de chaque composé phénolique dans la matrice, la longueur d'onde de détection appropriée devrait être fixée pour chaque composé.

La chromatographie en phase Gazeuse (CPG) est une méthode appliquée afin de séparer les constituants d'un mélange, réservée à l'analyse de composés volatils et thermiquement stables. La technique de couplage CPG/SM permet une bonne identification des composés d'une huile essentielle, cette combinaison est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides (Sarker et Nahar, 2009), Grâce à laquelle on obtient un spectre de masse de chaque composé ainsi que sa masse et sa place dans le chromatogramme (Yang et al., 2015).

## **6.2. La résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN)**

La RMN permettait de contrôler la présence d'un composé préalablement identifié ou suspecté par une autre technique. L'informatisation de la recherche des structures à partir de bibliothèques de spectres a permis d'en faire une véritable méthode d'analyse appliquée à différentes familles de composés naturels (Saldanha et al., 2013; Yang et al., 2015). La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré pour être éventuellement soumis à d'autres analyses.

## Chapitre II

### Oxydation et antioxydants

#### MECANISMES, REACTIONS & ANTIOXYDANTS

L'oxydation est une des plus importantes manifestations à l'origine du vieillissement des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives des aliments affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur par des implications toxicologiques (Armstrong, 2010). Récemment de nombreux auteurs s'interrogent les mécanismes derrière le stress oxydatif (Carocho et Ferreira, 2013a; Huang et al., 2005a) et sur l'importance des composés antioxydants en effectuant un grand nombre de tests différents (Armstrong, 2010).

#### 1. Oxydation des aliments

Selon Cillard et *al.*, (2006), l'oxydation alimentaire est une réaction d'altération qui touche la majorité des aliments, sous l'action du dioxygène (essentiellement celui de l'air). En effet elle touche principalement les lipides insaturés lors de la préparation et de la conservation des produits dans l'agro-alimentaire, la pharmacologie et la cosmétologie. Il existe plusieurs types d'oxydations qui mettent en œuvre des mécanismes réactionnels très différents, aboutissant au rancissement oxydatif ou hydrolytique (Carocho et Ferreira, 2013a). Trois grands types de nutriments font une cible de l'oxydation alimentaire ; les *lipides* par l'auto-oxydation et la photo-oxydation ; les *glucides (simples et complexes)* ; les protéines dont l'oxydation est déclenchée suite à la formation en chaîne des radicaux libres notamment lors de la lipolyse (Armstrong, 2010).

#### 2. Causes et conditions de l'oxydation

Selon Halliwell, (1993), le déclenchement de l'oxydation des aliments et en particulier celle des lipides est peut être dû à plusieurs facteurs intra et intrinsèques, les facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des lipides (*nombre et position des insaturations*), la présence de pro-oxydants (*ions métalliques, enzymes*), les formes activées de l'oxygène (*radicaux libres, espèces oxygénées réactives,...*) ou d'antioxydants naturels (*tocophérols, caroténoïdes...*) et aussi les facteurs externes tels que la *température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de transformation*.

### 3. Oxydation des lipides

L'oxydation est une cause majeure de la dégradation des aliments lipidiques lors de leur fabrication et de leur conservation. Elle affecte les acides gras insaturés présents dans les huiles, les graisses ou les lipides de structure (Gutteridge, 1995). La présence dans les aliments des Acides gras polyinsaturés (AGPI) particulièrement sensibles à l'oxydation pose le problème de la maîtrise de la stabilité de tels systèmes (Halliwell, 2007). La conséquence la plus perceptible de l'oxydation des lipides est l'apparition d'odeurs et de saveurs désagréables souvent qualifiées de rance (Halliwell, 1993).

### 4. Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

Selon, Eymard (2003), l'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- **L'auto-oxydation** catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ;
- **La photo-oxydation**, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs ;
- **L'oxydation enzymatique** initiée par la lipoxygénase.

#### 4.1. Auto-oxydation

L'autooxydation est une réaction directe de l'oxygène moléculaire avec des composés organiques (Cillard, Cillard, Cormier & Girre, 1980). L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (Fig.06). Une première réaction produit un radical libre par élimination d'un hydrogène de l'acide gras (*initiation*). Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (*propagation*) qui se combinent pour former des composés non radicalaires (*terminaison*), (Eymard, 2003).

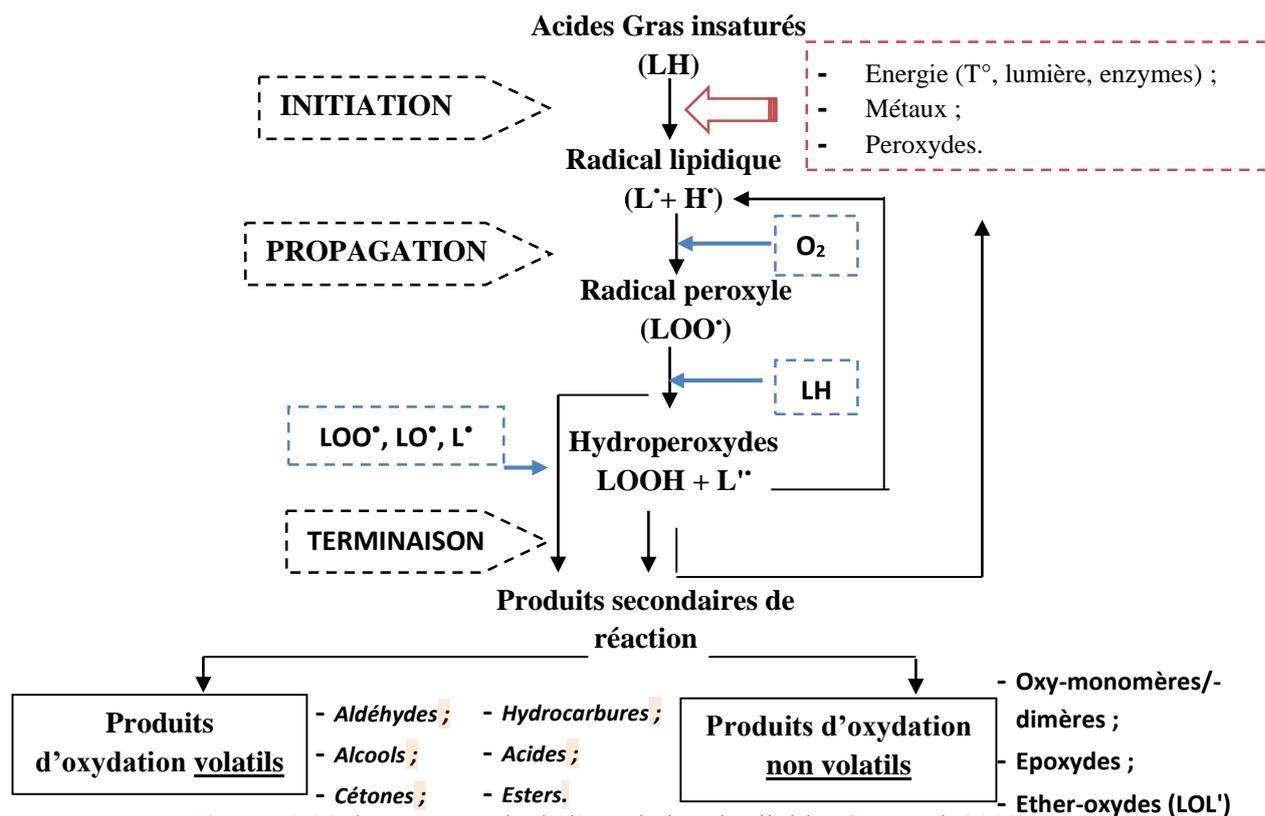
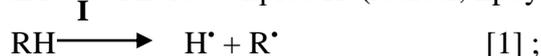


Figure. 06 Schéma générale de l'oxydation des lipides (Eymard, 2003).

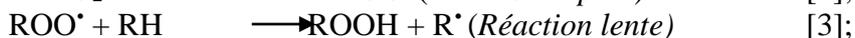
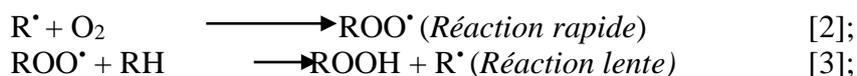
Ont décrit les mécanismes réactionnels de l'oxydation des lipides comme suit :

- a) **L'initiation** : En présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre de lipide R• (radical, lipoyle).



Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être produit par des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, ou de traces métalliques.

- b) **Propagation** : Les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables (2) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes (3).



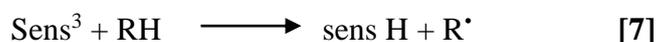
- c) **Terminaison** : Les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical libre.



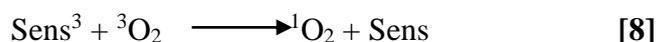


#### 4.2.Photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie importante de production d'*hydroperoxydes* en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines ou la riboflavine (Halliwell, 2007). Les photosensibilisateurs (Sens) absorbent l'énergie lumineuse et passent à l'état triplet excité (Sens<sup>3</sup>). Ils interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes. Ceux de type I, telle que la *riboflavine*, agissent comme les radicaux libres initiateurs. Dans leur état triplet, elles arrachent un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène (7).



Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité (Sens<sup>3</sup>) avec l'oxygène triplet (8) auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>).



L'oxygène singulet ainsi formée est très électrophile et peut réagir directement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde ROOH (9).



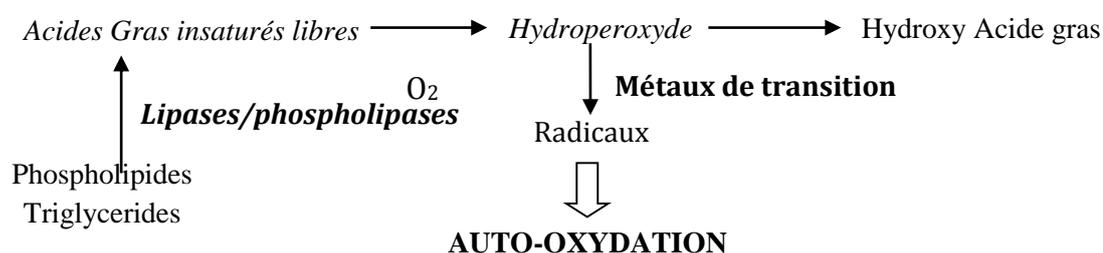
Par la suite interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto-oxydation. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par auto-oxydation (Frankel, 1993).

#### 4.3.Oxydation enzymatique

L'oxydation enzymatique (Fig 07) des lipides contenant une structure 1 cis -4 cis pentadéinique liée à la présence de lipoxygénase (Joung, Nihei, & Kubo, 2004). Deux enzymes sont principalement impliquées dans les phénomènes d'oxydation :

- **La lipoxygénase** qui canalise l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé pour former des hydroperoxydes, son activité est souvent couplée avec celle de la lipase et la phospholipase;

- **La cyclooxygénase** est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques.



**Figure. 07** Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique (Carocho et Ferreira, 2013a)

## 5. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est une rupture d'équilibre entre la génération des EOR et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Il est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement (Carocho et Ferreira, 2013a; Hennebelle et al., 2004). Les principaux agents oxydants sont les *espèces réactives de l'oxygène* ( $O_2^-$ ,  $O_2$ ,  $HO\cdot$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO\cdot$ ), des *enzymes* (lipoxygénase, peroxydases), des *ions métalliques* (Cu, Fe) et les *peroxydes lipidiques*, qui concourent tous à la formation en chaîne de radicaux libres (Halliwell, 2007).

### 5.1. Les espèces oxygénées réactifs

L'appellation « *dérivés réactifs de l'oxygène* » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit [radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ), monoxyde d'azote ( $NO\cdot$ ),...], mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante [peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), peroxydite ( $ONOO^-$ )]. Les ERO sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance.

### 5.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié sur l'atome d'oxygène (Armstrong, 2010). Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux (Rahman, 2007 ; Halliwell, 1990). Les radicaux libres sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron

nécessaire pour acquérir de la stabilité. Une «réaction en chaîne» débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui «volant» son électron, et «la molécule attaquée» devient alors elle-même un radical libre (Carocho et Ferreira, 2013a).

### 5.2.1. Origine des radicaux libres

Selon, Rahman, (2007) , l'O<sub>2</sub> est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons (fig.08) pour être partiellement réduit en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puis en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS), (Carocho et Ferreira, 2013a).

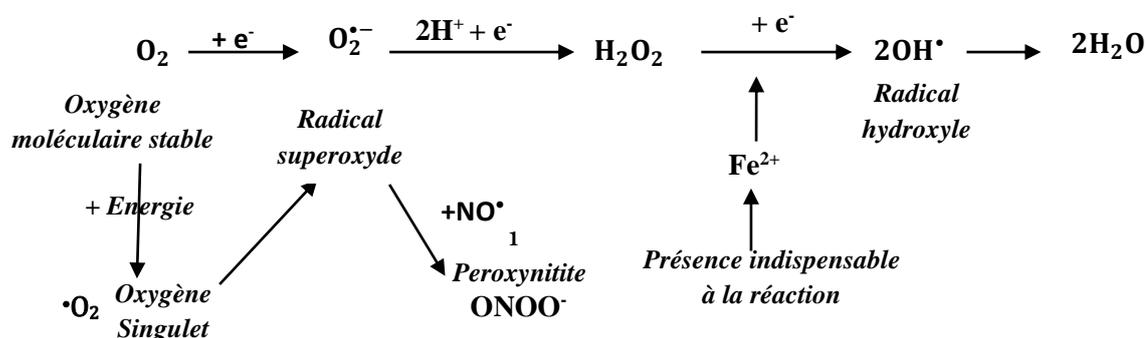


Figure. 08 Origine des radicaux libres, (Carocho et Ferreira, 2013a)

### 5.2.2. Dérivés oxygénés non radicalaires

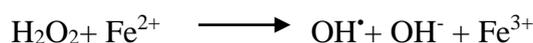
#### ○ Oxygène singulet (•O<sub>2</sub>)

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules (Delattre et al., 2005). Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :

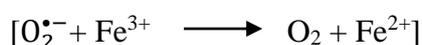


#### ○ Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. Selon la réaction de Fenton, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>), en un ion OH<sup>-</sup> et un radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>).



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) qui régénère Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> selon la réaction d'Haber-Weiss



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et de fer permet la production de radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ).

## 6. Les antioxydants

Une définition large du terme antioxydant donnée par Halliwell & Gutteridge (1995), est « *toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat* ». Toutefois, les antioxydants sont des composés, naturels ou ajoutés, qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation et apparaissent ainsi comme essentiels pour maintenir la qualité des aliments riches en lipides et les protéger des oxydations (Macheix et al., 2005).

### 6.1. Critères d'un bon antioxydant

Selon Macheix et al., (2005), un bon antioxydant doit présenter plusieurs propriétés à savoir, l'efficacité à faible concentration, la compatibilité physique et chimique avec le substrat qu'il est censé protéger. L'absence de toxicité et de qualités sensorielles propres (ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirables) et doit être résistant aux processus technologiques. Cependant, un nombre élevé de d'antioxydants répond à ces exigences tel que : Les *caroténoïdes*, *acide ascorbique*, *Glutathion*, de nombreux *composés phénoliques* naturels ou issus de la synthèse chimique (Carocho et Ferreira, 2013a; Huang et al., 2005b).

### 6.2. Classification des antioxydants

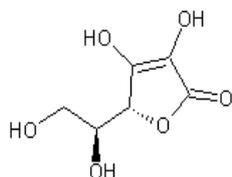
Selon Rahman, (2007), les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être répartis en deux grands types : les antioxydants préventifs qui empêchent la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou interceptent les espèces responsables de l'initiation de la lipoperoxydation et les antioxydants « *Chain breaking* » qui interceptent les radicaux propagateurs de la peroxydation lipidique et retardent la peroxydation (période d'induction). Généralement on classe les antioxydants en trois classes selon leur origine (naturelle, de synthèse ou biologique).

#### 6.2.1. Antioxydants naturels

Le groupe le plus important d'antioxydants naturels comprend la vitamine E (tocophérol), les flavonoïdes et autres composés végétaux (Halliwell, 1990 ; Basanta, Marin, & Leo, 2016 ; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

- **Acide ascorbique** : L'acide ascorbique (fig.09) ou *vitamine C* c'est un élément essentiel pour l'homme (Cossio et al., 2014). Elle exerce diverses activités biologiques, notamment comme co-substrat de plusieurs oxygénases et d'oxydases, c'est aussi un

important antioxydant hydrosoluble capable d'interagir avec plusieurs dérivés de l'oxygène comme  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot O_2$ ,  $NO\cdot$  et  $\cdot OH$  (Barros et al., 2007).



**Figure. 09** Structure chimique de l'acide ascorbique.

○ **La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) :** Le terme « *vitamine E* » constitue en fait un nom générique pour 8 composés proches, soit 4 tocophérols et 4 tocotriénols, qui possèdent à des degrés divers une activité vitaminique du même type : il s'agit en fait de dérivés ayant un cycle chromane et soit une chaîne latérale saturée de type phytyle pour les tocophérols, soit une chaîne latérale possédant 3 insaturations pour les tocotriénols (Reis et al., 2011).

○ **Les antioxydants phénoliques :** Les composés phénoliques ont la particularité de posséder plusieurs groupements hydroxyles greffés sur un noyau benzénique qui sont responsable de leur pouvoir antioxydant (Quideau et al., 2011). En effet, cette particularité structurale donne à la fonction phénol un caractère plus acide que les autres groupements alcools : elle perd facilement un proton  $H^+$  pour former l'ion *phénoxy*. La perte d'un hydrogène : Proton + électron engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie (Carocho et Ferreira, 2013a; Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

○ **Les flavonoïdes :** Comme il a été évoqué dans la partie consacrée aux composés phénoliques que beaucoup de flavonoïdes ont une bonne activité antioxydante, due principalement à la configuration catéchol du noyau B. Cette activité s'exerce surtout dans les milieux émulsionnés car ils sont peu solubles dans les phases lipidiques. En effet les différents mécanismes d'action des flavonoïdes mènent principalement à la réduction voir l'inhibition totale des réactions de l'oxydation des aliments notamment la peroxydation et la lipoperoxydation (Andersen et Markham, 2006).

○ **Les caroténoïdes :** Les caroténoïdes sont un groupe de plusieurs centaines de substances naturelles jouant le rôle de pigments de couleurs jaune à rouge dans beaucoup de fruits et de légumes. Leur structure de base comprend toujours un ensemble de doubles liaisons conjuguées, responsables de la couleur caractéristique (*lycopène, xanthophiles, lutéine, zeaxanthine, ...*), (Barros et al., 2007; Pisoschi et al., 2009).

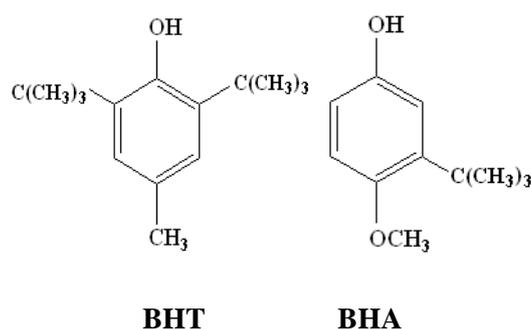
○ **Les huiles essentielles** : L'activité antioxydante d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants (Wannes et al., 2010). Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont principalement liées au noyau aromatique de certains de leurs composés (monophénols) tel que, le *Thymol*, *carvacrol*, *eugénol*, *isoeugénol*, *gingérol*.... Makkar et al., (2007), ont également rapporté que les activités antioxydantes sont dues à la présence de composés qui comportent le groupement hydroxyle.

### 6.2.2. Antioxydants de synthèse

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années (Huang et al., 2005a). Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire (Shahidi et Ambigaipalan, 2015), comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ).

○ **Le *Butylhydroxytoluène* (BHT) et le *Butylhydroxyanisole* (BHA)**

Le BHT (*Butylhydroxytoluène* ou E321) est un monophénol de synthèse très utilisé industriellement comme antioxydant. Ce composé est un mélange de 2,6 et 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène. De même le BHA (*Butylhydroxyanisole* ou E320) fait partie du groupe des monophénols de synthèse, il est obtenu à partir d'un mélange de deux isomères en proportions égales : 3-tert-butyl-4-hydroxytoluène (Huang et al., 2005a).

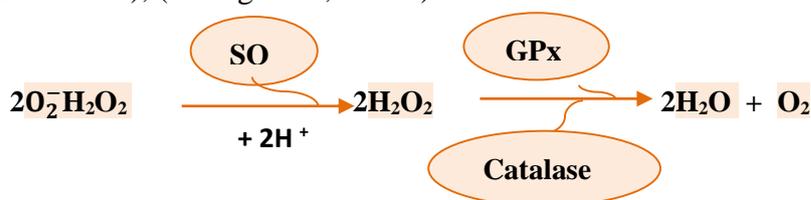


**Figure. 10** Structure chimique du *Butylhydroxytoluène* et du *Butylhydroxyanisole*

### 6.2.3. Antioxydants enzymatiques

○ **SOD La superoxyde dismutase et la Catalase** : Les *superoxydes dismutases* (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en molécules de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Selon Menvielle-bourg, (2005), cette enzyme inactive l'ion superoxyde (point de départ de la chaîne de production des radicaux libres) en le transformant en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Celui-ci est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène ( $\text{O}_2$ ) et en molécules d'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ), (Fig.11). La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (fig.11).

○ **Glutathion peroxydase (GSH Px)** : La GPx est une enzyme capable de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et autres hydroperoxydes d'origine lipidique (Armstrong, 2010) en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (*Glutathion*), (Huang et al., 2005b).



**Figure. 11** Rôle des enzymes antioxydantes dans le processus d'inactivation de l'ion superoxyde

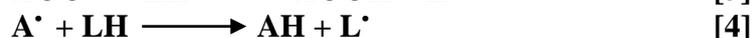
## 7. Mécanismes d'action des antioxydants phénoliques

D'après Huang et al., (2017), les antioxydants s'utilisent pour réduire ou inhiber l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés et l'effet des antioxydants provient de plusieurs mécanismes : Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. Inactivent les enzymes de peroxydation et abaissent la pression partielle en oxygène et procèdent à la chélation des métaux de transition, ils désactivent les espèces oxygénées réactives et détruisent les hydroperoxydes (Hennebelle et al., 2004).

Grâce aux propriétés précédentes, les composés phénoliques peuvent céder un hydrogène aux peroxydes lipidiques  $\text{LOO}^\bullet$  pour les stabiliser sous forme d'hydroperoxydes  $\text{LOOH}$  et bloquer les réactions de propagation de la chaîne d'oxydation (Dai et Mumper, 2010; Huang et al., 2005a).



La délocalisation de l'électron non apparié sur le cycle aromatique et l'absence de site d'attaque de l'oxygène empêchent la propagation de nouvelles réactions radicalaires car les étapes suivantes ne sont pas favorisées :



Les antioxydants sous forme  $A^{\bullet}$  peuvent également freiner la phase de propagation en formant un produit d'addition chimiquement stable (adduit) avec les radicaux lipidiques formés.



L'action de l'antioxydant se traduit par un allongement de la phase d'initiation et un retard du démarrage de l'oxydation. Cet effet est limité dans le temps puisque l'antioxydant est progressivement consommé. Les réactions d'oxydation reprennent ensuite, souvent avec la même vitesse qu'en absence d'antioxydant (Huang et al., 2005b). Tous les composés phénoliques n'ont pas la même efficacité antioxydante. En effet l'activité antioxydante est d'autant plus élevée que les composés phénoliques possèdent un potentiel redox faible (Carocho et Ferreira, 2013a).

Les polyphénols peuvent aussi inhiber les oxydations de façon indirecte, en désactivant l'oxygène singulet ou en chélatant les métaux de transition ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ ) qui accélèrent fortement l'auto-oxydation des lipides. Certains enfin sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation, en particulier la lipoxigénase ou de la cyclo-oxygénase (Joung, Nihei, & Kubo, 2004).

## 8. Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant

La mesure du potentiel antioxydant et le suivi des processus d'oxydation sont abordés globalement en déterminant des produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels.

**8.1. L'analyse sensorielle :** l'évaluation sensorielle du niveau d'oxydation est souvent considérée comme une bonne méthode d'évaluation par une modification de l'odeur ou de l'arôme du produit. De nouvelles notes odorantes apparaissent parmi lesquelles les odeurs qualifiées de rance (Huang et al., 2005b).

**8.2. Indice de peroxyde :** C'est le nombre de milliéquivalents d'oxygène contenus dans un kilogramme de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode.

- 8.3. Mesure de l'oxygène absorbé :** Cette méthode permet de suivre simultanément le cours de l'oxydation et de mesurer l'indice d'oxydation de l'huile traitée. L'oxygène absorbé est mesuré par des méthodes volumétriques ou électrochimiques (Rahmani, 2007).
- 8.4. Test Swift ou AOM :** Il est surtout appliqué pour les graisses animales. Dans sa version initiale, ce test consiste à oxyder par l'air, la matière grasse maintenue à 98°C. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par la mesure de l'indice de peroxyde en fonction du temps. Cette façon de faire est assez complexe et peu reproductible (Rahmani, 2007). Le temps (heures) nécessaire à la décoloration de l'indicateur coloré, encore appelé « *temps de Swift* » mesure la résistance de la matière grasse à l'oxydation.
- 8.5. Méthode à l'étuve ou test Shaal :** Ce test consiste à oxyder la matière grasse dans une étuve éclairée à 60°C. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par la mesure de l'indice de peroxyde sur des prélèvements faits toutes les 4,8, ou 24h.
- 8.6. Indice TBA :IUPAC 2.531,** le test de l'acide thiobarbiturique qui réagit avec les produits de l'oxydation en donnant un pigment qui absorbe à 532 nm.
- 8.7. Indice de p-anisidine :(IpA) – IUPAC 2.504,** les composés aldéhydiques  $\alpha$ -insaturés oxydés réagissent avec la p-anisidine pour former un complexe coloré qui absorbe à 530 nm ; ce test est souvent associé à l'indice de peroxyde.
- 8.8. Le Rancimat :** Ce test consiste à mesurer la dégradation d'un corps gras face à une auto oxydation accélérée, dans un appareil automatisé qui chauffe les solutions à 100°C avec un apport d'air constant de 20 L.h<sup>-1</sup>. Cet appareil détecte les composés volatils libérés, indiquant indirectement le degré d'oxydation des huiles.
- 8.9. Mesure du pouvoir de piégeage des radicaux libres :** une évaluation par le piégeage des radicaux libres synthétiques dans un solvant organique polaire est possible. Ces radicaux incluent le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl DPPH et le radical cation 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate) ABTS (Huang et al., 2005b).

## **9. Facteurs influençant l'oxydation des lipides**

### **9.1. Facteurs intrinsèques**

- *Composition en acides gras :* les acides gras insaturés et libre sont plus sensible a l'oxydation que les acides gras saturés et estérifiés (Guimarães et al., 2014).

- *Pro-oxydants* : la présence des métaux ou enzymes peut favorise l'oxydation des lipides, comme lipoxygénase, enzymes peut catalyser l'oxydation. quant aux métaux, il son des initiateurs puissant de l'oxydation (Carocho et Ferreira, 2013a).

### **9.2.Facteurs extrinsèque**

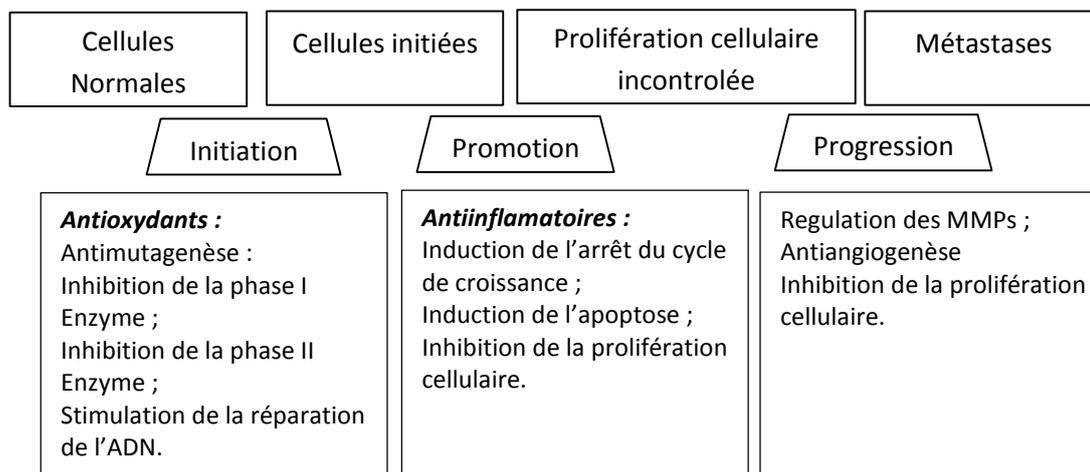
- *La teneur en oxygène* (pression partielle en oxygène) : il a un rôle prépondérant car la molécule initier la réaction et influence la vitesse de l'oxydation
- *Activité de l'eau ( $A_w$ )* : La teneur en eau des aliments joue également un rôle important dans l'intensité d'oxydation des lipides (Hennebelle et al., 2004). l' $A_w$  est le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau d'un produit sur la pression partielle de vapeur d'eau saturante exercée par l'eau pure à la même température.
- *La température* : Une élévation de la température favorise l'oxydation des lipides, a températures élevée les réactions d'oxydation s'accélèrent et donnent des réactions secondaires plus variées (Sousa et al., 2008).
- *Le potentiel hydroxyle ( $pH$ )* : influe sur le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes, un pH acide favorise la réaction de l'oxydation.

## Chapitre III

### Activité antitumorale

#### POTENTIEL ET MECANISMES D'ACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES

Le développement du cancer est un processus à plusieurs étapes qui implique une série d'étapes individuelles, y compris l'initiation, la promotion, la progression, l'invasion et la métastase. L'initiation tumorale commence lorsque l'ADN, dans une cellule ou une population de cellules, est endommagé par l'exposition à des agents cancérigènes, qui proviennent de trois sources majeures: la cigarette, l'infection / inflammation et la nutrition / alimentation (Carocho et Ferreira, 2013b).



**Figure 12.** Mécanismes anticancéreux potentiels des composés phénoliques des plantes au cours du développement du cancer (Dai et Mumper, 2010).

#### 1. Les composés phénoliques naturels et le cancer

Le cancer est une maladie à plusieurs étapes intégrant des facteurs environnementaux, chimiques, physiques, métaboliques et génétiques qui jouent un rôle direct et / ou indirect dans l'induction et la détérioration des cancers (Dai et Mumper, 2010). Des preuves épidémiologiques solides et cohérentes indiquent qu'un régime alimentaire avec une consommation élevée de fruits et de légumes riches en antioxydants réduit considérablement le risque de nombreux cancers (Ozcan et al., 2014), suggérant que certains antioxydants alimentaires pourraient être des agents efficaces pour prévenir l'incidence et la mortalité du cancer (Shahidi et Ambigaipalan, 2015). Les composés

phénoliques constituent l'un des plus nombreux et omniprésents groupes de métabolites végétaux et font partie intégrante de l'alimentation humaine (Shahidi et Ambigaipalan, 2015). On a constaté qu'en plus de leur activité antioxydante primaire, ce groupe de composés présente une grande variété de fonctions biologiques qui sont principalement liées à la modulation de la carcinogenèse (Carocho et Ferreira, 2013b). Divers systèmes *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés pour déterminer le potentiel anticancérogène et anticancéreux de ces composés ou extraits phénoliques naturels.

### **1.1.Effets *in vitro* des composés phénoliques**

Des extraits phénoliques ou des polyphénols isolés provenant de différents aliments végétaux ont été étudiés dans un certain nombre de lignées cellulaires cancéreuses représentant différents stades évolutifs du cancer (Fadeyi et al., 2013; Nikolic et al., 2014; Son et Anh, 2013). Par exemple, on a montré que des extraits de baies préparés à partir de mûres, de framboises, de myrtilles, de canneberges, de fraises et de polyphénols isolés à partir de fraises incluant les anthocyanes, le kaempferol, la quercétine, les esters d'acide coumarique et l'acide ellagique inhibaient la croissance du carcinome de l'oral humain (KB, CAL -27), les lignées tumorales de la colonne pré-natale (MCF-7), du côlon (HT-29, HCT-116) et de la prostate (LNCaP, DU-145) de manière dose-dépendante avec une sensibilité différente entre les lignées cellulaires (Dai et Mumper, 2010). Ross et al., (2007) a montré que l'activité antiproliférative de l'extrait de framboise dans les cellules du cancer cervical humain (Hela) était principalement associée aux ellagitannines. En comparant la diversité phytochimique des extraits de baies avec leur efficacité antiproliférative, McDougall et al., (2008) ont suggéré que le composant clé qui était lié à l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses pourrait être des ellagitannins de la famille Rubus (framboise, ronce arctique et nuages) et fraises, alors que l'activité antiproliférative de la lingonberry était principalement provoquée par les procyanidines. Des résultats similaires ont également été rapportés dans plusieurs extraits de thé et polyphénols de thé vert majeur (épicatéchine, épigallocatechine, épicatechine-3-gallate et épigallocatechine -gallate) (Zhang, Miura, & Yagasaki, 1999) bien que les concentrations efficaces dépendent du système et des substances testées. D'autres extraits ou composés phénoliques sont intensément étudiés à partir d'olives, de légumineuses, d'agrumes, de pommes et aussi de curcumine provenant du curcuma épice. Les flavonoïdes citrus inhibent fortement la croissance des cellules de leucémie HL-60 (Manthey, Grohmann, & Guthrie, 2001).

McCann et al., (2007) Ont utilisé des modèles cellulaires établis: la génotoxicité (HT-29), l'invasion et le potentiel métastatique (HT-115) et la fonction de barrière colique (CaCo-2) pour examiner l'effet de l'extrait phénolique de la pomme sur les stades clés de la carcinogenèse colorectale et l'extrait de pomme trouvé exercer des effets bénéfiques sur les trois stades de la carcinogénèse.

### **1.2.Effets In vivo des composés phénoliques**

En plus des études in vitro sur les lignées cellulaires cancéreuses, de nombreuses expériences in vivo ont également été réalisées pour vérifier l'efficacité antitumorale des extraits ou des composés phénoliques dérivés d'aliments végétaux avec une incidence et une multiplicité de tumeur (p. Ex., Nombre de tumeurs par animal) comme points d'extrémité (Yang, Maliakal, & Meng, 2002). Les modèles animaux couramment utilisés sont soit des tumeurs induites chimiquement par la lumière ultraviolette ou génétiquement aussi bien que des modèles de xénogreffe, y compris le colon, le poumon, le sein, le foie, la prostate, l'estomac, l'œsophage, l'intestin grêle, la glande mammaire du pancréas et les tumeurs de la peau. À titre d'exemple, Lala et al., (2006) a étudié l'activité chimioprotective des extraits riches en anthocyanes (ARE) de myrtilles, de chokeberry et de raisins dans des rats Fischer 344 traités avec un agent cancérigène du côlon, l'azoxyméthane (AOM). Au bout de 14 semaines, les rats sur les régimes ARE avaient beaucoup moins de foyers coloniaux de cryptes aberrants (ACF) par rapport au groupe témoin. De plus, les rats nourris avec la myrtille ARE avaient 70% de moins de grande ACF par rapport aux rats nourris avec le régime témoin, ce qui indique une chimioprévention importante. Les rats nourris de chokeberry ont eu une réduction de 59% dans le grand ACF.

### **2. Interférence des fonctions cellulaires de base par les composés phénoliques**

Les composés phénoliques naturels peuvent affecter les fonctions cellulaires basiques qui associent le développement du cancer par beaucoup de différents mécanismes (Carocho et Ferreira, 2013b). Tout d'abord, au stade de l'initiation, ces composés peuvent inhiber l'activation des procarcinogènes en inhibant les enzymes métabolisant la phase I, comme le cytochrome P450 (Hodek, Trefil, & Stiborova, 2002) et facilitent également la désintoxication et l'élimination des agents cancérigènes par l'induction d'enzymes métabolisant la phase II telles que la glutathion S-transférase (GST), NAD (P) H quinone oxydoréductase (NQO) et UDP-glucuronyl-transférase

(UGT) (Galati et al., 2000). Ils peuvent également limiter la formation des cellules initiées en stimulant la réparation de l'ADN (Webster, Gawde, & Bhattacharya, 1996). Cependant, les composés phénoliques peuvent inhiber la formation et le développement de tumeurs par induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose. Les cellules malignes sont caractérisées par une prolifération excessive, une incapacité à différencier ou à effectuer une apoptose dans des conditions normales et une durée de vie prolongée ou immortalisée (Fadeyi et al., 2013). Des phénoliques naturels ont été signalés induisant l'arrêt du cycle cellulaire à différentes phases cellulaires: G1, S, S-G2 et G2 en réduisant directement les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK) ou induisant indirectement l'expression des gènes p21, p27 et p53 (Dai et Mumper, 2010). On a constaté également que les polyphénols affectent la croissance des cellules cancéreuses en induisant une apoptose dans de nombreuses lignées cellulaires telles que l'hépatome (HepG2), le colon (SW620, HT-29, CaCo-2 et HCT-116), la prostate (DU-145 et LNCaP), le poumon (A549), le sein (MCF-7), le mélanome (SK-MEL-28 et SK-MEL-1), le neuroblastome (SH-SY5Y) et les cellules de leucémie HL-60.

## Chapitre IV

---

### Phytochimie de l'huile d'olive COMPOSITION & PHYTOCHIMIE

#### 1. Huile d'olive vierge (HOV) et composition chimique

Les constituants chimiques de l'huile d'olive vierge peuvent être subdivisés en deux catégories : la fraction saponifiable (triglycérides, phospholipides, AG, etc.) et la fraction insaponifiable (stérols, alcools tri-terpéniques, etc.). La fraction saponifiable est composée d'environ 99 % d'acides gras. Les acides gras majeurs dans ce produit sont l'acide oléique et l'acide linoléique (Suarez et al., 2010). Cependant, la fraction insaponifiable présente en faible pourcentage, et de principaux antioxydants à savoir des carotènes ainsi que les polyphénols et les tocophérols. Ces antioxydants sont des substances capables d'empêcher l'oxydation des aliments et de retarder ainsi ses effets secondaires tels que le rancissement, la décoloration ou l'apparition des saveurs indésirables (Chiacchierini et al., 2007).

#### 2. Les composés phénoliques de l'huile d'olive

Les composés phénoliques dans l'huile d'olive constituent un groupe de composés mineurs de la fraction polaire de l'huile, généralement plus abondant dans les huiles vierges et contribuent directement à augmenter sa stabilité (Galvano et al., 2007). Ils sont responsables de l'astringence, au goût piquant et à l'amertume de l'HO. Une variété de composés phénoliques avec une structure différente ont été identifiés dans les HOV, tels que les alcools phénoliques, acides phénoliques, lignanes, flavonoïdes et secoiridoïdes (Lesage-meessen et al., 2001).

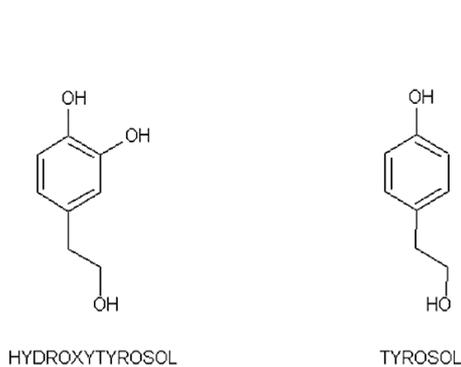
##### 2.1. Les phénols simples

Deux sous-catégories avec les alcools phénoliques (fig.13) et les acides phénoliques. Dans le premier groupe on retrouve l'hydroxytyrosol et le tyrosol. Ces deux composés sont directement dérivés de l'hydrolyse de l'oleuropéine et du ligstroside. Dans le groupe des acides phénoliques on peut citer l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique ou encore l'acide vanillique qui sont encore retrouvés dans les huiles (Galvano et al., 2007; Lesage-meessen et al., 2001).

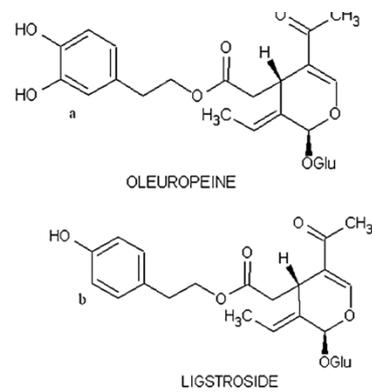
## 2.2. Les dérivés sécoiridoïdes

Les dérivés sécoiridoïdes qui sont des composés glycosylés issus du métabolisme secondaire des terpènes (García et al., 2006). Parmi eux :

- *L'oleuropéine* est le composé majoritaire (Fig. 14) dans les feuilles d'olivier et dans les olives et c'est le principal responsable de l'amertume des olives (Achat et al., 2012).
- *Le ligstroside* est également présent en grande quantité dans l'olive (Fig.14) . Cependant, lors de la transformation en huile d'olive, ces molécules sont hydrolysées en de nombreux dérivés de masses moléculaires très variables.



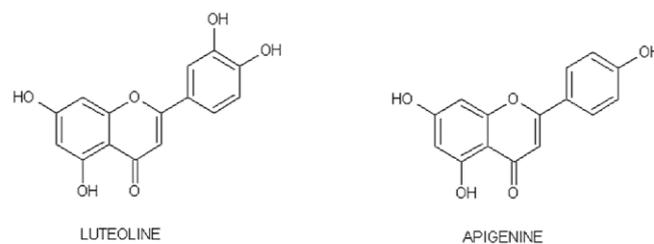
**Figure 13.** structure chimique de l'hydroxytyrosol et le tyrosol



**Figure 14.** Structure chimique de l'oleuropéine (a) et du ligstroside (b)

## 2.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes font également partie des composés majoritaires trouvés dans l'huile, il s'agit de l'apigénine et de la lutéoline (Aparicio et Harwood, 2013) (Fig. 15).



**Figure 15.** Structure chimique de la Lutéoline et de l'apigénine (Ryan et Robards, 1998).

## Chapitre V

### Etude ethnobotanique

#### MONOGRAPHIE DES ESPECES VEGETALES

L'Algérie vu sa position biogéographique privilégiée est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique (Azzi et al., 2012). Son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne donne le privilège à une flore potentiellement riche et variée avec de multiples espèces endémiques offrant une large gamme de composés phytochimiques d'un intérêt grandissant.

#### 1. Etude ethnobotanique

Douze plantes algériennes endémiques, poussant à l'état sauvage, appartenant à différentes familles botaniques ont été détaillées au cours de cette partie, en vu de présenter leur caractéristiques botaniques, pédoclimatiques et écologiques ainsi que leur utilisation traditionnelle par les populations locales ; cela afin de mieux comprendre leur choix et les éventuels domaines d'application. Ces plantes sont classées selon la famille botanique comme suit :

##### ❖ **Apiaceae**

*Ammoïdes verticillata* [Fig16] : plante annuelle appartient à la famille des apiacées. Son odeur est intense ; fortement aromatique, balsamique et persistante même après la dessiccation (Attou et al., 2017). Selon Bnouham, Benalla, Asehrou, & Berrabah, 2012; El-Mokhtar et al., (2011) c'est une plante de 15-35 cm. glaucescente, à tige dressée avec de nombreux rameaux étalés ; feuilles radicales; ombelles petites, penchées avant la floraison. Utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés fébrifuges, antispasmodiques, antiseptiques et antidiabétiques (Bnouham et al., 2012).

##### ❖ **Asteraceae**

*Asteriscus graveolens* (Forssk.) Moins. (*Bubonium graveolens*, *Odontospermum graveolens* ou *Nauplius graveolens*) [Fig17], est une plante aromatique endémique principalement distribuée dans le sud Algérien et le sud-est du Maroc (Cristofari et al., 2012). Présente dans tout le Sahara, surtout dans les argiles sablonneuses, mais aussi sur les plateaux où elle fleurit au printemps, de mars à mai. Elle a été utilisé dans la médecine populaire sahraoui pour le traitement de la fièvre, des troubles du tractus gastro-intestinal, des douleurs céphaliques, bronchite et comme un anti-inflammatoire. Egalement utilisée pour ses propriétés antimicrobiennes, antifongiques et hypoglycémiques. Les plantes de ce genre (*Asteriscus*) sont connues pour produire des composés présentant des activités

antitumorales, antispasmodiques, anti-inflammatoires potentielles et sont également connues pour le traitement de plaies infectées.

#### ❖ **Amaranthaceae**

*Haloxylon scoparium* Pomel [= *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin., *Arthrophytum scoparium* (Pomel) Iljin., *Salsola articulata* Cav., *Haloxylon articulatum* (Cav.)] [Fig18], Appartient à la famille des chenopodiaceae. Ils sont répartis surtout dans les zones désertiques et semi-désertiques dans les sols contenant beaucoup de sel (Lamchouri et al., 2012). Ces des herbes, arbustes et rarement de petits arbres. Le genre *Haloxylon* comprend environ 25 espèces. Il est distribué de la région de la Méditerranée occidentale à l'Arabie, l'Iran, la Mongolie, la Birmanie et le Sud-Ouest de la Chine. Deux espèces du genre ont été enregistrées dans la littérature pour avoir des usages traditionnels. *H. salicornicum* serait utilisé pour le diabète, comme antiseptique et anti-inflammatoire. En Oman, les tiges de cette espèce sont utilisées comme mordant pour teindre la laine dans le tissage traditionnel. En outre, *Haloxylon scoparium* {= *Haloxylon articulatum*} est utilisé pour traiter les troubles oculaires. Infusion de poudre de la partie aérienne est utilisés au Maroc pour leurs effets antidiabétiques. D'autre part, peu d'espèces du genre *Haloxylon* (sept espèces) ont été chimiquement étudiées.

#### ❖ **Caryophyllaceae**

*Herniaria hirsuta* L. [Fig19] Plante annuelle à bisannuelle velue, hérissée, de tiges très ramifiées. Feuilles hispides, lancéolées, sessiles. Fleurs vert jaunâtre et peu voyantes fruits à graines de 0,4 mm, noires et luisantes. C'est une espèce pionnière des milieux alluviaux. Connue dans la pharmacopée magribine pour ses propriétés antilithiasiques et diurétiques, émolliente, antiherniaire, utilisée autrefois contre la gravelle (Atmani et al., 2004).

#### ❖ **Ericaceae**

*Arbutus unedo* L. [Fig20] l'arbre à fraises, est un arbuste toujours vert originaire de la région méditerranéenne à fruits sphériques rouges foncés sont savoureux à maturité en automne, étant principalement utilisés pour la production de boissons alcoolisées, confitures, gelées et marmelades; Néanmoins ils sont également utilisés en médecine populaire comme antiseptiques, diurétiques et laxatifs (Fortalezas et al., 2010). Les feuilles ont été signalées comme possédant plusieurs propriétés biologiques: Astringent, antiagrégant dans les plaquettes humaines, antioxydant, Diurétiques, anti-septiques

urinaires, anti-inflammatoires, antidiarrhéiques, antihypertenseurs et antidiabétiques (Andrade et al., 2009, El Haouari et al., 2007, Fortalezas et al., 2010, Mendes et al., 2009).

#### ❖ **Fabaceae**

***Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel. [Fig21]** communément appelé «raetam» ou «balai de brousse», est un désert Arbuste qui pousse abondamment dans les pays d'Afrique du Nord, la Palestine et la Syrie. Arbrisseau inerme à long rameaux jonciformes, presque nus. Feuilles linéaires petites sur les jeunes rameaux en hiver et tombant très vite à la saison chaude ce qui permet à la plante de résister à la sécheresse car elle offre peu de surface pour l'évaporation. Fleurs blanches ou jaunes petites atteignant jusqu'à 8 mm de long, en grappes de 5 à 10 fleurs. Le fruit est une gousse ovoïde terminée par un bec. Traditionnellement, cette plante a été utilisée comme un abortifacient, un purgatif et un vermifuge. Des études pharmacologiques sur cette plante ont révélé son effet antibactérien, antifongique, antihypertenseur, antioxydant, antiviral, diurétique et hypoglycémique, et l'hépatoprotection, néphroprotecteur et les effets cytotoxiques (Maghrani et al., 2005; Eddouks et al., 2007; Hayet et al., 2007, 2008; Koriem et al., 2009; Algardaby et al., 2010; Edrizi et al., 2010).

#### ❖ **Lamiaceae**

***Ajuga iva* [Fig22]**, Le genre *Ajuga* se compose de 50 espèces et est distribué dans les zones tempérées et tempérées chaudes dans le Vieux Monde. Sept espèces du genre *Ajuga* sont utilisées dans la médecine folklorique africaine et asiatique. *Ajuga iva* L. est utilisé en médecine traditionnelle en Algérie pour traiter le diabète (El-hilaly et al., 2007) et les troubles gastro-intestinaux. Il est connu d'avoir des activités hypoglycémiques (El Hilaly et Lyoussi, 2002), anti-inflammatoires, antifongiques, antimicrobiennes, antifebriles et anthelmintiques (Bondi et al., 2000, Ben Jannet et al., 1999, Stocker et al., 2004). Des études chimiques sur *A. iva* ont révélé la présence de plusieurs flavonoïdes, tanins, terpènes et stéroïdes (Houghton et Raman, 1998).

***Thymus pallescens* [Fig23]** C'est un petit arbuste de 36cm de longueur en moyenne portant des tiges dressées et robustes. Les feuilles (10-17x3-6mm) sont oblongues lancéolées entières et glabres rarement hispides. L'inflorescence est plus ou moins interrompue à la base. Le calice est à 5 dents toutes longuement subulées, bien plus

longues que le tube, à lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur. Les fleurs sont blanches à peine plus longues que le calice. C'est une espèce qui pousse généralement entre 450-750m d'altitude (Hazzit, 2008).

***Saccocalyx satireioides* Coss. et Dur, [Fig24]** C'est une plante aromatique endémique algérienne poussant dans les zones semi désertiques à climat sec, cet arbuste est localement appelé « *Zâater* » faisant référence à l'odeur qui se rapproche à celle du thym (Bendahou et al., 2014). En médecine traditionnelle les parties aériennes de cette plante sont communément utilisées en décoction pour le traitement des spasmes et dérèglement gastriques (Biondi et al., 2006). Elle est utilisée comme condiment, avec des effets stomachiques, digestifs, antidiarhétiques et vermifuges. Par voie orale, le décocté des jeunes rameaux est préconisé contre le rhume dans la région de Djelfa (Algérie).

#### ❖ **Plumbaginaceae**

***Limoniastrum guyonianum* Boiss. [Fig25]** a été utilisé dans les médicaments traditionnels pour traiter les infections gastriques et comme anti-bactérien dans le traitement de la bronchite (Trabelsi et al., 2013). Récemment, on a démontré qu'un extrait de galle aqueux (extrait G) présentait des effets biologiques puissants, y compris des activités antioxydantes, anti-mutagènes et immunomodulatrices (Krifa et al., 2014). Des études antérieures ont révélé que l'extrait G induit également l'apoptose dans les cellules cancéreuses cervicales humaines par une régulation négative UHRF1 / DNMT1 liée à la réactivation de p16INK4A (Krifa et al., 2013a).

#### ❖ **Thymelaeaceae**

***Thymelaea hirsute***, *Thymelaea* est un genre composé d'environ 30 espèces d'arbustes à feuilles persistantes (Kadri et al., 2011). *Thymelaea hirsuta* un arbuste à feuilles persistantes et dioïque, originaire de l'Afrique du Nord. C'est une herbe invasive largement répandue en Algérie. Il est connu sous le nom de Methnane et a été utilisé traditionnellement comme antiseptique, antimélanogénèse, antioxydant (Amrani et al., 2009) et antidiabétique (Amrani et al., 2009; Djeridane et al., 2006).

**Tableau 07 : Systématique des espèces végétales étudiées**

Taxonomie	Plante 1	Plante 2	Plante 3 et 4	Plante 5	Plante 6
<b>Règne</b>			Plantae (végétal)		
<b>Embranchement</b>			Spermaphytes (phanérogames)		
<b>Sous embranch.</b>			Angiospermes		
<b>Classe</b>			Magnoliopsida		
<b>Ordre</b>	Apiales	Asterales	Caryophyllales		Ericales
<b>Famille</b>	Apiaceae	Asteraceae	Amaranthaceae.	Caryophyllaceae	Ericaceae
<b>Genre</b>	Ammoïdes (Ptychotis)	Asteriscus	Haloxyton	<i>Herniaria</i>	Arbutus
<b>Espèce</b>	<i>Ammoïdes</i> (ou <i>Ptychotis</i> ) <i>verticillata</i> , <i>Trachyspermum</i> Boiss	<i>Asteriscus</i> <i>graveolens</i> (Forssk.) Less.	<i>Espèce 01 : Haloxyton</i> <i>scoparium</i> Pomel Ou <i>Hammada scoparia</i> <i>Espèce 02 :</i> <i>Haloxyton salicornicum</i> (Moq.) Bunge	<i>Herniaria</i> <i>hirsuta</i> L.	<i>Arbutus unedo</i> L.
<b>Référence</b>	(Quezel et S. Santa, 1963)				



Fig.16 : *P. verticillata* Fig.17 *A. graveolens*



Fig.18 *H. scoparium*. Fig.19 *H. salicornicum* .



Fig.20 *H. hirsua*. Fig.21 *A. unedo*

Taxonomie	Plante 7	Plante 8	Plante 9	Plante 10	Plante 11	Plante 12
<b>Règne</b>	Plantae (végétal)					
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes (phanérogames)					
<b>Sous embranch.</b>	Angiospermes					
<b>Classe</b>	Magnoliopsida					
<b>Ordre</b>	Fabales		Lamiales		Caryophyllales	Malvales
<b>Famille</b>	Fabaceae		Lamiaceae		Plumbaginaceae	Thymelaeaceae
<b>Genre</b>	Retama	Ajuga	Saccocalyx	Thymus	Limoniastrum	Thymelaea
<b>Espèce</b>	<i>Retama raetam</i> Forssk.	<i>Ajuga iva</i> L. Schreb.	<i>Saccocalyx</i> <i>satureioides</i> Coss. <i>et Dur.</i>	<i>Thymus</i> <i>pallescens</i>	<i>Limoniastrum</i> <i>guyonianum</i> Boiss.	<i>Thymelaea hirsute</i>
<b>Référence</b>			(Quezel et S. Santa, 1963)			



Fig.22 : *L. guyonianum*



Fig. 23 : *S. satureioides*



Fig.24 *T. pallescens*



Fig.25 *R. raetam*



Fig.26 *A. iva*



Fig.27 *T. hirsute*

Deuxième partie :  
Etude expérimentale

---

## I. MATERIEL ET METHODES

### 1. Choix des plantes et authentification des espèces

Les plantes étudiées ont été choisies après une étude ethnobotanique, basée sur une enquête menée au terrain par un questionnaire où on tient en compte : l'utilisation traditionnelle de la plante (culinaire ou médicinale), les modes d'administration et aussi les conditions de stockage et de conservation. L'authentification des espèces a été réalisée en se basant sur la description botanique décrite par Quezel & Santa (1963). Une décision d'attribution de nom à une espèce donnée était prise après avis confirmatif ainsi que la vérification et la confirmation de l'appartenance de chaque plante à une espèce donnée ont été réalisées par des spécialistes en Botanique. Alors que la récolte de la plupart des plantes a été faite à partir de la région steppique et désertique de l'Algérie.

### 2. Échantillonnage

Avant d'utiliser efficacement un résultat d'analyse de la plante, un échantillonnage représentatif doit être établi. En outre, il est nécessaire de déterminer quelle partie de la plante à étudier, la période de récolte, l'endroit d'échantillonnage. Le moment d'échantillonnage implique habituellement un certain point dont l'âge physiologique ou le stade de développement de la culture, la sélection étant influencée quant à savoir si la plante est annuelle ou pérenne (Jones & Case, 1990). Le tableau 08 résume le choix et les caractérisations des espèces végétales étudiées et leur utilisation traditionnelle en Algérie.

### 3. Choix de la variété d'huile d'olive

La variété d'olives (Neb Djmel) a été sélectionnée d'une culture d'olivier monovariétale. L'huile de cette variété est connue par sa faible résistance à l'oxydation, sa couleur jaune clair voir transparent et sa faible odeur caractéristique (Aouadi et al., 2009). L'huile Extra-vierge est essorée à partir de fruits d'olives de la saison 2015 et stockés dans des flacons sombres à l'abri de la lumière et de l'humidité à (4°C) jusqu'au moment de l'analyse.

**Tableau 08.** Caractérisation des espèces végétales étudiées et leur utilisation traditionnelle en Algérie.

Famille botanique /espèce	Air de répartition	Partie utilisée	Utilisation traditionnelle	Forme d'utilisation	Références
(Apiaceae) ○ <i>Ptychotis verticilata</i>	Semi-aride en montagnes	Parties aériennes	Fébrifuge, antispasmodique, antiseptique, traitement des infections urinaires, antidiabétique, hypotensif.	Infusion décoction	Bellakhdar (1997); Bnouham et al. (2010); Bouzabata (2013)
(Asteraceae) ○ <i>Asteriscus graveolens</i>	Sud-ouest aride et désertique	feuilles, tiges, fleurs	Antidiabétiques (hypoglycémiques), anti-inflammatoire, troubles intestinales, diurétiques, hypotensive et dépurative	Infusion, fumigation	(Daur, 2013) ; (Askarne et al., 2012) ; Bellakhdar (1997)
(Amaranthaceae.) <i>Haloxylon scoparium Pomel</i> <i>Haloxylon salicornicum</i>	Désertiques, sols salés	Fruits, Branches.	Effets antidiabétiques, anti-inflammatoire, antioxydant	Infusion poudre	Ziyyat et al. (1997) ; Bnouham (2002) ; Eddouks et al. (2002) ; Lamchouri et al. (2012); Bakchiche et al. (2013)
Caryophyllaceae <i>Herniaria hirsuta</i>	Semi-aride	Parties aériennes	Pathologies du système urinaire, problèmes de reins (lithiase), diurétiques	Infusion	Atmani et al. (2004); Fakchich & Elachouri (2014)
(Ericaceae) ○ <i>Arbutus unedo</i>	Méditerranéen	feuilles Fruits fleurs	Diurétiques, hypoglycémiques, antidiarrhéiques, anti-inflammatoire, dépurative, pathologies cardiovasculaires (antihypertenseur, athérosclérose et thrombose)	Infusion	Bnouham et al. (2007); Bakchiche et al. (2013); Miguel et al. (2014)
(Fabaceae) ○ <i>Retama retam</i>	Etage humide et régions arides	Feuilles Fruits Fleurs	Traitement de l'eczéma, diabète et hypertension, laxatif, diurétique, vermifuge,	Infusion Application cutanée	Eddouks et al. (2002, 2007); Maghrani et al. (2005)
(Lamiaceae) ○ <i>Ajuga iva</i>	Régions arides et semi-arides sud-ouest	Feuilles	Diabète et troubles gastro-intestinaux anti-inflammatoire, Antifebril, anthelmintique, Hypolipidémique, vasorelaxant, Hypocholestérolémique	Infusion Decoction	Bellakhdar (1997); Ozenda (2004); Azzi et al. (2012); El Hilaly et al. (2006); Bendahou et al. (2008); Bouderbala et al. (2008)
<i>Saccocalyx satureioides</i>	prédesertique du nord et nord-ouest	Feuilles Fruits Fleurs	Troubles gastriques et spasmes, Anti-inflammatoire, analgésique, Antimicrobien	Infusion decoction	
○ <i>Thymus palleescens</i>	Etage humide et semi-humide	Parties aériennes	Antispasmodique, carminatif, sédatif, Diaphorétique, anti-inflammatoire, analgésique	Infusion decoction	
(Plumbaginaceae) ○ <i>Limoniastrum guyonianum Boiss. (Zita)</i>	Desert saline regions	Feuilles	Les infections gastriques (anti-dysentériques), bronchite, Parasite dans les maladies infectieuses, Antibactérien.	Infusion Décoction	Chaieb & Boukhris (1998)
(Thymelaeaceae) ○ <i>Thymelea hisuta</i>	North semi-arid regions	Parties aériennes	Antidiabétiques, anti-hypertensifs, antiseptique	Infusion et décoction	Ziyyat et al. (1997); Bnouham et al. (2007); El Amrani et al. (2009)

#### 4. Produits chimiques et Réactifs

L'étude des extraits des plantes exige divers dispositifs, solvants et produits chimiques. Les principaux produits chimiques et les réactifs utilisés sont indiqués dans le tableau 09.

**Tableau 09** : Matériel et réactifs utilisés dans l'analyse expérimentale.

<b>Produits et matériel utilisés</b>	
<b>Solvants organiques</b>	➤ Méthanol, Ethanol, Ethyle-acétate, Butanol, Hexane, Chloroforme, Diéthyl-ether.
<b>Acides bases</b>	& ➤ Acide trichloracétique (TCA), Hydroxyde de sodium (NaOH), Hydroxyde de potassium (KOH), Acide acétique, Acide formique, Acide ascorbique, Acide thiobarbiturique.
<b>Etalons</b>	➤ Acide Gallique, Catéchine, Quercétine, acide vanilique, acide cafféique, acide sinapique, acide coumarique, acide, acide lénoléique.
<b>Réactifs</b>	➤ Folin Ciocalteu's, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), B-carotène, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), BHT, BHA, Tween 80, Trypsine-EDTA (éthylène diamine tétraacétique acide), une solution de pénicilline / streptomycine, milieux RPMI-1640 et DMEM, ellipticine, sulphorhodamine B (SRB), le bleu trypan
<b>Sels</b>	➤ Carbonate de sodium ( $\text{NaCO}_3$ ), Nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ), Trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), phosphate dissodique ( $\text{Na}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$ ), Chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ), ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), iodure de potassium (KI), thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ).
<b>Verrerie</b>	○ Becher, tubes à essai, Erlenmeyer, Fiole jaugée, Ampoule décanté, Ballon à fond plat Epruvette gradué Entonnoir, Entonnoir de buchner, Fiole à filtration sous vide, Tromp à eau, hydrodistillateur type clevenger
<b>Appareils</b>	○ Balance, Ultrason, Agitateur magnétique, plaque chauffante, Etuve, Rotavapor, Lyophilisateur Centrifugeuse, Bain-marie thermostaté, Spectrophotomètre UV-Visible, Vortex, Rancimat, GC/MS, HPLC-UV-VIS Youngline, LC/MS-Agilent, distillateur Milli-Q.

Tous les autres produits chimiques utilisés et solvants étaient de qualité analytique. Les solvants utilisés pour l'étude chromatographique sont grade HPLC, LC/MS. L'eau ultrapure a été traitée dans un système de purification d'eau Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, Etats-Unis).

## **5. Méthodes et procédés d'analyse**

Il y a un certain nombre d'étapes à suivre lors des analyses des produits naturels des plantes. Lors de cette étude la méthodologie empreintées (fig.28) est indiquée comme suit :

### **5.1.Préparation des échantillons et extraction**

Il n'existe pas de procédure normalisée pour la préparation des échantillons et l'extraction de tous les composés phénoliques ou d'une classe spécifique de substances phénoliques dans les matières végétales. La procédure doit être optimisée en fonction de :

- A. La nature de l'échantillon et des analytes (par exemple, extraction des composés phénoliques, classes phénoliques spécifiques, composés individuels; Phénols liés ou libres; Espèces polymériques);
- B. Objet de l'analyse (par exemple, intérêt à l'élucidation de la structure ou quantification);
- C. Disponibilité des techniques.

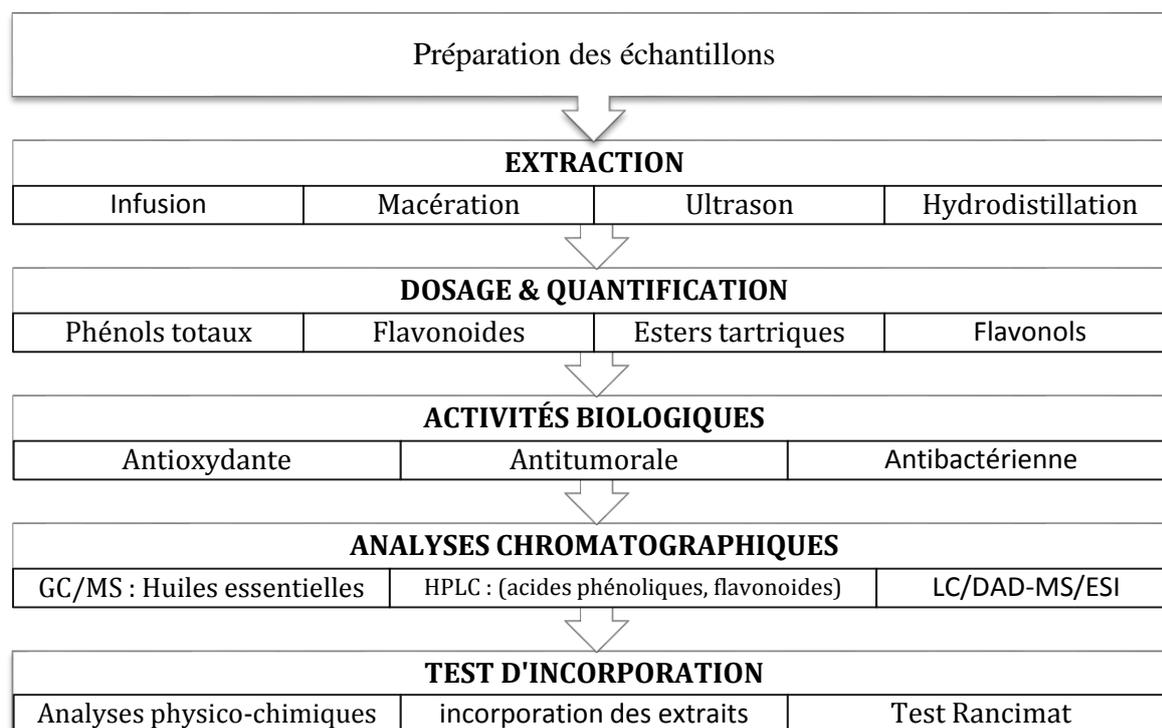
En raison de la complexité de la plupart des matrices végétales, la procédure de préparation de l'échantillon est une étape critique de tout le processus. Séchage, broyage et l'homogénéisation sont des prétraitements courants.

#### **5.1.1. Séchage et broyage des plantes**

Après la récolte seules les parties aériennes des plantes ont été choisies pour l'étude, le séchage a été effectué à température ambiante pendant environ un (01) mois à partir de la date de la récolte jusqu'à la date de l'extraction.

Une fois le séchage effectué on procède à l'homogénéisation et le broyage qui sont les premières étapes de la préparation des échantillons (Sarker et Nahar, 2009) en vue de :

- Améliorer la stabilité de l'échantillon ;
- Améliorer l'efficacité du processus d'extraction ;
- Eliminer ou réduire les interférences potentielles ;



**Figure 28.** Schématisation de la démarche analytique

### 5.1.2. Extraction

L'extraction des principes actifs par solvant à partir de la matière végétale, tel le cas des polyphénols est une étape cruciale dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques et couramment utilisée pour la préparation des extraits bruts (Taylor et al., 2005), mais les méthodes d'extraction assistée, comme celle d'ultrasons a également été fortement employées. Les extraits phénoliques de matières végétales sont toujours un mélange de différentes classes de phénoliques qui sont solubles dans le système solvant utilisé.

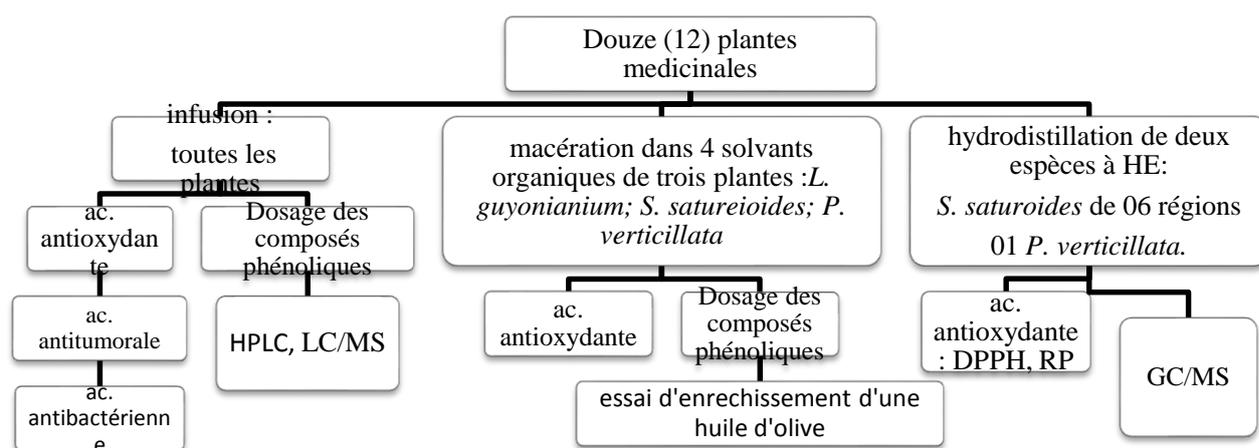
La diversité structurale des composés phénoliques affectent leur propriétés physico-chimiques, tels que la solubilité et les caractéristiques de répartition. La polarité des composés varie significativement avec leur structure, leur statut de conjugaison et leur association avec la matrice de l'échantillon ; Les formes liées et les composés phénoliques de haut poids moléculaire peuvent être tout à fait insolubles. En outre, les composés phénoliques ne sont pas uniformément répartis dans la plante et leur stabilité varie de manière significative ; Certains sont relativement stables et d'autres sont volatiles, thermolabiles et / ou facilement sujettes à l'oxydation (Santos-Buelga et al., 2012).

## 5.2.Choix des solvants et technique d'extraction

L'extraction par solvant reste la procédure la plus courante, des solvants tels que l'éthanol (EtOH), le butanol (BuOH) et l'acétate d'éthyle (EtOAc) et leurs combinaisons et avec de l'eau ont été utilisés pour l'extraction des composés phénoliques à partir de matières végétales étudiées. EtOAc présente l'avantage de ne pas être miscible à l'eau et d'avoir un faible point d'ébullition, ce qui le rend facilement évaporé. Certains composés phénoliques polaires (par exemple, les acides benzoïque et acides cinnamiques, ou les flavonoides glycosylés) ne pouvait pas être complètement extrait avec des solvants organiques, c'est pourquoi des mélanges avec l'eau ont été utilisés, tel que, le EtOH/H<sub>2</sub>O à 80%. Cependant les solvants moins polaires (par exemple, EtOAc) sont cependant appropriés pour l'extraction des flavonoides aglycones (Sarker et Nahar, 2009).

Les extraits aqueux sont préparés comme infusion, en suite l'extraction par macération était la méthode d'extraction choisie pour extraire les composés phénoliques des plantes au moyen des solvants organiques et leur mélange avec de l'eau. Toutefois cette méthode a été utilisée en couplage avec la technique des ultrasons lors des étapes de l'extraction.

L'extraction assistée par ultrasons (EAU) est effectuée dans un bain à ultrasons où on expose les solutions à des sondes à ultrasons, en mode discret ou continu. Les sondes ultrasons peuvent même offrir de meilleurs résultats en maximisant le rendement et minimisant le temps d'extraction (Chemat et al., 2016). Les Bechers des échantillons sont immergés dans le liquide contenu dans un bain à ultrason à l'intérieur du dispositif.



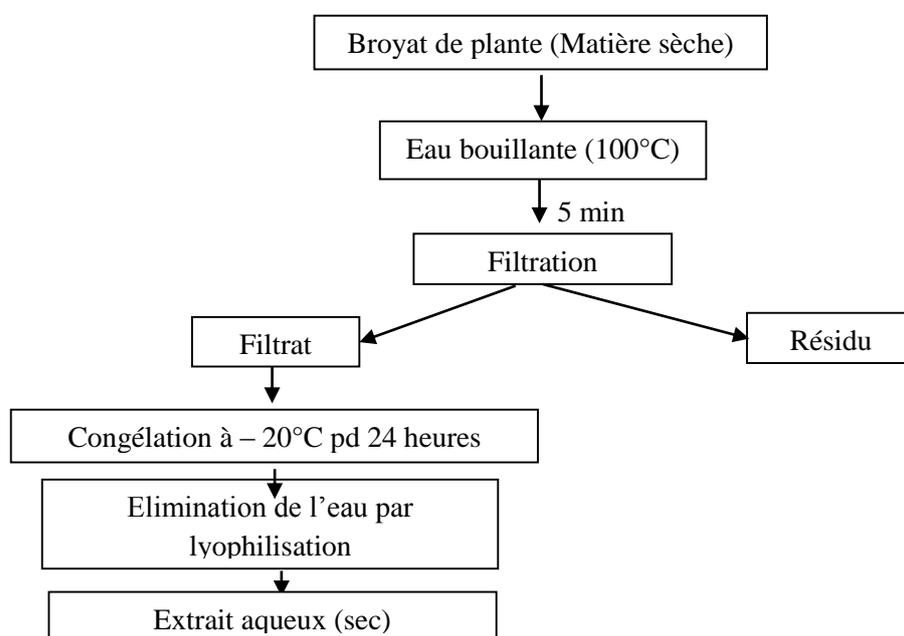
**Figure 29.** Diagramme représentatif des principales analyses et activités à développer.

### 5.3. Protocoles d'extraction

L'extraction des composés phénoliques des plantes est une extraction solide/liquide en une seule phase procédée en mettant en contact le matériel végétal avec un solvant ce qui permet d'obtenir l'extrait végétal selon le protocole suivant :

#### 5.3.1. Infusion

Une quantité de matière sèche de plante (1 g) est mise en contacte selon un ratio de (1:100; m/v) avec l'eau bouillante (100°C) et laissée pendant 5 min sans source de chaleur. Une filtration par papier filtre (Whatman n°4) suivie l'étape d'extraction. L'extrait obtenu est ensuite stocké à -20°C durant 24 h pour être lyophiliser (Guimarães et al., 2013).



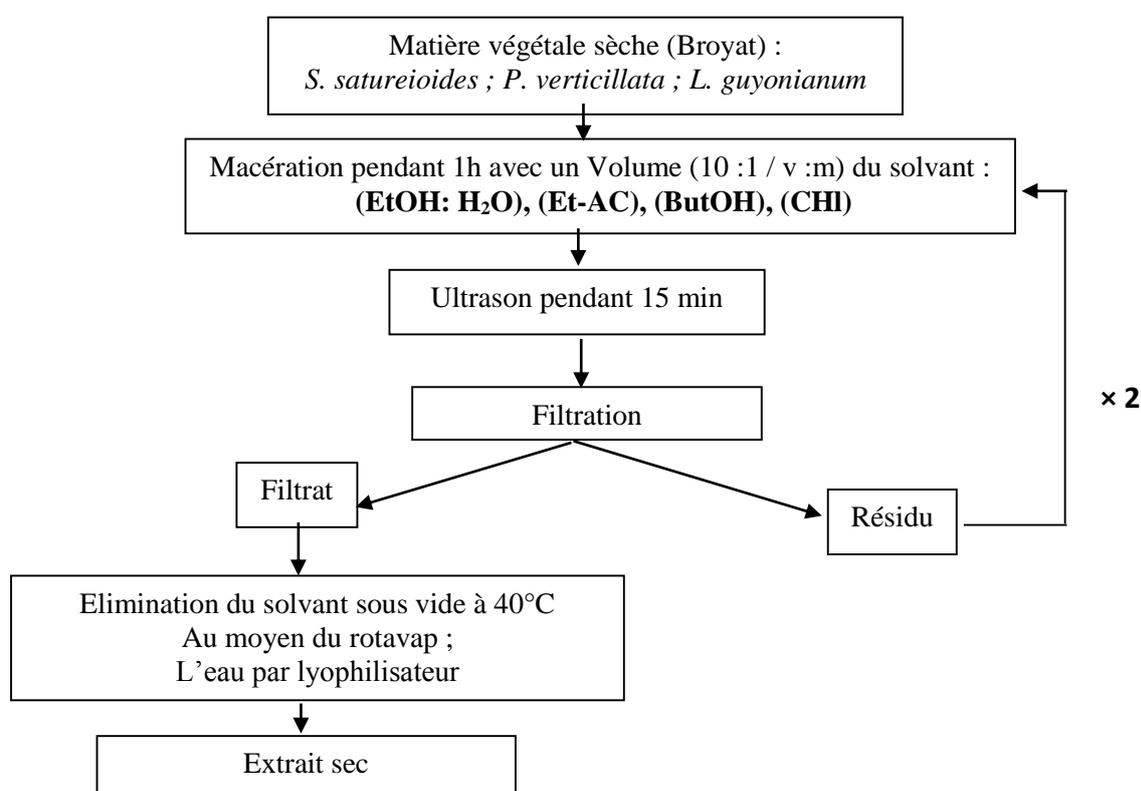
**Figure 30.** Schéma simplifié du procédé d'extraction aqueuse par infusion

#### 5.3.2. Extraction par macération

Ce n'est pas souvent possible d'extraire tous les composés cibles avec un seul solvant et des solvants multiples de différentes polarités peuvent être nécessaires pour extraire différentes familles de composés. C'est pour ça on a choisi d'extraire séparément les composés naturels présents dans trois plantes endémiques (*Saccocalyx satureioides*, *Phytocotis verticillata* et *Limoniastrum guyonianum*) au moyen de différents solvants (**EtOH/H<sub>2</sub>O**: Ethanol/eau ; **BuOH**: Butanol ; **ET-AC**: Ethylacétate, **CHI**: Chloroforme) et ceci afin de tester l'activité biologique et caractériser les composés extraits selon l'affinité au solvant.

Une quantité de matière sèche de plante (10 g) est mise en macération directe sous agitation continue avec le solvant organique selon le ratio (1 :10) dans un bécher de 200 ml, les solvants utilisés séparément sont : le EtOH/H<sub>2</sub>O (80:20; v:v), le Butanol (BuOH), l'ethylacétate (Et-AC) et Chloroforme (CHl).

Après une heure de macération les solutions d'échantillons sont mise pour une extraction à l'ultrason pendant 15 min, dans un bain à ultrason à 35KHz après on effectue une première filtration par papier filtre (Wattman N°04). Le résidu est extrait une deuxième fois avec la même quantité du solvant et selon la même procédure pour assurer un maximum d'extraction, on filtre une deuxième fois et on récupère les deux filtrats extraits pour concentration sous vide au Rotavapor à 40 C°, tandis que l'eau résiduelle de l'EtOH :H<sub>2</sub>O est éliminée par lyophilisation après congélation (Barros et al., 2013).



**Figure 31.** Schéma simplifié du procédé d'extraction par solvants

L'extraction par ultrason a été effectuée au moyen d'un ultrason à bain de model D-78224 Singen/Htw Elma type TS 540 de Capacité 5,4 L, en mode continu en appliquant une puissance de 35 KHZ pendant 15 min sur les Bechers contenant les plantes en suspension dans les solvants d'extraction.

### ○ *Élimination du solvant*

Une séparation du matériel végétal par élimination totale du solvant d'extraction ayant une pureté au moins égale à 98 %, est effectuée au moyen du rotavapor type BUCHI R-215 sous vide à basse température (40 à 45°C) et à une vitesse de rotation de 80 trm. Cependant, le solvant et/ou mélange de solvants permettent de caractériser une famille de composés ou un mélange de groupe de composés qui seront évidemment présent dans l'extrait sec obtenu. On obtient ainsi pour chaque plante, un extrait ETOH:H<sub>2</sub>O, un extrait d'éthyle acétate, un extrait butanolique ButOH et un extrait chloroformique. L'eau utilisée pour l'extrait aqueux ainsi que l'eau résiduelle après évaporation de l'éthanol au rotavap est éliminée après congélation à -18°C pd 24 heures au moyen d'un lyophilisateur type ALPHA 1-2/LD avec un condensateur à glace d'une capacité de 2Kg/24u et Température -55°C.

### **5.3.3. Extraction des huiles essentielles**

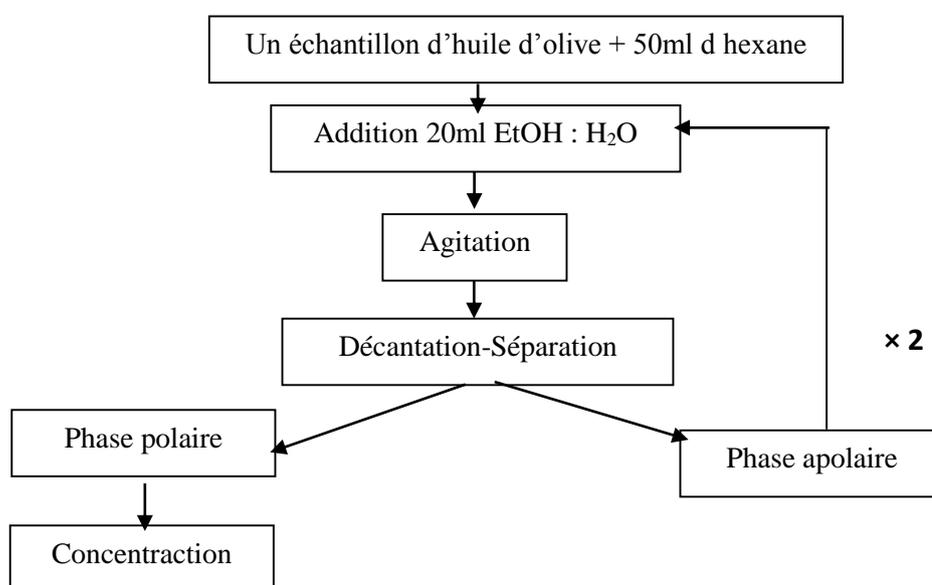
Les espèces choisies pour l'extraction des composés volatiles sont d'après la littérature des plantes à huiles essentielle et qui n'ont pas fait l'objet de beaucoup d'études de caractérisation de leurs fractions volatiles :

- *Saccocalyx satureoidies*, provenant de 6 régions différentes (non étudiée avant) : *Méchria (SM)* ; *El-Baoid (SEB)* ; *El nâama (SN)* ; *Bedrous, (SBE)* ; *Asla (SAS)*, *Tieret (ST)* ont été choisie pour exhiber l'effet de la région sur leur composition chimique et leur activité antioxydante.
- *Ptychotis verticillata*, une seule espèce provenant de la région de guelma, une zone non étudiée auparavant.

L'extraction des HE est réalisée au moyen d'un hydrodistillateur type Clevenger en système fermé permettant une extraction en recyclage continu afin de maintenir le rapport plante/eau à son niveau initial. Une quantité de 100g de plante séchée moyennement broyée est placée dans un ballon d'un litre (1L) avec 500ml d'eau distillée. Le tout est ensuite porté à l'ébullition pendant trois (03) heures. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées par le réfrigérant maintenu à 17°C au moyen d'un thermostat type Wisecircu ® WCR - P 8 DHWCR00208. L'huile essentielle ainsi obtenue se séparent de l'eau par différence de densité et ensuite récupérée dans un Vial ombré après élimination de l'eau.

### 5.3.4. Extraction des composés phénoliques de l'huile d'olive

L'extraction liquide/liquide des composés phénoliques de l'huile d'olive est réalisée suivant le protocole de Tsimidou et al., (1992) modifié. 10 g d'huile est dissoute dans 50 ml d'hexane, cette solution est introduite dans une ampoule à décanter et un mélange EtOH: H<sub>2</sub>O (80: 20, v : v) est ajouté. Le mélange est agité vigoureusement pendant 5 min puis laissé à décanter, la phase polaire (phase hydroéthanolique) contenant les composés phénoliques est récupérée, tandis que la phase apolaire subit une 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> extraction pour récupérer la fraction phénolique restante. Chaque fraction polaire récupérée subit un lavage avec 50 ml d'hexane. Les solutions sont concentrées sous vide à l'aide d'un rotavapor à (40°C) jusqu'à avoir un résidu sec. Le séchage des extraits est complété dans l'étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.



**Figure 32.** Les principales étapes d'extraction des composés phénoliques de l'Huile d'olive.

#### ❖ Expression du rendement en extrait sec

Le rendement d'extraction est mesuré selon l'équation suivante :

$$REp\% : (mMS - mE / mMS) \times 100 \quad \text{ou} \quad REh\% : (mMG - mE / mMG) \times 100$$

- REp : Rendement d'extraction des plantes en (%)
- REH : Rendement d'extraction de l'huile en (%)
- mMS : Masse de matière sèche en (g)
- mMG : Masse de matière grasse en (g)
- mE : Masse d'extrait en (g)

#### 5.4. Préparation de la gamme des concentrations

Les extraits aqueux sont redissous dans l'eau ultrapure et les extraits des solvants organiques dans du méthanol avec un volume bien connu pour fixer une concentration initiale [C=10mg/ml] Diluée à différentes concentrations jusqu'à la détermination de la l'EC<sub>50</sub> (Concentration fournissant 50% d'activité antioxydante ou 0,5 d'absorbance dans le dosage du pouvoir réducteur ; Exprimée en g / ml).

#### 6. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques est en générale colorimétrique de telle façon que la concentration de ces composés est relativement mise en évidence en fonction de l'abondance de plusieurs groupements phénoliques : 1 ou plusieurs cycles aromatique (benzéniques) porteurs de 1 ou plusieurs groupements OH.

##### 6.1. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin Ciocalteu.

##### ▪ Principe

Ce dosage est fondé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions hétéro polyacides d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et phosphomolibdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). En milieu alcalin, le réactif de Folin Ciocalteu oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro polyacides d'où la formation d'un complexe bleu. Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760nm.

##### ▪ Mode opératoire

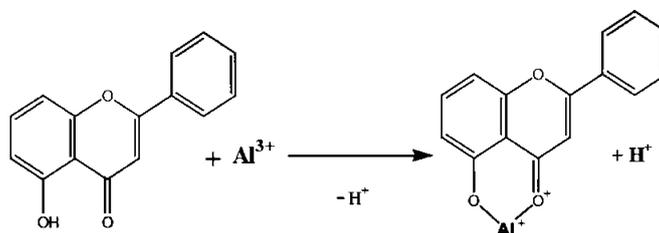
Une quantité de 1ml d'une solution d'extrait de concentration connue est mélangée avec 5 ml du réactif de Folin Ciocalteu (1:10 v / v) et 4 ml de carbonate de sodium à 7,5% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Les tubes ont été agités à un vortex pendant 15 secondes et laissés au repos pendant 30 min à 40 ° C pour le développement des couleurs l'absorbance était alors mesurée à 765 nm (Barros et al., 2010). L'acide gallique a été utilisé pour calculer la courbe standard (0,1-1 mM) et les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par g d'extrait.

## 6.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium.

### ▪ Principe

Le principe de base (fig.33) est que le chlorure d'aluminium forme des complexes d'acides stables avec le groupe céto en C-4 et soit les groupes hydroxyles en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols, respectivement. Il forme également des complexes d'acides labiles avec les groupes orthodihydroxyle dans le cycle A ou B des flavonoïdes résultat de la formation de couleur rose, mesurée à 510 nm.



**Figure 33.** Mécanisme de réaction de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.

### ▪ Mode opératoire

Un volume de 0,5 ml d'une solution d'extrait de concentration connue a été mélangé avec de l'eau distillée (2 ml) et ensuite avec une solution de NaNO<sub>2</sub> (5%). Après 6 min, une solution d'AlCl<sub>3</sub> (10%, 0,15 ml) a été ajoutée. On additionne au mélange 2 ml de solution d'hydroxyde de sodium 1 M (NaOH) et de l'eau distillée pour porter le volume final à 5 ml, après 15 min de repos, l'intensité de la couleur rose a été mesurée à 510 nm (Guimarães et al., 2013). La catéchine a été utilisée pour calculer la courbe standard (0,3-1 mM) et les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents de catéchine (CE) par g d'extrait sec.

## 6.3. Dosage des phénols totaux, esters tartriques et les flavonols dans les infusions

Une solution d'extrait concentré à 0,625 mg / ml (250 µl) a été mélangé avec du HCl 0,1% dans de l'éthanol à 95% (250µl) et HCl 2% (4550 µl). Après 15 min, l'absorbance a été mesurée à 280, 320 et 360 nm. L'absorbance (A) à 280 nm a été utilisée pour estimer la teneur phénolique totale, A 320 nm a été utilisé pour estimer les esters tartriques et A360nm a été utilisée pour estimer les flavonols (Mazza et al., 1999). Recepectivement pour ces adsorbances

mésurées, l'acide chlorogénique a été utilisé pour calculer la courbe standard (0,2 à 3,2 mM) et les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide chlorogénique (CIAE) par gramme d'extrait. L'acide caféique a été utilisé pour calculer la courbe étalon (0,2 à 3,6 mM) et les résultats ont été exprimés sous forme de mg équivalent d'acide caféique (CAE) par gramme d'extrait. La quercétine était utilisée pour calculer la courbe étalon (0,2 à 3,2 mM) et les résultats ont été exprimés sous forme de mg équivalents de quercétine (QE) par gramme d'extrait.

## 7. Activités biologiques

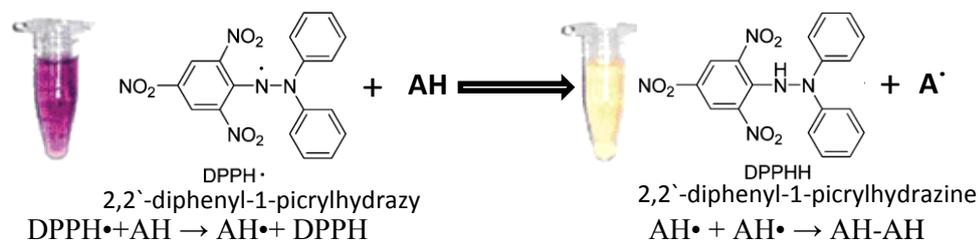
### 7.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydant peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydant de l'échantillon à tester (Pinela et al., 2011). Lors de cette étude on a utilisé quatre tests à savoir : le test DPPH, le pouvoir réducteur du fer, le test du Blanchiment du B-carotène et le test TBARS.

#### 7.1.1. Test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

##### ▪ Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La molécule DPPH est un radical stable grâce à la délocalisation de son électron célibataire autour de la molécule, empêchant ainsi sa polymérisation. Ce qui est le cas de la plupart des radicaux. La délocalisation de l'électron est responsable d'un développement d'une couleur violet foncé.



**Figure 34.** Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Congo., 2012).

L'addition du radical DPPH<sup>•</sup> à une solution contenant un composé potentiellement antioxydant pouvant céder un atome d'hydrogène, entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH (Norma et al., 2014). Au terme de la réaction, il persiste une légère coloration jaune due au groupement picryl résiduel.

#### ▪ Mode opératoire

Cette méthode a été réalisée en utilisant un lecteur de microplaque ELX800 (Bio-Tek). On dépose 30µl de chaque concentration d'extraits aux puits des microplates 96 (en trois répétitions) où le mélange réactionnel se forme après l'ajout de 270µl de la solution du DPPH (60µM). Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 60 minutes. La réduction du radical DPPH est déterminée en mesurant l'absorption à 515 nm. L'activité de piégeage du radical DPPH (RSA) est exprimée en pourcentage de DPPH en utilisant l'équation:

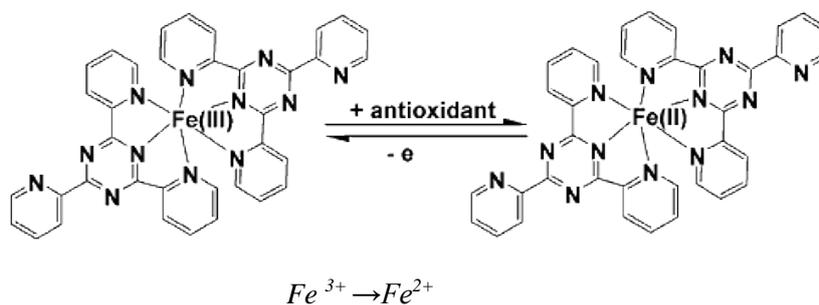
$$\% \text{ RSA} = ((A_{\text{DPPH}} - A_S) / A_{\text{DPPH}}) \times 100, \quad \text{où}$$

AS est l'absorbance de la solution lorsque l'extrait a été ajouté avec une concentration donnée, et ADPPH est l'absorbance de la solution de DPPH.

#### 7.1.2. Test de la réduction du fer (Fe<sup>3+</sup>)

##### ▪ Principe

Le pouvoir réducteur du fer dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaisu., (1989)** qui se base sur la réduction de fer ferrique en fer ferreux par les antioxydants ce qui donne une couleur bleu, fig.35.



**Figure 35.** Schéma sur la réaction de réduction de fer (Prior et al., 2005).

- **Mode opératoire**

Cette méthode a été réalisée en utilisant le lecteur de microplaque décrit ci-dessus, où 0,5 ml de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 0,5ml d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et 0,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. 0,5 ml d'acide trichloracétique (ATC) est ajoutée pour stopper la réaction. On transfère 0,8 du mélange dans les puits des microplates 48 et on ajuste avec le même volume en eau distillée. A la fin on additionne 0,16 ml de  $FeCl_3$  (Chlorure ferrique) à 0,1 %. L'absorbance est mesurée à 690 nm (Heleno et al., 2015a).

### 7.1.3. Test de blanchiment de $\beta$ -carotène/acide linoléique

- **Principe**

C'est l'une des méthodes complémentaires utilisées pour le criblage de substances antioxydantes. Elle est basée sur le principe que l'acide gras insaturé, acide linoléique, s'oxyde spontanément avec les espèces réactives de l'oxygène "Reactive Oxygen Species" (ROS) présentes dans l'eau riche en oxygène. Alors, les produits de réaction déclenchent la transformation du  $\beta$ -carotène en sa forme incolore. Le degré de décoloration est mesuré par spectrophotométrie et utilisé comme une estimation de l'activité antioxydante (AA). La méthode utilisée est celle décrite par (Pinela et al., 2011).

- **Mode opératoire**

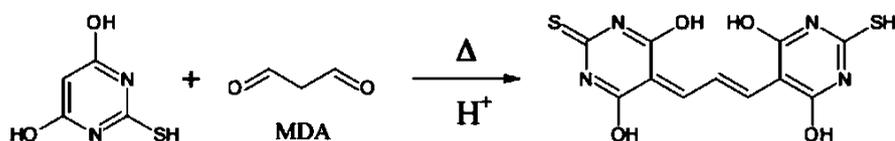
Une solution stock de  $\beta$ -carotène a été préparée en dissolvant du  $\beta$ -carotène (2 mg) dans du chloroforme (10 ml). Un volume de cette solution a été pipeté dans un ballon à fond rond et mis à l'évaporation sous vide pour éliminer le chloroforme à 40 ° C afin d'obtenir 0,5mg de  $\beta$ -carotène, on ajoute 40 mg d'acide linoléique et de l'émulsifiant Tween 80 (400 mg) et (100 ml) d'eau distillée au même ballon sous agitation vigoureuse. Des aliquotes (4,8 ml) de cette émulsion ont été transférées dans différents tubes à essai contenant (0,2 ml) de différentes concentrations des extraits. À ce moment on procède à la lecture de l'absorbance du temps zéro à 470 nm (spectrophotomètre AnalytikJena). Après vortex les tubes sont déposés à 50 ° C pour effectuer la deuxième lecture après 2h d'incubation. L'inhibition du blanchiment  $\beta$ -carotène était calculé en utilisant l'équation suivante :

$$I (\%) = (Abs \beta\text{-carotène } t_{2h} / Abs \text{ Initiale } t_0) \times 100$$

#### 7.1.4. Test Thiobarbiturique acid Reactive Species (TBARS)

##### ▪ Principe

On a utilisé un essai modifié d'espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) pour mesurer le peroxyde de lipide formé, en utilisant le cerveau du porc comme milieu riches en lipides. Les valeurs d'essai TBARS sont habituellement rapportées dans le malonaldéhyde (MDA) équivalent, un composé qui résulte de la décomposition des peroxydes lipidiques d'acides gras polyinsaturés. Ce dosage est basé sur la réaction d'un réactif chromogène, l'acide 2-thiobarbiturique, avec le MDA à 25 °C. Une molécule de MDA réagit avec 2 molécules d'acide 2-thiobarbiturique via une condensation de type Condensation Knoevenagel pour obtenir un chromophore avec une absorbance maximale à 532 nm, comme indiqué ci-dessous sur la figure 36:



l'acide 2-thiobarbiturique

**Figure 36.** Réaction chimique produite lors du Test TBARS

##### ▪ Mode opératoire

Ce test est réalisé sur le cerveau du porc (*Sus scrofa*) de poids corporel 150 kg, disséqué et homogénéisé avec un Polytron dans du tampon Tris-HCl pour former un homogénat de tissu cérébral 1: 2 (p / v) qui est centrifugé à 3000 trm (Centrifugeuse réfrigérée Centorion K24OR) pendant 10 min. Un volume de (0,1 ml) du surnageant a été incubé avec les différentes concentrations des extraits (0,2 ml) en présence de FeSO<sub>4</sub> (0,1 ml) et d'acide ascorbique (0,1 ml) à 37 ° C pendant 1 h. La réaction a été arrêtée par l'addition de trichloracétique (28% en poids / volume, 0,5 ml), puis de l'acide thiobarbiturique (TBA, 0,38 ml), et le mélange a ensuite été chauffé à 80 ° C pendant 20 minutes. Après centrifugation à 3000trm pd 10 min pour éliminer la protéine précipitée, l'intensité de couleur du malondialdéhyde (MDA)-TBA dans le surnageant a été mesurée par son absorbance à 532 nm (Barros et al., 2016). Le taux d'inhibition (%) a été calculé en utilisant la formule suivante:  $Rapport\ d'inhibition\ (\%) = [(A-B) / A] \times 100\%$ , où A et B étaient l'absorbance du témoin et la solution composée, respectivement.

## 7.2. Evaluation de l'activité antitumorale

Les extraits d'infusions (préparées selon la section précédente) ont été redissous dans de l'eau à une concentration finale de 8 mg / ml et dilués à différentes concentrations jusqu'à la détermination de GI<sub>50</sub> (Concentration qui inhibait 50% de la croissance cellulaire nette ; Exprimée en g / ml).

### 7.2.1. Cytotoxicité dans les lignées de cellules tumorales humaines

L'activité antitumorale a été effectuée in vitro (Guimarães et al., 2014) où quatre lignées de cellules tumorales humaines ont été utilisées : MCF-7 (adénocarcinome du sein), NCI-H460 (cancer du poumon non à petites cellules), HeLa (cancer du col utérin Carcinome) et HepG2 (carcinome hépatocellulaire). Les cellules étaient systématiquement maintenues comme cultures cellulaires adhérentes dans du milieu RPMI-1640 contenant 10% de FBS inactivé par la chaleur et 2 mM de glutamine (MCF-7, NCI-H460, HeLa et HepG2), à 37 ° C, dans un incubateur à air humidifié contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Chaque lignée cellulaire a été plaquée à une densité appropriée (7,5 x 10<sup>3</sup> cellules / puits pour MCF-7, NCI-H460 ou 1,0 x 10<sup>4</sup> cellules / puits pour HeLa et HepG2) dans des plaques à 96 puits et laisser à se fixer pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 48 h avec diverses concentrations d'extrait. Après cette période d'incubation, les cellules adhérentes ont été fixées en ajoutant 10% de trichloracétique froid (TCA, 100 uL) et incubés pendant 60 min à 4 ° C. Les plaques ont ensuite été lavés avec de l'eau désionisée et séchés ; le sulforhodamine B 0,1% dans de l'acide acétique (à 1% 100 ul) a ensuite été ajoutée à chaque puits de plaque et incubée pendant 30 min à température ambiante. Le SRB non consolidé a été supprimé par lavage avec 1% d'acide acétique. Les plaques ont été séchées à l'air, le SRB a été solubilisé avec du Tris 10 mM (200 µl) et l'absorbance a été mesurée à 540 nm dans le lecteur de microplaque mentionné ci-dessus. L'Ellipticine a été utilisée comme contrôle positive.

Le pourcentage d'inhibition (I%) des cellules a été calculé en utilisant l'équation suivante.

$$IC (\%) = (1 - [A_t - A_0] / [A_1 - A_0]) \times 100 \text{ Où,}$$

A<sub>t</sub> est l'absorbance des échantillons d'essai, A<sub>0</sub> est l'absorbance d'un blanc et A<sub>1</sub> est l'absorbance d'un témoin négatif.

### 7.2.2. Cytotoxicité dans la culture primaire des cellules du foie non tumorales

Une culture cellulaire a été préparée à partir d'un foie porcine fraîchement récolté, selon une procédure établie par les auteurs (Guimarães et al., 2014); conçues comme PLP2. Rincées dans une solution de Hank saline équilibrée contenant 100 U / mL de Pénicilline, 100 µg / ml de streptomycine et divisée en 1 x 1 mm<sup>3</sup> explants. Certains de ces explants ont été placés dans un des flacons de tissus de 25 cm<sup>2</sup> dans du milieu DMEM additionné de 10% de FBS, 2 mM d'acides aminés non essentiels et 100 U / mL de pénicilline, 100 mg / ml de streptomycine et incubés à 37 ° C en atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu a été changé tous les 2 jours. La culture des cellules a été poursuivie avec une surveillance directe tous les 2 à 3 jours en utilisant un microscope à contraste de phase. Avant la confluence, les cellules ont été sous-cultivées et plaquées dans des plaques à 96 puits à une densité adéquate et commerciale dans du milieu DMEM avec 10% de FBS, 100 U / mL de pénicilline et 100 µg / mL de streptomycine. L'ellipticine était utilisée comme témoin positif.

### 7.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### 7.3.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont formées de six bactéries Gram-négatives: *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* isolées d'expectoration, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* producteur étendu de β-lactamases (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*, producteur étendu de β-lactamases isolées de l'urine; et quatre bactéries Gram-positives: *Enterococcus faecalis* isolé de l'urine, *Listeria monocytogenes* isolé du liquide céphalo-rachidien, MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline isolée de l'exsudat de la plaie et MRSA: *S. aureus* résistant à la méthicilline, isolé de l'expectoration. Toutes les cultures ont été complétées à partir d'isolats cliniques à la place des bactéries ATCC et obtenues auprès de patients hospitalisés dans différents services du centre hospitalier de Trás-os-Montes et Alto Douro (Vila Real, Portugal).

#### 7.3.2. Caractérisation de la sensibilité aux antibiotiques des taches de bactéries

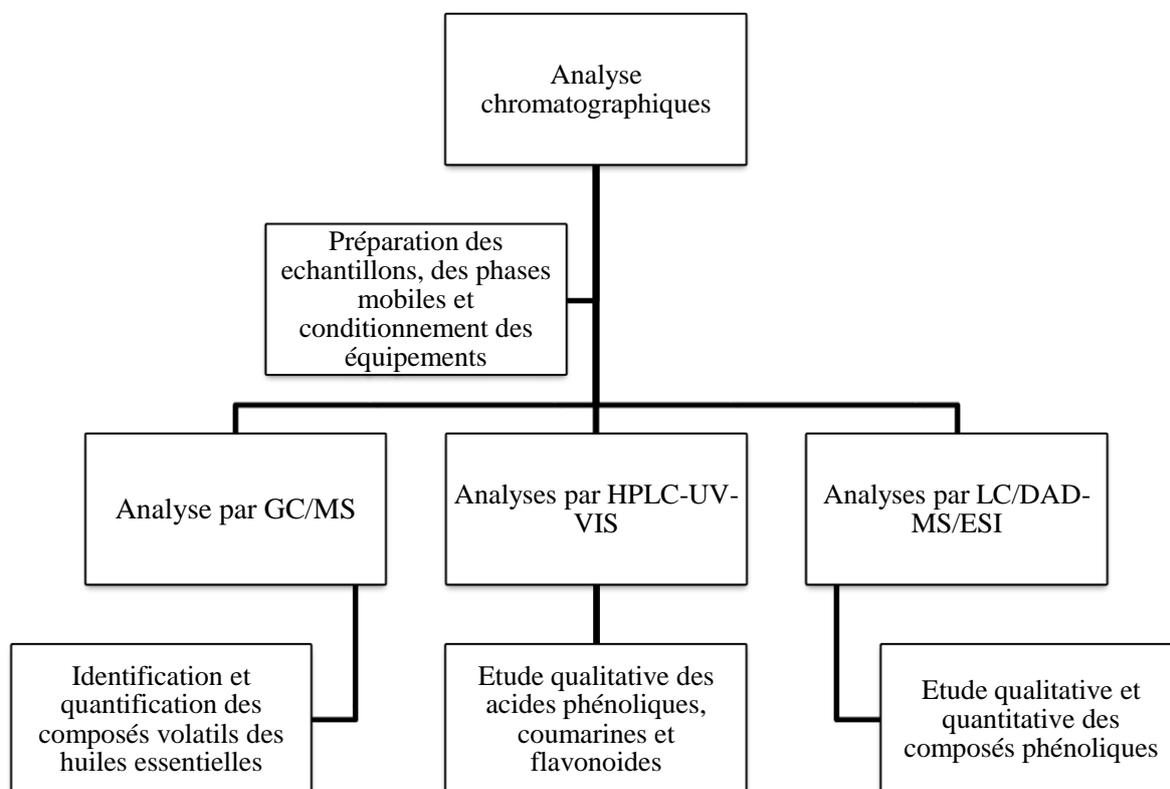
Des micro-dilutions ont été utilisées pour l'identification et la sensibilité des microorganismes (MicroScan®, SiemensMedical Solutions Diagnostics, West Sacramento, CA, USA). Les critères d'interprétation étaient fondés sur les points d'arrêt interprétatifs tels qu'indiqués dans l'Institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI, 2008) ; Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SEM) ; et au Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST, 2013).

### 7.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI a été considérée comme étant la plus faible concentration des solutions testées capables d'inhiber la croissance des bactéries (après 24 h à 37 ° C). La détermination de la CMI a été effectuée selon Kuete et al. (2011) avec quelques modifications (Pereira et al., 2015) en utilisant un essai colorimétrique rapide de chlorure de p-iodonitrotétrazolium (INT) par la méthode de microdilution. Concrètement, chaque extrait a été préparé en dissolvant 100 mg dans 1 ml de milieu liquide MHB ou TSB. 100 µl de chaque solution d'extrait (110 mg / mL) ont été dilués dans 400 µL de milieu MHB ou TSB selon les besoins en bactéries (en faisant une solution de 22 mg / mL). Ensuite, on ajoute 190 µL de cette solution d'extrait à chaque puits (microplaque à 96 puits) et on effectue des dilutions successives sur les puits contenant 90 µL de milieu. Ensuite, 10 µl d'inoculum ( $1,5 \times 10^8$  UFC / mL) ont été ajoutés à tous les puits de microplaques contenant les concentrations testées dans la plage de 20 à 0,156 mg / mL. Trois témoins négatifs ont été préparés (l'un avec MHB / TSB, l'autre avec l'extrait et le troisième avec le milieu et l'antibiotique). Pour les bactéries Gram-négatives, des antibiotiques comme l'amikacine (*K. pneumoniae* ESBL et *P. aeruginosa*), la tobramycine (*A. baumannii*), l'amoxicilline / l'acide clavulanique (*E. coli* et *K. pneumoniae*) et la gentamicine (*E. coli* ESBL) ont été utilisées. La CMI des échantillons a été déterminée après addition d'INT (0,2 mg / mL) et après incubation à 37 ° C pendant 30 min où une couleur rose réduite de couleur jaune indique des microorganismes viables.

## 8. Analyses chromatographiques

L'analyse chromatographique des différents extraits des plantes étudiées est conduite selon le schéma suivant :



**Figure 37.** Démarche de l'analyse chromatographique

### 8.1. Analyse des huiles essentielles par GC/MS

#### 8.1.1. Conditions chromatographiques

L'analyse semi-quantitative des huiles essentielles a été effectuée par un chromatographe Hewlett-Packard Agilent 2890 équipé d'une colonne capillaire type HP-5MS (30m x 0,25 mm i.d, film thickness 0,25  $\mu\text{m}$  ; Hewlett-Packard) avec du 5% Phenyl 95% diméthylpolysiloxane comme phase stationnaire, connectée à un détecteur (FID), la température du four a été programmée à 45°C pendant 8min, puis 7 °C / min à 250 °C, et en isotherme pendant 2 min pour une durée d'analyse de 127 min. Le volume injecté est 0,2  $\mu\text{l}$  en mode Split 20:1 à température de détection de 280 °C (interface) . Le gaz vecteur est l'hélium (99,995% de pureté) envoyé avec un débit de 0.5 ml/ min ; Les conditions du spectromètre de masse sont : l'analyseur de masse : quadripôles, une ionisation d'impact électronique de 70eV,

et la température de l'interface est de 300 °C, les spectres de masse d'électronisation ont été acquis en mode scan TIC (de 30 à 550) m/z.

### 8.1.2. Mode d'identification

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétentions en programmation de température à ceux cités par la littérature ainsi qu'à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions. Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcane (C<sub>6</sub> – C<sub>24</sub>) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon. Les indices de rétention désignés par IK calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100 \times \frac{(t_R)_i - (t_R)_n}{(t_R)_{n+1} - (t_R)_n} + 100n$$

- (t<sub>R</sub>)<sub>i</sub> : Temps de rétention du composé étudié ;  
(t<sub>R</sub>)<sub>n</sub> : Temps de rétention de l'alcane à **n** atomes de carbones qui précède le composé étudié ;  
(t<sub>R</sub>)<sub>n + 1</sub> : Temps de rétention de l'alcane à **1+n** atomes de carbones qui suit le composé ;  
n : Différence des nombres d'atomes de composé.

L'identification des constituants de l'HE se fait par comparaison du spectre de masse de chaque pic séparé par CG avec ceux reportés comme références dans des bibliothèques spécialisées de spectrométrie de masse (NIST 98, NIST 02 et Wiley 7N). La fiabilité de la reconnaissance est principalement, donnée par un taux de vraisemblance (supérieur à 90 %) du spectre de masse du soluté inconnu par rapport à celui de la banque de données. Cette présence est confirmée par le calcul des indices de Kovats propres à ce composant.

## 8.2. Analyses des acides phénoliques et flavonoïdes par HPLC-UV-VIS

### 8.2.1. Conditions chromatographiques

L'analyse qualitative par HPLC a été conduite pour détecter les acides phénoliques et les flavonoïdes présents dans les extraits étudiés avec une méthode en phase inverse en utilisant un chromatographe Youngling (YL9100 modèle HPLC) équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur à vide, d'un injecteur manuel et d'un détecteur UV-vis programmable (190-900 nm), la colonne est Purospher Star RP-C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) phase inversée thermostatée à 30 °C par un module de contrôle de la température de la colonne. Deux longueurs d'ondes 280 et 360 nm sont choisies en fonction du spectre d'absorption des acides phénoliques et flavonoïdes. La phase mobile est formée d'eau ultrapure à 1% HCOOH (solvant A) et ACN / MeOH / eau (95: 5: 5) solvant B : envoyée à un débit de 1 ml / min en mode gradient programmé avec les proportions du solvant B (v / v) suivantes : 0,00-5,00 min, 0% -8,5%; 5,00-16,50 min,

8,5% -2,0%; 16,50-35,00 min, 2,0% -18%; 35,00-50,00 min, 18% -20%; 50,00-65,00 min, 20% -30%; 65,00-80,00 min, 0% -30% suivie d'un rééquilibrage du système pendant 10 min avec les conditions initiales. Avant injection toutes les solutions préparées ont été filtrées sur des membranes de 0,22  $\mu\text{m}$ , et la phase mobile par une filtration sous vide et dégazage par préalable par ultrason avant passage à l'HPLC.

### **8.2.2. Identification des composés phénoliques**

Tous les acides phénoliques et flavonoïdes détectés ont été identifiés en faisant correspondre le temps de rétention et leurs caractéristiques spectrales avec ceux des 14 étalons externes utilisés ainsi que ceux trouvés dans la littérature une fois que possible pour soutenir l'identification.

### **8.2.3. Préparation de la solution des étalons**

On prépare une solution étalon-mère mixte de 1 mg / ml en pesant avec précision 25 mg des composés phénoliques choisie comme étalons dans une fiole jaugée de 25 ml et en complétant le volume avec le méthanol grade HPLC. Différentes solutions de travail ont été obtenues à partir de la solution mère par dilution appropriée dans le méthanol pour les courbes d'étalonnage et les déterminations de la limite de détection et de méthode. Toutes les solutions ont été maintenues dans un endroit sombre à  $-18^{\circ}\text{C}$  avant injection.

### **8.2.4. Choix des longueurs d'ondes et des étalons**

Les composés phénoliques absorbent bien dans la gamme UV avec une intensité d'absorption et une réponse différentes selon leur caractéristique structurales, par conséquent, le choix d'une détection appropriée et les longueurs d'onde de chaque analyte doivent être sérieusement envisagées et aucune n'est suffisante pour détermination simultanée dans des extraits de divers matériaux végétaux.

## **8.3. Analyses par LC-DAD-ESI/MS**

L'analyse par LC / MS a été effectuée en utilisant le système chromatographique Dionex Ultimate 3000 UPLC avec un détecteur à réseau de diodes (DAD) connecté à un spectromètre de masse LTQ XL à piège à ions linéaires (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). L'analyse UPLC a été effectuée en utilisant une pompe quaternaire, un dégazeur, un échantillonneur automatique (maintenu à  $5^{\circ}\text{C}$ ) et une colonne automatisée Waters Spherisorb S3ODS-2 C18 ( $3\ \mu\text{m}$ ,  $4,6 \times 150\ \text{mm}$ , Waters, Milford, MA, USA) thermostatée à  $35^{\circ}\text{C}$  pour la séparation chromatographique en utilisant des mélanges de deux solvants: 0,1% d'acide formique aqueux

(A) et d'acétonitrile (B) avec un débit de 0,5 mL / min. Les étapes d'élution sont les suivantes: 0-5 min 15% B, 5-10 min, 15% - 20% B, 10-20 min 20-25% B, 20-30 min, 25-35% B, 30- 40 min 35-50% B, le rééquilibrage ultérieur de la colonne a été réalisé après retour aux conditions initiales. Les longueurs d'ondes d'acquisition ont été fixées dans le DAD à 280 et 370 nm et dans un spectromètre de masse (MS) connecté via la sortie de cellule DAD. L'effluent de la colonne a été délivré à la source d'ions ESI avec un débit de 0,2 ml / min (fraction 2: 1). La détection MS avec ESI a été effectuée en mode négatif avec les paramètres suivants: N<sub>2</sub> comme gaz de gaine (50 psi), tension de pulvérisation 5 kV, température de source 325°C, tension capillaire -20 V, décalage de lentille de tube a été maintenu à une tension de - 66 V. Le balayage complet couvrait une gamme de masse charge (m/z) de 100 à 1500, l'énergie de collision était de 35 unités arbitraires. Le système de données Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) a été utilisé pour l'acquisition de données.

### **8.3.1. Identification et quantification des composés phénoliques**

L'identification des composés phénoliques a été obtenue en comparant les temps de rétention, les spectres UV-vis et de masse avec les composés standard disponibles. Sinon, les données disponibles rapportées dans la littérature ont été appliquées pour identifier provisoirement les composés. La quantification de ces composés a été calculée à partir des courbes d'étalonnage de chaque standard phénolique disponible construit sur le signal UV. Les composés phénoliques identifiés ayant un standard commercial non disponible ont été quantifiés via la courbe d'étalonnage de la norme la plus similaire disponible. Les analyses ont été effectuées en triplicata et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes et écarts types (DE), en mg / g d'extrait lyophilisé.

## 9. Incorporation des extraits de deux plantes dans une matrice alimentaire (huile d'olive)

### 9.1. Analyses physico-chimiques de l'huile d'olive

Selon l'conseil oléicole international (COI), pour évaluer l'évolution de l'oxydation de l'huile, trois principaux paramètres sont à considérer : *l'indice d'acide*, de *peroxyde* et *l'extinction spécifique*. Ces trois paramètres ont été déterminés, selon des méthodes normalisées respectivement : ISO 660, ISO 3960, ISO 3656.

#### 9.1.1. L'indice d'acide

L'indice d'acide est un facteur important pour évaluer la qualité d'une huile, et il est largement utilisé à la fois comme un critère de classification des huiles végétales et aussi un facteur qui renseigne sur l'altération de l'huile par hydrolyse. L'hydrolyse de triglycérides libère les acides gras, donc leur dosage permet d'avoir une idée sur l'état d'avancement de la dégradation de l'huile (Abdelaziz et al., 2015). L'IA correspond au nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres dans un gramme de corps gras (réaction n°1). La méthode consiste à doser les acides gras libres par une solution titrée de potasse (Benrachou, 2012).



#### ▪ Mode opératoire

Une prise d'essai de 1g est mélangée avec 50 ml d'éthanol en présence de quelques gouttes de phénophtaléine, comme indicateur coloré. Les fonctions carboxyliques libres sont dosées par une solution d'hydroxyde de potassium KOH éthanolique à 0,1 N jusqu'au virage de l'indicateur coloré (rose pale). L'indice d'acide est calculé selon la formule suivante :

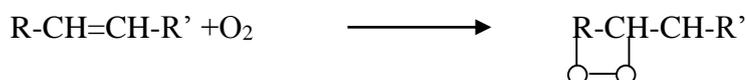
$$\text{IA} = \frac{56,1 * V * N}{P}$$

Où : V : le volume en ml de la solution titrée de KOH éthanolique utilisé pour le titrage, N : la normalité de KOH éthanolique 0,1 N, P : la prise d'essai en grammes, 56,1 : nombre de mg de KOH.

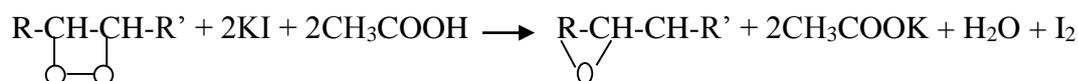
L'indice d'acide est exprimé en mg de KOH /g d'huile et il peut être exprimé aussi par le pourcentage d'acidité : %A = IA x 282,4 où ; 282,4 : Masse molaire de l'acide oléique.

### 9.1.2. L'indice de peroxyde

Indice de peroxyde augmente progressivement avec l'oxydation primaire de l'huile jusqu'à ce que le taux de dégradation des hydroperoxydes formés dépasse la formation de nouveaux hydroperoxyde. Pour les huiles d'olive extravierges, la norme européenne fixe la valeur maximale de cet indice à 20 Méq O<sub>2</sub>/Kg d'huile (Abdelaziz et al., 2015). L'indice de peroxyde d'un corps gras est le nombre de milliéquivalents d'oxygène actif (l'oxygène qu'existant sous forme de peroxyde, d'hydroperoxyde ou d'époxyde) contenu dans un kilogramme de matière grasse et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode titré par le thiosulfate de sodium ; ce paramètre renseigne sur le degré d'oxydation des huiles (Benrachou., 2012). En présence de l'oxygène de l'air, les acides gras insaturés s'oxydent en donnant les peroxydes selon la réaction suivante :



Sur une molécule de peroxyde, une molécule d'oxygène est fixée. Sur les deux atomes d'oxygène fixés, un seul est actif et est capable d'oxyder les iodures selon la réaction suivante :



L'iode libéré sera réduit par thiosulfate de sodium d'après la réaction suivante :



#### ▪ Mode opératoire

Dans un erlenmeyer on pèse 1g d'huile d'olive on et on ajoute 25 mL du mélange (10 :15 /v CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>COOH) avec 1 mL de la solution d'Iodure de potassium (KI) saturée. Après une agitation le mélange est laissé reposer pendant 5 min à l'abri de la lumière à température ambiante (15°C-25°C). 75 mL d'eau distillée sont additionnés ; l'iode libéré selon la réaction précédente est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) à 0,01N (coloration jaune) sous agitation continue, une solution d'amidon (1g/100ml ; 1mL) est employée comme indicateur de la coloration (basée sur le suivie de la disparition totale de la couleur bleue foncée). Un essai à blanc est conduit simultanément dans les mêmes conditions sans matière grasse. L'indice de peroxyde est exprimé en milliéquivalent d'oxygène actif par kg d'huile selon l'équation suivante :

$$\text{Indice de peroxyde (IP) (meq.)} = \frac{(\text{V ech} - \text{V blanc}) * \text{N} * 1000}{\text{P}}$$

Où :

$V_{ech}$  : le volume de thiosulfate de sodium de l'échantillon (ml)

$V_{blanc}$  : le volume requis pour titrer de blanc (ml)

N : normalité de la solution  $Na_2S_2O_3$  (0,01 N).

P : prise d'essai de l'huile en grammes.

### 9.1.3. Extinction spécifique

Tous les corps gras naturels contiennent de l'acide linoléique en quantité plus ou moins importante. L'oxydation d'un corps gras conduit à la formation d'hydroperoxydes linoléiques qui absorbent la lumière ultraviolette au voisinage de 232 nm. Si l'oxydation se poursuit, il se forme des produits secondaires d'oxydation, en particulier des cétones insaturées qui absorbent la lumière vers 270 nm.

Cependant, les diènes et les triènes conjugués sont à doser dans l'huile d'olive selon la norme du Conseil Oléicole International (2015). Cet examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse. La détermination de l'absorbance à 232 nm et au voisinage de 270 nm permet la détection et l'évaluation des produits primaires et secondaires de l'oxydation, lorsqu'ils ont une structure diénique conjuguée (Exp : hydroperoxyde linoléique C18:2), et des produits secondaires d'oxydation ayant une structure triénique (dans le cas de la présence d'acides gras à trois doubles liaisons).

#### ▪ *Mode opératoire*

Une quantité de 0,1 g de l'huile d'olive est dissoute dans 10 ml d'hexane. La lecture des absorbances est effectuée dans une cuve en quartz par rapport à celle du solvant, sur un spectrophotomètre équipé d'une fibre optique de 1 cm d'épaisseur. L'extinction spécifique (K) est mesurée selon l'équation suivante :

$$K = A_{\lambda} / C \times S, \text{ où :}$$

$A_{\lambda}$  : Absorbance à la longueur d'onde  $\lambda$ .

C : Concentration de la solution en g/100ml.

S : chemin optique (1cm).

### 9.2. Test de l'activité antioxydante

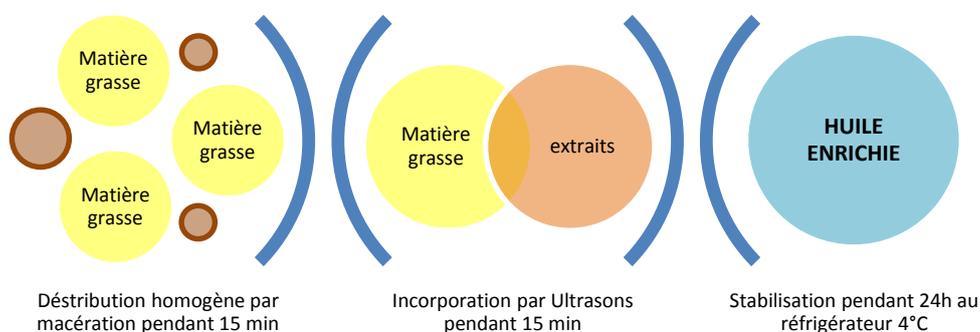
L'activité antioxydante des extraits de l'huile d'olive est testée avec le test DPPH et pouvoir réducteur comme cela était décrit dans les sections précédentes.

### 9.3. Enrichissement de l'huile d'olive

L'huile d'olive de la variété de *Neb djmel* (NJ) est enrichie par trois extraits : EtOH/H<sub>2</sub>O, aqueux, Ethyl-acétate des deux plantes choisies (*Saccaocalyx satureoides* et *Ptychotis verticillata*) à trois différentes concentrations (300 ; 500 et 900 ppm) afin de déterminer la meilleure concentration à utiliser pour une amélioration de la stabilité oxydative de l'huile évaluée lors d'un test d'oxydation forcée par Rancimat. Ces concentrations ont été additionnées séparément aux échantillons de l'huile d'olive.

#### ▪ Mode opératoire

Une quantité de 20 g d'huile d'olive est pesée dans un bécher de 100 mL ensuite différentes concentrations (300 ; 500 ; 900 ppm) des extraits ont été ajoutés indépendamment aux huiles et laisser 15 min sous macération avec une agitation au vortex chaque 5min pour une distribution homogène. Les échantillons sont mis en suite sous ultrasons pendant 15min afin de solubiliser l'extrait dans l'huile et produire des microsphères d'huile et d'extraits, les échantillons enrichies sont laissés au repos à 4°C pendant 24h. Une huile non enrichie est considéré comme témoin.



**Figure 38.** Schématisation du processus d'enrichissement de l'huile d'olive

### 9.4. Test Rancimat

Après 24 h de stabilisation au réfrigérateur les échantillons d'huile enrichie sont soumis à une thermo-oxydation forcée pour suivre leur dégradation. Le degré de rancissement a été déterminé par Rancimat (appareil Metrohm 743, Herisau, Suisse) selon la norme (ISO 6886).

Le principe du Rancimat consiste à l'oxydation accélérée des matières grasses par décomposition thermique. Les produits volatils de dégradation qui apparaissent sont expulsés par un courant d'air et transférés dans la cellule de mesure remplie d'eau distillée. Les changements de conductivité sont mesurés en continu. La courbe de la peroxydation a été enregistrée.



**Figure 39.** Rancimat metrom 743

#### ▪ **Mode opératoire**

On introduit 70 ml d'H<sub>2</sub>O distillée dans la cuve du Rancimat, puis on pèse exactement 5 g d'huile dans le tube de Rancimat. On actionne l'appareil jusqu'à atteindre la température d'échauffement voulue (110°C). Le débit d'air est fixé à 20 L/h. Tous les échantillons ont été analysés en triplicata, de même pour l'échantillon contrôle (huile d'olive seule). Les résultats sont exprimés en temps d'induction (heures) qui est le temps nécessaire pour atteindre le point de rupture de la courbe de peroxydation déterminé par conductimètre de façon entièrement automatique.

### **10. Analyses statistiques**

Tous les tests ont été effectués en triplicata et les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne  $\pm$  erreur standard. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance à sens unique (ANOVA) et les différences ont été considérées comme significatives à  $P < 0,05$  en utilisant le logiciel SPSS Statistics software (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Les IC 50 ont été déterminés par logiciel statistique, GraphPad Software, Inc. Version 5.00. Une analyse de classification en composantes principales ACP a été conduite par le logiciel SPSS 22.0.

# **Partie III :**

## **Résultats & Discussion**

---

## RESULTATS ET DISCUSSION

---

### 1. Evaluation des rendements d'extraction des composés phénoliques

Avant extraction les plantes étudiées on subit une étape de préparation, séchage, broyage et homogénéisation. L'extraction des composés bioactifs à partir de matières végétales est la première étape d'utilisation des produits phytochimiques et de détermination des propriétés des extraits obtenus (Hans-Jorg, 2011; Santos-buelga et al., 2012).

L'infusion est souvent la méthode d'extraction utilisée pour obtenir des extraits aqueux selon la méthode d'administration des plantes telle que décrite dans la médecine traditionnelle par les guérisseurs (Amin et al., 2016; Guimarães et al., 2013; Wink, 2015), l'eau servie à l'extraction est éliminée par séchage sous vide après congélation.

En règle générale, selon certaines études (Pinela et al., 2011) la lyophilisation conserve des niveaux plus élevés de teneur en composés phénoliques dans les extraits bruts que d'autres moyens d'évaporation. Par exemple, Asami et al., (2003) ont montré que les baies Marion lyophilisées, des fraises et du maïs avaient toujours un niveau total plus élevé de contenu phénolique par rapport à ceux séchés à l'air.

Toutes les espèces végétales ont été extraites au début par infusion et seulement trois espèces (*P. verticillata*, *S. saturreioides* et *L. guyonianum*) ont été extraites par d'autres solvants (EtOH :H<sub>2</sub>O ; Ethyl-acetate ; CHCl<sub>3</sub> et ButOH). Les rendements d'extraction (%) des plantes étudiées obtenus pour chaque type d'extrait sont représentés dans le tableau 10.

**Tableau 10.** Rendements d'extraction des plantes étudiées par différents solvants

Plante	Rendement d'extraction* (%)				
	Infusion	EtOH :H <sub>2</sub> O (80 :20)	Ethyl-acetate	CHCl <sub>3</sub>	ButOH
<i>Ptychotis verticillata</i>	15,90 ± 0,45	18,20 ± 0,12	16,74 ± 0,67	10,22 ± 0,58	16,20± 0,01
<i>Asteriscus graveolens</i>	14,34 ± 0,96				
<i>Haloxylon scoparium</i>	15,89 ± 0,30				
<i>Haloxylon salicornicum</i>	14,23 ± 0,76				
<i>Herniaria hirsuta</i>	12,55 ± 0,41				
<i>Arbutus unedo</i>	17,12 ± 0,13				
<i>Retama retam</i>	14,78 ± 0,67				
<i>Ajuga iva</i>	13,02 ± 0,75				
<i>Saccocalyx satureioides</i>	17,55 ± 0,13	19,14 ± 0,43	18,11 ± 0,05	11,67± 0,34	16,42± 0,25
<i>Thymus pallescens</i>	18,78 ± 0,07				
<i>Limoniastrum guyonianum</i>	14,77 ± 0,58	16,31 ± 0,05	17,20 ± 0,58	12,31 ± 0,23	12,19± 0,18
<i>Thymelea hisuta</i>	15,83 ± 0,62				

\*Toutes les valeurs dans le tableau sont moyennes de trois valeurs obtenues après l'analyse de l'échantillon en triplicata (n = 1x3) et représentées comme (Moyenne ± écart-type).

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction représentés dans le tableau ci-dessus, que pour le même type du solvant utilisé les rendements d'extraction diffèrent significativement d'une espèce végétale à l'autre et les deux espèces *T. pallescens* et *S. satureioides*, enregistrent les rendements les plus élevés à savoir en moyenne 18,78 % et 17,55% respectivement pour l'extrait aqueux (infusion). Egalement on remarque que les meilleurs rendements des quatre solvants d'extraction (Hydroethanolique, Ethylacétate, Chloroformique et Butanolique), sont enregistrés par macération assistée par ultrason en utilisant l'éthanol à 80% comme solvant à forte polarité soit une moyenne de 18,20 %, 19,14 % et 16,31% respectivement pour les espèces *P. verticillata*, *S. satureioides* et *L. guyonianum*.

Contrairement aux rendements d'extraction par infusion, les résultats des rendements obtenus par macération assistée par ultrasons, avec les autres solvants indiqués dans le tableau 10, montrent que l'éthylacétate est aussi un meilleur solvant d'extraction avec 16,74 %, 18,11 et 17,20% en moyenne suivi par le Butanol soit des moyennes de 16,20%, 16,42% et 12,19 % respectivement pour les espèces *P. verticillata*, *S. satureioides* et *L. guyonianum*. Le Chloroforme qui un solvant apolaire enregistre le rendement le moins élevé à savoir 12,31 % pour *L. guyonianum* suivie par *S. satureioides* soit 11,67% en moyenne. En revanche, le

rendement le plus bas est enregistré pour l'extrait chloroformique de l'espèce *P. verticillata* avec une moyenne de 10,22 %.

De ce fait, on constate que les rendements d'extraction diffèrent significativement en fonction de la plante donc de la famille botanique et aussi en fonction des systèmes du solvant utilisé qui permet d'obtenir des quantités variables de composants extractibles à partir de chaque plante. De même, la sonication assistée fournit des rendements nettement plus élevés (Chemat et al., 2016) par rapport aux autres techniques simples (ex : agitation magnétique).

De façon générale, certaines espèces de la famille des Lamiaceae représentées ici essentiellement par *T. pallescens* et *S. satureioides* ont significativement les rendements les plus élevés avec tous les systèmes d'extraction utilisés. Certaines études menées pour évaluer l'effet de l'extraction sur le rendement d'extraction des principes actifs à partir de plusieurs matrices végétales en appliquant différents solvants étaient en accord avec les résultats de la présente étude (Ashraf et al., 2016; Chenni et al., 2007; Sousa et al., 2008). Certains d'entre eux ont trouvé également que l'éthanol à 80% permet d'extraire une quantité maximale de composants solubles à partir des échantillons de plantes suite à la forte polarité de ce mélange hydroalcoolique.

En fait, selon Sarker & Nahar, (2009) la solubilité des composés phénoliques est régie par la nature chimique des composés de l'échantillon de plante, ainsi par la polarité des solvants utilisés. Les matières végétales peuvent contenir des composés phénoliques variant de simples (par exemple, les acides phénoliques, anthocyanes) à des substances hautement polymérisés (par exemple des tanins) en quantités différentes. En outre, les composés phénoliques peuvent également être associés à d'autres composants tels que des glucides et des protéines (Santos-buelga et al., 2012). Par conséquent, il n'y a pas de procédure d'extraction universelle appropriée pour l'extraction de tous les composés phénoliques de plantes.

Selon le système solvant utilisé lors de l'exaction, un mélange de composés phénoliques solubles dans le solvant est généralement extrait à partir de matières végétales (Dai et Mumper, 2010; Taylor et al., 2005). Il peut toutefois contenir des substances non phénoliques telles que les sucres, les acides organiques et les lipides. En conséquence, des mesures supplémentaires peuvent être nécessaires pour supprimer ces éléments indésirables (Sarker et Nahar, 2009).

Des solvants de différentes polarités tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques à partir de matières

végétales, ou en combinaison avec des proportions différentes de l'eau (Sousa et al., 2008; Yang et al., 2015).

Choisir le bon solvant affecte la quantité et le taux de composés phénoliques extraits (Dai et Mumper, 2010). En particulier, l'éthanol a généralement été trouvé pour être plus efficace dans l'extraction de polyphénols de poids moléculaire inférieur, tandis que les flavanols de poids moléculaire élevé sont mieux extraits à l'acétone / eau (Metivier, Francis, & Clydesdale, 1980 ; Labarbe et al., 1999). L'éthanol est également un bon solvant pour l'extraction de polyphénols sans danger pour la consommation humaine (Shi et al., 2005). Lors de la préparation des extraits phénoliques à partir de matières végétales, un solvant organique acidifié, le plus souvent le méthanol ou l'éthanol, est utilisé. Ce système solvant dénature les membranes cellulaires, à la fois dissout les composés phénoliques et les stabilise. Cependant, pour obtenir le meilleur rendement d'extraction, des acides organiques faibles tels que l'acide formique, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide tartrique et l'acide phosphorique, et de faibles concentrations d'acides forts, par exemple de 0,5 à 3,0% d'acide trifluoroacétique et <1,0% d'acide chlorhydrique sont recommandées (Nicoue, Savard, & Belkacemi, 2007 ; Revilla, Ryan, & Martin-Ortega, 1998).

## 2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante peut être due à des mécanismes différents, tels que la prévention de l'amorçage de la chaîne oxydative, la décomposition des peroxydes et la prévention de l'abstraction continue de l'hydrogène, le balayage des radicaux libres, la capacité de réduction et la liaison des catalyseurs d'ions de métaux de transition (Carocho et Ferreira, 2013a; Huang et al., 2005b).

Cependant, de nombreuses techniques sont disponibles pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou des mélanges complexes tels les extraits de plantes. Dans ce cadre, les extraits aqueux (infusions), les huiles essentielles ainsi que les extraits obtenus par des solvants organiques à partir des espèces de plantes algériennes provenant de 10 familles botaniques différentes ont été testés pour leur activité antioxydante en utilisant quatre essais complémentaires in vitro: *Piégeage du radical libre DPPH*, *pouvoir réducteur*, *inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène* et le *test TBARS*. La capacité antioxydante déterminée en  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits étudiés a été présentée dans les tableaux 11 et 12.

En fait, les infusions végétales obtenues présentent une activité différentielle (comme indiqué par la classification ANOVA), avec *L. guyonianum* comme l'espèce ayant la plus forte activité parmi toutes les autres infusions. Tandis que *A. iva* a montré la plus faible activité lors du test du pouvoir réducteur et du test DPPH, du même pour *H. hirsuta* lors du test d'inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène et l'inhibition de la formation de TBARS. On constate toutefois une grande disparité dans la capacité antioxydante comme cela a également été rapporté dans une étude antérieure avec des plantes algériennes, y compris certaines des plantes étudiées dans ce travail (Bakchiche et al., 2013).

Par ailleurs, la forte activité antioxydante des extraits aqueux de *L. guyonianum*, a également été reportée dans des échantillons prélevés en Tunisie en mesurant l'activité de piégeage du DPPH, la xanthine / xanthine oxydase et le test du pouvoir réducteur (Krifa et al., 2014; Trabelsi et al., 2014). Les résultats indiqués dans le tab. 2 montre que *L. guyonianum* et *T. pallescens* procèdent une activité de piégeage de DPPH similaire (*L. guyonianum*:  $EC_{50} = 64 \mu\text{g/mL}$ , *T. pallescens*:  $EC_{50} = 63 \mu\text{g/mL}$ ) et une réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  (*L. guyonianum*:  $EC_{50} = 61 \mu\text{g/mL}$ , *T. pallescens*:  $63 \mu\text{g/mL}$ ) avec des valeurs de  $EC_{50}$  dans le même intervalle que celles obtenues avec Trolox  $41 \mu\text{g/mL}$ . En outre, *A. iva* (activité de piégeage de DPPH:  $EC_{50} = 1335 \mu\text{g/mL}$ , Pouvoir réducteur:  $EC_{50} = 879 \mu\text{g/mL}$ ) avec *R. raetam* (activité de piégeage de DPPH:

EC<sub>50</sub> = 924 µg/mL et un pouvoir réducteur : EC<sub>50</sub>= 630 µg/mL) étaient les espèces présentant les plus faibles potentiels dans ces deux tests. De même, les infusions de *P. verticillata*, *A. unedo* et *S. satureioides* possèdent un pouvoir antioxydant aussi remarquable avec respectivement des valeurs d'EC<sub>50</sub> de 166, 199 et 236 µg/mL pour le test DPPH et des EC<sub>50</sub> de 152, 199 et 144 µg/mL pour le pouvoir réducteur.

**Tableau 11.** Activité antioxydante des extraits d'infusions (EC<sub>50</sub> ± Ecartype µg/mL) des plantes étudiées

	Activité du Piégeage du radical DPPH	Pouvoir réducteur	Test du blanchiment du β-carotene	Inhibition de formation des TBARS
<i>A. iva</i>	1335±18 a	879±1 a	553±13 cd	363±15 b
<i>Asteriscus graveolens</i>	648±6 d	452±9 d	494±26 e	139±7 e
<i>A. unedo</i>	199±3 h	199±2 f	267±19 f	56±2 g
<i>H. salicornicum</i>	263±9 g	151±4 g	508±39 de	61±3 g
<i>Haloxylon scoparium</i>	296±11 f	191±10 f	565±30 c	164±6 d
<i>Retama raetam</i>	924±16 b	630±12 b	582±16 c	189±2 c
<i>Thymus pallescens</i>	103±3 j	63±1 h	240±9 f	54±5 g
<i>Saccocalyx satureioides</i>	236±5 g	144±1 g	256±15 f	110±4 f
<i>Limoniasstrum guyonianum</i>	64±1 k	61±4 h	229±7 f	29±1 h
<i>Thymelaea hirsuta</i>	383±14 e	309±5 e	1007±5 b	131±2 e
<i>Herniaria hirsuta</i>	729±50 c	570±4 c	1110±96 a	481±36 a
<i>Ptychotis verticillata</i>	166±4 i	152±1 g	568±4 c	84±1 g
Trolox	42±2	41±2	18±1	23±2
Homoscedasticity <sup>2</sup> (p-value)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
1-way ANOVA <sup>3</sup> (p-value)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

<sup>1</sup>Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. Ce qui signifie que des valeurs élevées correspondent à un pouvoir réducteur ou à un potentiel antioxydant inférieur. EC<sub>50</sub>: Concentration d'extrait correspondant à 50% d'activité antioxydante ou 0,5 d'absorbance dans l'essai de pouvoir réducteur. <sup>2</sup>Homoscedasticity (L'antécédasticité) chez les espèces a été testée par le test de Levene: homoscedasticité, p > 0,05; Hétéroscedasticité, p < 0,05. <sup>3</sup>p < 0,05 indique que la valeur moyenne du paramètre évalué d'au moins une espèce diffère des autres (dans ce cas, des tests de comparaison multiples ont été effectués). Pour chaque condition d'espèce, les moyennes dans une colonne avec des lettres différentes diffèrent significativement (p < 0,05).

L'activité montrée dans les deux essais hydrophiles démontre les propriétés de donation d'électrons des molécules présentes dans les extraits, en particulier pour neutraliser les radicaux libres en formant des produits stables. Ce pouvoir peut être assuré par la présence de groupes donateurs d'électrons ou de prélèvements au niveau du système aromatique et de la glycosylation en 7ème position qui influencent fortement le potentiel rédox des composés phénoliques (Carocho et Ferreira, 2013a). A priori, comme le montre l'étude de caractérisation des extraits définie un peu plus bas (Section : analyses chromatographiques) il est tout à fait logique que *L.guyanianium* et *T. pallescens* possèdent un tel pouvoir antioxydant suite au fait que la majorité de leurs composés appartiennent à la famille des Flavonoïdes et des acides phénoliques avec un taux important de ces derniers comme l'acide 5-O-caffeoylquinic, l'acide chlorogénique, l'acide salvianolique, l'acide rosmarinique et l'acide Lithospermique.

En ce qui concerne les tests de peroxydation des lipides *L. guyonianum* ( $EC_{50} = 229 \mu\text{g/ml}$ ) a permis la meilleure inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène, suivie de près par *T. pallescens* ( $EC_{50} = 240 \mu\text{g/mL}$ ), *S. satureioides* ( $EC_{50} = 256 \mu\text{g/mL}$ ) et *A. unedo* ( $EC_{50} = 267 \mu\text{g/mL}$ ), étant également celle qui a empêché le plus la formation de TBARS ( $EC_{50} = 29 \mu\text{g/mL}$ ), suivie par *T. pallescens* ( $EC_{50} = 54 \mu\text{g/mL}$ ), *A. unedo* ( $EC_{50} = 56 \mu\text{g/mL}$ ), *H. salicornicum* ( $EC_{50} = 61 \mu\text{g/mL}$ ) et *P. verticillata* ( $EC_{50} = 84 \mu\text{g/mL}$ ). *H. hirsuta* a donné l'activité la plus faible lors du test du dosage d'inhibition de la peroxydation lipidique (inhibition de l'agent de blanchiment  $\beta$ -carotène:  $EC_{50} = 1110 \mu\text{g/ mL}$ , inhibition de la formation de TBARS:  $EC_{50} = 480 \mu\text{g/mL}$ ).

Cependant, *T. hirsuta* a montré une activité antioxydante plus élevée que les différents extraits provenant de la même plante poussant en Tunisie (Akrouit et al., 2011) et d'autres régions de l'Algérie (Amari et al., 2014; Djeridane et al., 2006). Les extraits méthanoliques d'*H. scoparium* provenant de la Lybie (Alghazeer et al., 2012), et de *S. satureioides* de la région de Ain safra de Tlemcen (Belmekki et Bendimerad, 2012a) et *P. verticillata* du Maroc (El Mokhtar et al., 2011) étaient similaires à ceux obtenus ici.

Dans une autre étude (Saada et al., 2014), *R. raetam*, de la Tunisie, a donné une activité de piégeage DPPH plus élevée, mais une réduction du pouvoir réducteur et une inhibition du blanchiment du  $\beta$ -carotène moins marquée. En fait, la présence de phénols et de nombreux autres groupes de composés phénoliques (à différentes concentrations) dans les extraits végétaux est un facteur déterminant pour empêcher l'oxydation des lipides (Rice-Evans et al., 1996), qui constitue l'une des plus fortes activités antioxydantes vérifiée par les espèces étudiées.

En effet, les phénols végétaux peuvent retarder l'apparition de l'oxydation des lipides et la décomposition des hydroperoxydes dans les produits alimentaires ainsi que dans les tissus vivants (Carocho et Ferreira, 2013a). L'activité détectée ne semble pas être liée à la famille botanique, car elle peut être déduite des résultats obtenus avec *A. iva*, *S. satureioides* et *T. pallescens*, qui ont une activité antioxydante bien distincte, bien qu'ils appartiennent à la même famille (Lamiaceae). Indépendamment des différences significatives détectées, la forte sensibilité de toutes les espèces analysées a été généralement mesurée dans l'inhibition de la formation de TBARS (valeurs inférieures de EC<sub>50</sub>).

Ainsi, pour mieux cerner l'efficacité antioxydante d'une plante, on utilise différents solvants d'extraction à différentes propriétés physico-chimiques pour extraire plusieurs familles chimiques de composés disponibles. La capacité antioxydante totale déterminée en EC<sub>50</sub> pour les tests DPPH et RP des extraits d'extraits hydro-éthanoliques, d'éthyle acétate, du chloroforme, et du butanol des plantes étudiées a été représentée dans le tableau 12.

**Tableau 12.** Activité antioxydante des extraits de solvants organiques (EC<sub>50</sub> ± Ecartype µg/mL) de *S. satureioides*, *P. verticillata* et *L. guyonianum*.

Plante	Extraits	Activité du Piégeage du radical DPPH	Pouvoir réducteur
<i>Saccocalyx satureioides</i> *	EtOH:H2O	138,83 ± 4	101 ± 7
	Ethylacetate	220 ± 15	102 ± 22
	Chloroforme	423 ± 23	502 ± 19
	Butanol	325,03 ± 14	311 ± 71
<i>Ptychotis verticillata</i>	EtOH:H2O	116 ± 50	88,69 ± 0,643
	Ethylacetate	313 ± 16	270 ± 11
	Chloroforme	397 ± 11	394 ± 2,5
	Butanol	272 ± 07	252 ± 14
<i>Limoniastrum guyonianum</i>	EtOH:H2O	35 ± 1,5	21 ± 0,75
	Ethylacetate	74 ± 3	55 ± 5
	Chloroforme	147 ± 4	120 ± 16
	Butanol	111 ± 14	97 ± 18
<b>BHT</b>		23 ± 2,24	29,7 ± 6
<b>Trolox</b>		50,58 ± 3,54	43,5 ± 4,25

\*: L'espèce choisie provient de la région de Mechria

Le DPPH est un radical libre et accepte un radical d'électrons ou d'hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable (Belmekki et Bendimerad, 2012b). La capacité de

réduction du radical DPPH a été déterminée par la diminution de l'absorbance par une DPPH réduite par des antioxydants végétaux.

Les propriétés antioxydantes des extraits des solvants ont été caractérisés par une plus grande propriété de piégeage des radicaux libres parfois proche pour certains extraits à celle des antioxydants synthétiques BHT (DPPH,  $EC_{50} = 23 \pm 2,24 \mu\text{g/mL}^{-1}$  ; RP,  $EC_{50} = 29,7 \pm 6 \mu\text{g/mL}^{-1}$  ) et le Trolox (DPPH,  $EC_{50} = 50,58 \pm 3,54 \mu\text{g/mL}^{-1}$  ; RP,  $EC_{50} = 43,5 \pm 4,25$ ) utilisés comme standards de comparaison.

La lecture du tab. 12 a révélé une capacité antioxydante ( $EC_{50}$ ) de  $35 \pm 1,5$  ;  $116 \pm 50$  et  $138,83 \pm 4 \mu\text{g/mL}$  pour le test DPPH et  $21 \pm 0,75$  ;  $88,69 \pm 0,643$  et  $101 \pm 7 \mu\text{g/mL}$  pour le test du pouvoir réducteur, enregistrées comme des meilleures valeurs respectivement pour les extraits hydroethanoliques de *L. guyonianum*, *P. verticillata* et *S. satureioides*. Cependant, les extraits d'éthylacétate et du Butanol ont manifestés un pouvoir plus ou moins similaire avec des valeurs proches pour les deux tests (DPPH et RP), l'extrait chloroformique était le moins actif vis-à-vis des deux tests pour les trois plantes choisies.

Cette activité antioxydante caractérisant les extraits des solvants pourrait être attribuée à la présence d'autres familles de composés phytochimiques. En fait, des études récentes ont montré que de nombreux flavonoïdes et des polyphénols apparentés et extraits par des solvant organiques contribuent de manière significative à l'activité antioxydante totale de nombreuses plantes médicinales (Belmekki et Bendimerad, 2012b; Guimarães et al., 2014). Ainsi, ces résultats corroborent les conclusions d'autres auteurs qui ont attribué les activités antioxydantes à la présence de composés phénoliques tel que ceux présents dans les espèces : *S. satureioides* (Bounatirou et al., 2007, Miguel et al., 2004) dans *L. guyonianum* (Krifa et al., 2014) et *P. verticillata* (Attou et al., 2017; Daira et al., 2016; El Mokhtar et al., 2011).

En fait, on a constaté que les molécules antioxydantes telles que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à donner de l'hydrogène (Norma et al., 2014). Les extraits hydro-éthanoliques obtenus à partir des trois meilleures plantes ont présenté une valeur moyenne d' $EC_{50}$  inférieure ( $<100 \mu\text{g/mL}$ ) comparativement à celles obtenues avec les infusions, révélant une activité antioxydante plus importante, attribuée à la nature chimique des composés phénoliques relativement plus solubles dans le complexe hydroalcoolique (Huang et al., 2005b).

Des résultats similaires ont été trouvés par (Belmekki et Bendimerad, 2012b; Chenni et al., 2007; Khaled-khodja et al., 2014) pour les deux espèces de la famille des lamiaceae (*Ajuga iva* et *S. satureioides*), qui ont démontré que la fraction phénolique des extraits polaires (méthanolique) possède une forte capacité pour éliminer les radicaux libres en réduisant le DPPH à la couleur jaune de diphenylpicrylhydrazine avec une  $EC_{50}$  de  $7.17 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$  évaluée pour l'extrait de *S. satureioides* (Belmekki et Bendimerad, 2012a) et de  $1.168 \pm 0.003 \text{ mg/mL}$  pour l'extrait d'*A. iva* (Khaled-khodja et al., 2014).

Ce pouvoir antiradicalaire pourrait être dû aux molécules présentes dans les extraits étudiés à caractère antioxydant telles que les acides phénoliques et les flavonoïdes qui réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à donner de l'hydrogène (Apak et al., 2007; Ramkissoon et al., 2012).

### 3. Evaluation de l'activité antitumorale

Les radicaux libres peuvent provoquer des mutations de l'ADN, un changement de l'activité enzymatique, la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire et aussi provoquer la mort cellulaire (Carocho et Ferreira, 2013b; Dai et Mumper, 2010). Nawab, Yunus, Mahdi, & Gupta, (2011) ont également démontré que les radicaux libres peuvent endommager l'ADN et causer la mutagenicité et la cytotoxicité. Cela peut entraîner une carcinogenèse. Les espèces réactives d'oxygène peuvent induire des mutations et inhiber le processus de réparation de l'ADN qui entraîne l'inactivation de certains gènes de répresseur de tumeur pour conduire à un cancer. Cependant, plusieurs rapports scientifiques décrivent les effets potentiels des composés naturels comme agents anticancéreux aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Carocho et Ferreira, 2013b).

D'ailleurs, les effets des extraits étudiés sur la croissance et la prolifération de quatre lignées tumorales (*MCF-7*, *NCI-H460*, *HeLa* et *HepG2*) a été déterminé et les valeurs de la  $GI_{50}$  (Growth Inhibition 50% ; concentrations qui ont provoqué 50% de l'inhibition de la croissance cellulaire) sont détaillées dans le tableau 13 (dans certains cas les concentrations testées ne permettaient pas de calculer les  $GI_{50}$ ). Ces lignées cellulaires ont été sélectionnées parce qu'elles sont bien caractérisées et représentatives des différents types de cellules tumorales les plus fréquents, avec des origines tissulaires différentes, utilisées pour cribler le potentiel antitumoral des extraits des plantes pris par administration orale sous forme d'infusion. L'Ellipticine, qui

est un très puissant composé antitumorale qui intercale avec l'ADN et inhibe la topoisomérase II, a été utilisé comme témoin positif.

**Tableau 13.** Propriétés cytotoxiques (Valeurs  $GI_{50}$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}^1$ ) des infusions préparées à partir des espèces des plantes étudiées les valeurs sont présentées en moyenne  $\pm$  Ecartype.

Espèces	$GI_{50}^1$	NCI H460				
		MCF7 (Cancer du sein)	(Carcinome pulmonaire non à petites cellules)	HeLa (Carcinom e cervical)	HepG2 (Carcinome hépatocellulaire)	PLP2 (Cellules du foie porcine)
<i>Ajuga iva</i>	>400 a	>400 a	>400 a	>400 a	>400 a	>400 a
<i>A.graveolens</i>	20 $\pm$ 2 g	16 $\pm$ 1 h	29 $\pm$ 1 g	11 $\pm$ 1 g	174 $\pm$ 8 d	
<i>Arbutus unedo</i>	288 $\pm$ 4 c	>400 a	66 $\pm$ 1 f	66 $\pm$ 2 e	>400 a	
<i>H.salicornicum</i>	60 $\pm$ 4 f	235 $\pm$ 10 e	74 $\pm$ 6 f	79 $\pm$ 13 d	>400 a	
<i>H. scoparium</i>	69 $\pm$ 8 f	183 $\pm$ 17 f	169 $\pm$ 5 e	78 $\pm$ 7 de	265 $\pm$ 5 b	
<i>Retama raetam</i>	347 $\pm$ 5 b	313 $\pm$ 7 c	242 $\pm$ 17 c	267 $\pm$ 18 b	>400 a	
<i>Thymus pallescens</i>	17 $\pm$ 1 g	248 $\pm$ 6 d	222 $\pm$ 22 d	49 $\pm$ 6 f	>400 a	
<i>S. satureioides</i>	278 $\pm$ 23 c	352 $\pm$ 7 b	345 $\pm$ 10 b	181 $\pm$ 3 c	>400 a	
<i>L. guyonianum</i>	26 $\pm$ 3 g	66 $\pm$ 7 g	70 $\pm$ 3 f	22 $\pm$ 1 g	208 $\pm$ 7 c	
<i>Thymelaea hirsuta</i>	197 $\pm$ 7 d	62 $\pm$ 3 g	257 $\pm$ 3 c	270 $\pm$ 11 b	>400 a	
<i>Herniaria hirsuta</i>	>400 a	>400 a	>400 a	>400 a	>400 a	
<i>P. verticillata</i>	164 $\pm$ 7 e	>400 a	245 $\pm$ 20 c	89 $\pm$ 4 d	>400 a	
Ellipticine	1.21 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.05	1.10 $\pm$ 0.05	2.3 $\pm$ 0.2	
Homoscedasticity <sup>2</sup>						
(p-value)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
1-way ANOVA <sup>3</sup>						
(p-value)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

<sup>1</sup>Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne  $\pm$  écart-type. <sup>2</sup>L'Homoscédasticité chez les espèces a été testée par le test de Levene: homoscedasticité,  $p > 0,05$ ; Hétéroscedasticité,  $p < 0,05$ . <sup>3</sup> $p < 0,05$  indique que la valeur moyenne du paramètre évalué d'au moins une espèce diffère des autres (dans ce cas, des tests de comparaison multiples ont été effectués). Pour chaque condition d'espèce, les moyennes dans une colonne de lettres différentes diffèrent significativement ( $p < 0,05$ ).

En comparaison avec l'activité antioxydante observée, les résultats pour les propriétés cytotoxiques ont montré une grande dissemblance. Dans ce cas, *A. graveolens* a donné l'activité globale la plus forte. En ce qui concerne la lignée MCF7, *T. pallescens* ( $GI_{50} = 17 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), *A. graveolens* ( $GI_{50} = 20 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) et *L. guyonianum* ( $GI_{50} = 26 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), étaient les infusions les

plus puissantes. Par contre, les mauvais résultats ont été vérifiés pour *A. iva*, où la  $GI_{50}$  était plus élevée que la concentration maximale testée (400  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). En fait, *A. iva* n'a pas montré de cytotoxicité dans aucune des lignées cellulaires analysées ( $GI_{50} > 400 \text{ g} / \text{mL}$ ), ce qui s'avère être l'espèce ayant le plus faible potentiel antitumoral, avec *A. unedo*, *H. hirsuta* et *P. verticillata* (Pour la lignée cellulaire NCI-H460) et *H. hirsuta* (pour les lignées cellulaires HeLa et HepG2).

D'autre part, *A. graveolens* a montré le potentiel le plus élevé contre les lignées cellulaires HeLa et HepG2, avec *L. guyonianum* dans toutes les lignées cellulaires. Il y a peu d'études signalant l'activité antitumorale de la majorité des plantes étudiées, mais les résultats obtenus ici ont montré une activité plus faible pour l'espèce *A. unedo* avec les mêmes lignées cellulaires comparativement à d'autres études réalisées sur la même espèce provenant du Portugal (Guimarães et al., 2014). Tandis qu'une activité similaire a été constaté pour les extraits aqueux de *L. guyonianum* de la Tunisie sur les cellules de cancer du col de l'utérus inhospitalières (Kriba et al., 2013b). Il est intéressant de noter que la même étude a démontré que l'extrait de galle n'a aucun effet sur les kératinocytes humains normaux lorsque les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'extrait de galle pendant 24 et 48 h. Ces observations sur les cellules normales n'ont pas été confirmées au cours de la présente étude, car les infusions de *A. graveolens* et *L. guyonianum* ont également exercé une inhibition sur la culture primaire hépatique non tumorale (PLP2). Akrouf et al., (2010) indiquent également que l'infusion de *T. hirsuta* tunisienne n'a montré aucune activité, mais que les extraits d'hexane et d'éthanol/Eau ont été particulièrement actifs contre la croissance des cellules HT-29 (cancer du colon) (58,19% et 65,54% respectivement).

En ce qui concerne les effets des infusions de *H. scoparium* et *H. salicornicum*, une forte activité a été observée pour le cancer du sein (MCF7), cancer du cerveau (HeLa) et le cancer hépatocellulaire (HepG2), car des faibles valeurs d' $IG_{50}$  (tab.13) ont été enregistrées aux alentours de 60 et 170  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Néanmoins, aucune des infusions d'*A. iva*, *A. unedo*, *R. raetam*, *T. pallescens*, *H. salicornicum*, *S. satureioides*, *Thymelaea hirsuta*, *Herniaria hirsuta* et *Ptychotis verticillata* n'a manifesté une hépatotoxicité dans la culture de cellules primaires du foie porcin (PLP2) ( $IG_{50} > 400 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Les résultats obtenus sont en accord avec d'autres études qui n'ont pas signalé une inhibition de la croissance dans les cellules normales pour les espèces *Thymelaea hirsuta* et le *Thymus algeriensis*, mais une réduction significative de la viabilité dans diverses lignées de

cellules cancéreuses humaines, principalement pour les espèces *Thymelaea hirsuta* (Akrouit et al., 2011) et les huiles essentielles de *T. algeriensis* (Nikolic et al., 2014).

L'absence d'activité cytotoxique dans les infusions d'*A. iva* et d'*H. hirsuta*, a été précédemment rapporté par certains auteurs (Atmani et al., 2004; Chenni et al., 2007). Il convient de souligner que certaines des plantes étudiées ici ont été utilisées dans différentes applications traditionnelles pour traiter le cancer tel que le cas de *Thymelaea hirsuta*, *L. guyonianum* et *A. graveolens* qui présentait un profil de traitement exceptionnel avec des activités anticancéreuse contre plusieurs autres types de tumeurs, principalement le cancer du sein. Ceci vient confirmer les résultats du pouvoir antitumoral de ces plantes montré lors de ce travail scientifique.

Néanmoins, la caractérisation chimique (profile en composé phénoliques) et bioactivité (antioxydante et antimicrobienne) des infusions (la préparation la plus utilisée) de ces plantes, ont été développés ici dans les sections suivantes où on a pu signaler que la quercétine (présente dans les infusions du *T. Pallescens* sous forme de *Quercetin-3-O-glucoside*, isolée à partir de différentes plantes médicinales, possédait une cytotoxicité contre diverses lignées cellulaires de cancer humain (Son et Anh, 2013).

On a découvert également que la quercétine inhibait la croissance de la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 avec  $GI_{50} = 5,2 \text{ ug / ml}$ , la lignée cellulaire de cancer du côlon HT-29 avec  $GI_{50} = 81,2 \text{ mM}$  (Jorge et al., 2010); Lignée de cellules cancéreuses HeLa avec  $GI_{50} = 546,2 \pm 1,87 \text{ } \mu\text{g / ml}$  (dosage MTT) (Murat et al., 2011); et le carcinome du côlon humain HCT116 avec  $GI_{50} = 20,1 \text{ } \mu\text{g / ml}$ . En plus, l'acide rosmarinique identifié comme composé majoritaire dans *T. pallescens* possède une action anticancéreuse évaluée en par plusieurs auteurs (Al-Dhabi et al., 2014; Hossan et al., 2014), les autres composés identifiés dans les infusions du *T. pallescens* à savoir la Luteolin-7-O-glucuronide et le Kaempferol-O-glucuronide ont prouvé un potentiel antitumoral remarquable sur les lignées (MCF-7, HT-29, HCT-116) et (LNCaP, DU-145) selon les résultats reportés par les études de (Dai et Mumper, 2010).

Quant à la Myricétine identifiée comme le flavonoïde le plus dominant dans la composition de l'infusion de *L. guyonianum* qui a manifesté un grand potentiel antitumoral sur les quatre lignées étudiées, certaines études (Semwal et al., 2016) exhibent son action puissante contre le cancer principalement en tant qu'un anticancérogène puissant et antimutagène. Bien

que la propriété anticancéreuse de la myricétine ait été attribuée principalement à son action antioxydante, elle a des mécanismes de protection supplémentaires tels que l'inhibition de l'activation STAT1 (transducteur de signal et activateur de transcription 1) (Scarabelli et al., 2009). La voie JAK1 / STAT3 peut jouer un rôle dans la transformation cellulaire et la carcinogénèse. Une étude *in vitro* sur les cellules épidermiques de souris activées par facteur de croissance épidermique a indiqué que la myricétine pourrait cibler directement JAK1 pour bloquer la transformation cellulaire, en se liant directement aux molécules JAK1 / STAT3 et en inhibant ainsi la transformation cellulaire. À partir des trois flavonols (myricétine, quercétine et kaempferol) testés lors de l'étude précédente, la myricétine a montré l'effet inhibiteur le plus fort sur la transformation cellulaire.

Des extraits phénoliques ou des polyphénols isolés de différentes plantes ont été étudiés dans un certain nombre de lignées cellulaires cancéreuses représentant différents stades évolutifs du cancer. Par exemple, on a montré que des extraits contenant des composés bioactifs y compris les anthocyanes, le kaempferol, la quercétine, les esters de l'acide coumarique et de l'acide ellagique inhibaient la croissance du cancer du sein (MCF-7), de colon (HT-29, HCT-116) et de prostate (LNCaP, DU-145) de manière dépendante avec une sensibilité différente entre les lignées cellulaires (Zhang et al., 2008 ; Seeram et al., 2006).

En comparant la diversité phytochimique des extraits étudiés avec leur efficacité antiproliférative, on peut suggérer que la composante clé liée à l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses pourrait être les composés phénoliques avec plusieurs groupements OH principalement de la famille des flavonoïdes (Quercitine, Myrectine, Kompherol et luteoline) et aussi certains acides phénoliques (acide rosmarinique, acide lithospermique). Des constatations similaires ont également été rapportées dans plusieurs travaux sur des systèmes cellulaires avec des extraits de raisin et des polyphénols isolés du vin (resvératrol, quercétine, catéchine et épicatechine), l'extrait de thé et les principaux polyphénols de thé vert (épicatechine, épigallocatechine, épicatechine-3 gallate et l'épigallocatechine-gallate), bien que les concentrations efficaces dépendent du système et des substances testées (Dai et Mumper, 2010).

D'autres extraits ou composés phénoliques intensément étudiés sont présent dans les olives, des légumineuses, des agrumes, des pommes, et aussi la curcumine de l'épice le curcuma. Par exemple, les flavonoïdes d'agrumes inhibent fortement la croissance des cellules leucémiques HL-60 (Manthey, Grohmann, & Guthrie, 2001).

#### 4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les agents pathogènes résistants aux médicaments antimicrobiens (ADR) sont un sérieux problème dans l'environnement clinique (Vadhana et al., 2015). La capacité des composés phénoliques dérivés des plantes, d'une manière générale, est bien connue pour être une source illimitée d'agents antimicrobiens à forts potentiels avec des effets toxiques généralement plus faibles (Cushnie et Lamb, 2011; Kozyra et al., 2017; Rauha et al., 2000).

Dans cette section, dix isolats cliniques représentant des bactéries Gram-positives et Gram-négatives connues pour présenter un taux de résistance élevé aux médicaments (Pendleton et al., 2013) ont été utilisés dans la méthode de microdilution au bouillon avec une évaluation colorimétrique INT. Les résultats de l'activité antibactérienne obtenue pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des infusions préparées à partir des trois plantes sont résumés dans le tableau 14.

D'ailleurs, comme l'indique les résultats des activités biologiques précédents, les infusions ont montré des différentes actions selon l'espèce utilisée et selon le type de l'analyse effectuée. De ce fait, l'activité antimicrobienne c'est limité sur le choix des trois plantes (*T. pallescens*, *S. satureioides* et *P. verticillata*) en se basant sur les résultats de leur pouvoir antioxydant évalués par les tests précédents et aussi sur leur contenance en huile essentielle.

De façon générale, les résultats ont clairement démontré différents degrés d'inhibition de la croissance. En ce qui concerne les bactéries Gram positives qui étaient plus sensibles, que les Gram-négatives des concentrations de CMI inférieures allant de 2,5 à 10 mg/mL ont été obtenues, l'infusion de *T. pallescens* a montré une activité antibactérienne presque similaire, tandis que l'infusion de *S. satureioides* a révélé une activité plus élevée contre *E. coli* avec des effets inhibiteurs meilleurs (CMI = 5 mg/mL) contre une CMI de 10 mg/mL pour *T. pallescens*. Alors que l'effet le plus faible a été observé pour les bactéries Gram négatives, les CMI variaient de 5 à  $\geq 20$  mg/ml.

En fait, *Pseudomonas aeruginosa* a donné les CMI les plus élevés ( $\geq 20$  mg / mL). Pour toutes les plantes, tandis que, l'infusion de *P. verticillata* a eu un effet faible contre les Gram-négatives, sauf contre *E. coli* ULSNE et *E. coli* CHTMAD et *Klebsiella* qui étaient les microorganismes les plus susceptibles avec un CMI de 20. Aussi une activité modérée contre les Gram- positives a été constaté pour l'infusion de *P. verticillata*. Bien que, aucun rapport sur

**Tableau 14 :** Effet antibactérien (CMI en mg/mL) des extraits aqueux de *S. satureioides*, *T. pallascens* et *P. verticillata*.

Extrait de plante	[C] mg/mL	Croissance des souches bactériennes									
		Gram -						Gram +			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ESBL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	<i>Morganella morganii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i> CHTMAD	<i>L. monocytogenes</i>	MRSA*	MSSA
<i>S. satureioides</i>	20	-	-	-	-	+		-	-	-	-
	10	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	5	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	2,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. pallescens</i>	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	2,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. verticillata</i>	20	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
témoin		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Les souches bactériennes utilisées ont été obtenues à partir d'isolats cliniques auprès de patients hospitalisés : 06 bactéries Gram-négatives: *Morganella morganii* et *Pseudomonas aeruginosa* isolées d'expectoration, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* producteur étendu de  $\beta$ -lactamases (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae*, producteur étendu de  $\beta$ -lactamases (ESBL) ,Isolé de l'urine; Et quatre bactéries Gram-positives: *Enterococcus faecalis* isolé d'urine, *Listeria monocytogenes* isolé du liquide céphalo-rachidien, MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline isolé de l'exsudat de la plaie et MRSA: *S. aureus* résistant à la méthicilline, isolé de l'expectoration. + : indique la croissance bactérienne et - : indique la non croissance

les effets antibactériens des extraits aqueux et organiques de *S. saturoioides* et *P. verticillata*, a été rapporté. Alors que, selon d'autre étude (Guesmi et al., 2014), les CMI obtenues pour les huiles essentielles de *Thymus hirtus* sp. et *T. algeriensis* de Tunisie sont légèrement plus élevés que le Chloramphénicol, l'Ampicilline et la Streptomycine, ainsi que *T. algeriensis* Eos de Zentan (Libye) a eu une activité antibactérienne importante, en particulier contre *S. mutans*, une espèce cariogène reconnue, la même observation a été obtenue avec *T. algeriensis* Eos de l'Algérie (Hazzit et al., 2009).

Les résultats trouvés suggèrent que les extraits présentent des composés bioactifs avec un large spectre d'activité contre les bactéries Gram + et Gram-. De même, selon la caractérisation ci-dessous, les flavonoïdes (flavones et flavonols) représentaient la majorité des compositions chimiques et représentaient la classe dominante de composants dans *T. algeriensis*. Cependant, ces composés peuvent servir d'antibiotiques en raison de leur capacité à se complexer avec des protéines extracellulaires solubles et à se complexer avec des parois cellulaires bactériennes, entraînant souvent leur inactivation et leur perte de fonction (Cushnie et Lamb, 2011; Wink, 2015).

De nombreux travaux de recherche ont identifié la structure des flavonoïdes qui possèdent une activité antibactérienne. Des exemples de tels flavonoïdes a forte action antimicrobienne sont l'apigénine (Cushnie et Lamb, 2011; Sato et al., 2000), luteolin et luteolin 7-glucoside (Cushnie et Lamb, 2011; Martins et al., 2014; Sato et al., 2000), divers quercétine glycosides (Li et Xu, 2008; Martins et al., 2014; Rauha et al., 2000) et le kaempferol et ses dérivés (Teffo et al., 2010). D'autres flavones (Alcaraz et al., 2000; Cushnie et Lamb, 2011; Sato et al., 1996, 2000; Zheng et al., 1996), les glycosides de flavone (Cushnie et Lamb, 2005; Sato et al., 1996), isoflavones (Dastidar et al., 2004; Hong et al., 2006; Mukne et al., 2011), flavanones (Alghazeer et al., 2012; Iinuma et al., 1994), les glycosides de flavonol (Cushnie et al., 2007; Liu et al., 2007) avec une activité antibactérienne ont également été identifiés.

L'extrait aqueux obtenu à partir de *Thymus vulgaris* montre une activité antimicrobienne contre des souches bactériennes ATCC (Ben et al., 2015; Guesmi et al., 2014; Martins et al., 2014).

Concernant l'activité antimicrobienne de *S. saturoioides*, Seulement les huiles essentielles ont été antérieurement étudiées (Bendahou et al., 2014) et montrent un fort potentiel contre des souches ATCC de bactéries (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* et *Salmonella typhimurium*).

Selon les résultats obtenus pour l'analyse HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>, l'activité antibactérienne obtenue contre les souches pathogéniques utilisées pourra être expliquée par le large spectre de polyphénols identifiés dans les infusions (section suivante), qui agissent en tant que substances bioactives via différents mécanismes d'action. En fait, plusieurs mécanismes d'action sont décrites pour les polyphénols, tel que l'engendrement de dommages dans la membrane cytoplasmique, inhibition des acides nucléiques et la synthèse des membranes cellulaires (Cushnie et Lamb, 2005; Wink, 2015). Toutefois, en plus de leur action directe certains travaux scientifiques suggèrent que les polyphénols peuvent interférer avec certains facteurs de virulence tels que les enzymes, les toxines et les récepteurs du signal (Cushnie et Lamb, 2011, 2005; Daglia, 2012; Wink, 2015).

Des flavonoïdes plus lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes (Cushnie et Lamb, 2005; Taleb-contini et al., 2003). Le site (s) et le nombre de groupes hydroxyle sur le groupe phénol sont censés être liés à leur toxicité relative pour les microorganismes, avec des preuves que l'hydroxylation accrue entraîne une toxicité accrue (Mukne et al., 2011; Vadhana et al., 2015; Wink, 2015). En outre, certains auteurs ont distingué que les phénols plus fortement hydroxylés sont plus inhibiteurs (Cushnie et Lamb, 2005; Vadhana et al., 2015; Wink, 2015) ces auteurs indiquent que les mécanismes jugés responsables de la toxicité phénolique pour le microorganisme comprennent l'inhibition de l'enzyme par les composés oxydés, éventuellement par réaction avec des groupes sulfhydryle ou par des interactions plus spécifiques avec les protéines et l'inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique ainsi que l'inhibition.

## 5. Dosage des composés bioactifs

### 5.1. Dosage des composés bioactifs dans les infusions

Les tests utilisés pour l'analyse des composés phénoliques sont généralement classés comme ceux qui mesurent la teneur en composés phénoliques totaux ou celles de quantification d'un groupe ou une catégorie spécifique de composés phénoliques (Zhang et al., 2013). Parmi de tels procédés on a la méthode de Folin-Denis (FD), la méthode de Folin-Ciocalteu (F-C), le titrage du permanganate, colorimétrie avec des sels de fer, et l'absorbance UV. Dans la plupart des cas, le F-C a été trouvé préférable par rapport aux autres méthodes (Dai et Mumper, 2010). L'essai F-C repose sur le transfert d'électrons dans un milieu alcalin à partir de composés phénoliques de complexes d'acide phosphomolybdique / phosphotungstique pour former des complexes bleu (le cas échéant  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$  qui sont déterminés par spectroscopie à environ 760 nm (Parsaeimehr et al., 2010). L'acide gallique est largement utilisé comme norme de comparaison. Les résultats du dosage des composés phénoliques sont représentés dans le tableau 15.

Compte tenu des niveaux élevés d'activité antioxydante et de cytotoxicité pour certaines des plantes étudiées, une analyse préliminaire sur les composés bioactifs présents dans toutes les infusions et certains extraits de solvants organiques a été effectuée.

Suite à la nature polaire des extraits, l'analyse effectuée a été orientée pour les composés hydrophiles, en particulier les composés phénoliques. De plus, l'activité antioxydante des espèces végétales est souvent liée à leur teneur en composés phénoliques (Carocho et Ferreira, 2013a; Dai et Mumper, 2010; Piluzza et Bullitta, 2011), vu que ces composés sont connus pour leurs propriétés rédox, agissant comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, désactivateurs d'oxygène singulet ou chélateurs d'éléments métalliques (Huang et al., 2005b).

**Tableau 15.** Phénols totaux (mg GAE/g extrait), flavonoïdes (mg CE/g extrait), esters tartriques (mg CAE/g extrait) et flavanols (mg QE/g extrait) quantifiés dans les infusions des plantes.

Teneur <sup>1</sup> Espèces	Phénols totaux (mg GAE/g d'infusion lyophilisée)	Flavonoïdes (mg CE/g d'infusion lyophilisée)	Esters (mg CAE/g d'infusion lyophilisée)	Flavonols (mg QE/g d'infusion lyophilisée)
<i>Ajuga iva</i>	78±1 j	14±1 i	52±2 e	10±1 i
<i>Asteriscus graveolens</i>	124±3 h	29±1 h	74±3 d	32±1 e
<i>Arbutus unedo</i>	175±5 f	56±2 f	56±2 e	34±1 d
<i>H. salicornicum</i>	284±10 b	69±2 d	76±10 d	7±1 j
<i>Haloxylon scoparium</i>	230±8 e	56±1 f	22±1 g	19±1 g
<i>Retama raetam</i>	125±4 h	15±1 i	115±11 b	11±1 i
<i>Thymus palleescens</i>	463±20 a	194±9 a	186±3 a	85±3 a
<i>S. satureioides</i>	244±4 d	91±2 c	105±2 c	54±1 c
<i>L. guyonianum</i>	262±4 c	47±2 g	19±2 g	16±1 h
<i>Thymelaea hirsuta</i>	131±6 g	62±1 e	55±1 e	27±1 f
<i>Herniaria hirsuta</i>	90±1 i	46±3 g	38±1 f	26±1 f
<i>Ptychotis verticillata</i>	259±3 c	103±5 b	112±3 bc	55±1 b
Homoscedasticity <sup>2</sup> (p-value)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
1-way ANOVA <sup>3</sup> (p- value)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

<sup>1</sup> Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne ± écart-type. <sup>2</sup>L'Homoscédasticité chez les espèces a été testée par le test de Levene: homoscélasticité, p > 0,05; Hétéroscélasticité, p < 0,05. <sup>3</sup>p < 0,05 indique que la valeur moyenne du paramètre évalué d'au moins une espèce diffère des autres (dans ce cas, des tests de comparaison multiples ont été effectués). Pour chaque condition d'espèce, les moyennes dans une colonne de lettres différentes diffèrent significativement (p < 0,05).

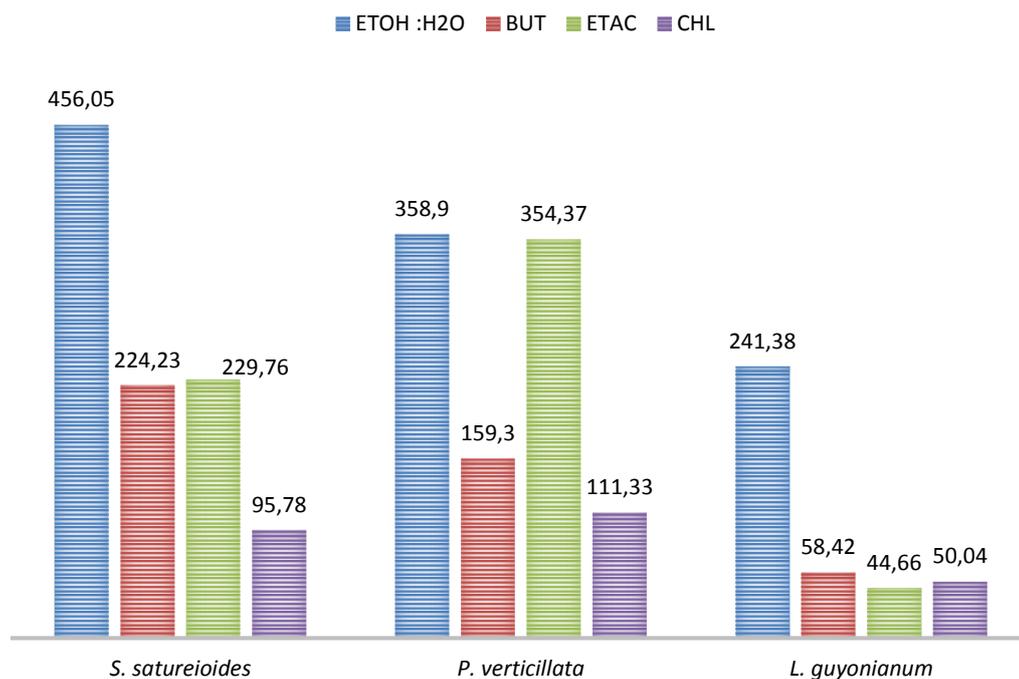
Les concentrations les plus élevées de phénols totaux (463 mg GAE / g), de flavonoïdes (194 mg CE / g), d'esters tartriques (186 mg CAE / g) et de flavonols (85 mg QE / g) a été noté chez *T. palleescens*, qui était également l'une des espèces ayant l'activité antioxydante la plus forte ainsi qu'une action cytotoxique importante.

En revanche, les niveaux les plus bas de phénols totaux ont été quantifiés dans *A. iva* (78 mg GAE / g de perfusion lyophilisée). Cette espèce a également montré des quantités minimales de flavonoïdes (14 mg CE / g de perfusion lyophilisée), avec *R. raetam* (15 mg CE/g d'infusion lyophilisée), tandis que *L. guyonianum* (19 mg CAE / g d'infusion lyophilisée) et *H. scoparium* (22 mg CAE / g d'infusion lyophilisée) présentaient les taux les plus faibles d'esters tartriques et *H. salicornicum* (7 mg QE / g d'infusion lyophilisée) présentait les valeurs les plus faibles des flavonols.

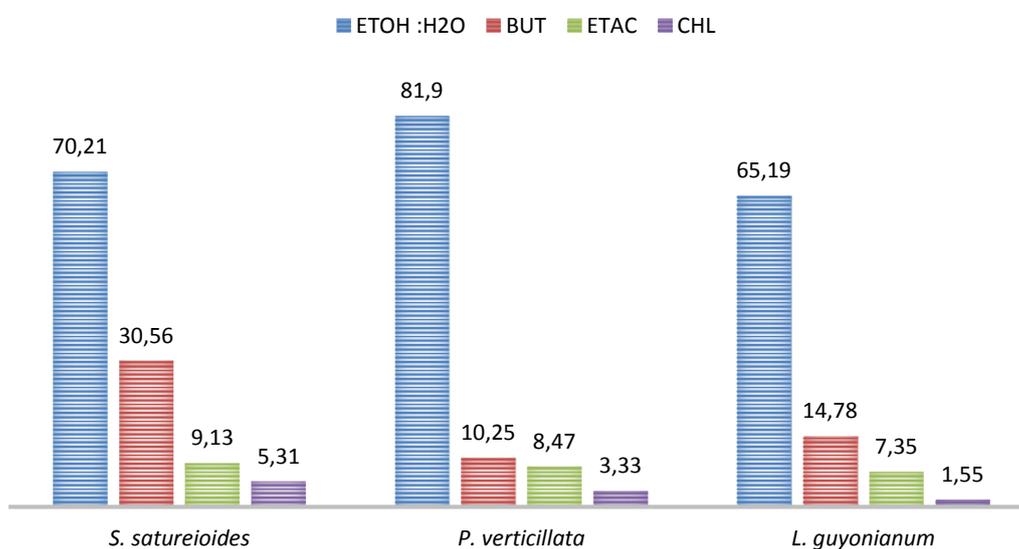
Les résultats pour les composés bioactifs d'*A. iva* (Khaled-khodja et al., 2014), *A. unedo* (Guimarães et al., 2014), *P. verticillata* (El Ouariachi et al., 2014), *R. raetam* (Saada et al., 2014), *T. hirsuta* (Amari et al., 2014) sont dans le même intervalle que ceux rapportés précédemment. Néanmoins, *L. guyonianum* étudié ici a révélé des quantités plus faibles de composés phénoliques et de flavonoïdes que ceux rapportés dans les échantillons tunisiens (Trabelsi et al., 2013), tandis que *S. satureioides* étudiée a donné des teneurs beaucoup plus élevées en phénols et en flavonoïdes que celles rapportées précédemment (Belmekki et Bendimerad, 2012).

## **5.2. Dosage des composés phénoliques des extraits des solvants organiques**

La teneur en phénols totaux et flavonoïdes présents dans les extraits obtenu par solvants à partir de *S. satureioides*, *P. verticillata* et *L. guyonianum* sont représentés sur les figures 40, et 41.



**Figure 40.** Teneur en phénols totaux (mg GAE/g extrait), de *S. satureioides*, *P. verticillata* et *L. guyonianum* en fonction du type du solvant, EtOH :H2O : Extrait Ethanol/Eau ; BUT: Extrait Butanolique ; ET-AC : extrait Ethylacétate, CHL : Extrait Chloroformique.



**Figure 41.** Teneur en flavonoides (mg CE/g extrait), de *S. satureioides*, *P. verticillata* et *L. guyonianum* en fonction du type du solvant, EtOH :H2O : Extrait Ethanol/Eau ; BUT: Extrait Butanolique ; ET-AC : extrait Ethylacétate, CHL : Extrait Chloroformique.

Les figures 40 et 41 résument les résultats de la détermination quantitative des phénols totaux (TPC), des flavonoïdes (TFC), présents dans les extraits des quatre solvants utilisés. Les phénols totaux ont été déterminés en équivalents d'acide gallique en milligrammes par gramme de poids sec (mg GAE / g ES) tandis que les TFC ont été calculés en équivalents de catéchine en milligrammes par gramme de poids sec (mg CE / g Es).

Les extraits des solvants organiques des trois plantes ont été caractérisées par des TPCs, des TFCs plus ou moins importants en fonction de la polarité du solvant utilisé. Les fortes teneurs en TPCs sont enregistrés pour l'extrait hydroethanolique de *S. satureioides* ( $456,05 \pm 0,73$  mg GAE / g ES), *P. verticillata* ( $358,9 \pm 0,24$  mg GAE / g ES) et *L. guyonianum* ( $241,38 \pm 0,06$  mg GAE / g ES). De même la figure 41 indique que l'extrait hydroethanolique détient les teneurs les plus élevées en flavonoïdes avec *S. satureioides* ( $70,21 \pm 0,75$  mg CE / g ES) et *P. verticillata* ( $81,9 \pm 0,95$  mg CE / g ES) trouvées comme les plus riches espèces.

L'extrait d'éthylacétate renferme aussi des teneurs importantes en phénols totaux et flavonoïdes, surtout pour l'espèce *S. satureioides* et *P. verticillata* avec des valeurs de  $229,76 \pm 2,5$  mg GAE / g ES et  $354,37 \pm 1,2$  mg GAE / g ES, respectivement.

L'espèce *L. guyonianum* a données des teneurs très faibles en composés phénoliques extractibles par les autres solvants utilisés BUT :  $58,42 \pm 0,05$ , ETAC :  $44,66 \pm 3,5$  et CHL :  $50,04 \pm 0,15$  ;

L'extrait chloroformique n'a donné généralement que de très faibles valeurs en composés phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes), ce qui est totalement prédictible vue la forte polarité de ces molécules non extractibles par un solvant apolaire.

D'autre part, il n'existe pas de données dans la littérature sur les phénols et flavonoïdes des extraits des solvants organiques de ces plantes et, pour la première fois, ils ont été étudiés en ce qui concerne leur teneur en phénols totaux et flavonoïdes.

Récemment, certains auteurs (Abdelrazag, 2013; Belmekki & Bendimerad, 2012; Toubal, Djahoudi, Henchiri, & Bouazza, 2012) ont étudié la teneur en composés phénoliques de ces plantes, y compris les extraits hydrométhanoliques de *S. satureioides* et ont trouvé des phénols totaux plus élevés que  $31,1$  mg GAE / g ES (Belmekki & Bendimerad, 2012). De plus, Aira et al., (2016) ont mentionné que les TPC de la sous-fraction polaire d'*Ammoides verticillata* étaient de  $124,3$  lg GAE / mg et étaient plus forts par rapport à nos données.

Trabelsi et al., (2013, 2014) ont évalué la teneur phénolique totale des extraits de *L. guyonianum* tunisiens, et ont trouvé une teneur phénolique similaire proche ( $19,2$  mg d'équivalent d'acide gallique / g d'extrait sec).

La diversité structurale des composés phénoliques affectent leur propriétés physico-chimiques, tels que la solubilité et les caractéristiques de répartition. La polarité des composés varie significativement avec leur structure, leur statut de conjugaison et leur association avec la matrice de l'échantillon ; Les formes liées et les composés phénoliques de haut poids moléculaire peuvent être tout à fait insolubles. En outre, les composés phénoliques ne sont pas uniformément répartis dans la plante et leur stabilité varie de manière significative ; Certains sont relativement stables et d'autres sont volatiles, thermolabiles et / ou facilement sujettes à l'oxydation (Santos-buelga et al., 2012).

En raison de la nature chimique du F-C, il est en effet une méthode qui mesure les composés phénoliques totaux et d'autres substrats d'oxydation. L'autre substrat d'oxydation présent dans un échantillon d'extrait donné peut perturber la mesure des composés phénoliques totaux par un effet inhibiteur, additif ou améliorateur (Dai et Mumper, 2010). Les effets inhibiteurs pourraient être dus aux oxydants en concurrence avec le réactif F-C et / ou l'oxydation de l'air après que l'échantillon est alcalinisé. Pour cette raison, le réactif de F-C est ajouté à l'avance de l'alcalinisation.

Les effets additifs se produisent à partir de phénols imprévus, des amines aromatiques, des niveaux élevés de sucre ou de l'acide ascorbique dans les échantillons.

Cependant, le test F-C est simple et reproductible et a été largement utilisée pour la quantification des composés phénoliques dans des matières végétales et d'extraits. Le dosage le plus simple pour la quantification les composés phénoliques est basé sur la mesure de l'absorption à une longueur d'onde précise avec des maxima du spectre dans le domaine des UV.

On pense que les composés phénoliques favorisent une santé optimale en partie par l'intermédiaire de leurs effets antioxydants et de piégeage des radicaux libres, protégeant ainsi les composants cellulaires contre les lésions induites par les radicaux libres. Mais en raison de leurs structures chimiques diverses, ils sont susceptibles de posséder des capacités antioxydantes différentes (Dapkevicius et al., 2002).

## 6. Analyses chromatographiques

### 6.1. Analyses chromatographiques des huiles essentielles par GC/MS

Les espèces de la famille des Lamiaceae et des Asteraceae sont d'importantes plantes médicinales et aromatiques, dont beaucoup produisent des huiles essentielles (Kabouche, 2005). La composition chimique de la fraction volatile de *P. verticillata* (Asteraceae) et *S. satureioides* (Lamiaceae) n'a pas été largement étudiée et des études scientifiques sont en cours de dévoilement. La détermination du profil phytochimique de leurs huiles essentielles a été réalisée lors de cette étude au moyen d'une analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à une spectroscopie de masse (GC/MS).

#### 6.1.1. Rendements en huiles essentielles

Les rendements moyens (en %) obtenus varient en fonction de l'espèce et l'origine des plantes étudiées (tableau 16). En effet, l'H.E. de *P. verticillata* a donné un meilleur rendement (3,85%) par rapport aux autres échantillons de *S. satureioides*. D'ailleurs au sein de cette dernière espèce des échantillons de la région de Mechria ont donné un meilleur rendement en H.E. (2,97%) que ceux de Aouank Djmel, Asla (Nâama), Bedrous (Saida), El baiod et Tiert, avec respectivement des valeurs de 2,65%, 2,43%, 2,21%, 2,04% et 1,97%.

Pour *P. verticillata* le rendement obtenu est proche à ceux trouvés par Daira et al., (2016) Daira et al., (2016) qui ont constaté que le rendement en huile essentielle de cette espèce poussant à l'étage sub humide de la région de Ouled Driss de souk ahras, est de 2,21%. Par ailleurs, Bendahou et al., (2011), ont indiqué que les rendements en huile essentielle de *S. satureioides* de Ain safra à l'ouest algérien obtenues par extraction assistée par micro-ondes et extraction conventionnelle par hydrodistillation, vont de 1 % à 2,3%. Cependant, d'autres études ont trouvés des rendements qui ne dépassent pas 2% (Biondi et al., 2006).

Néanmoins, les rendements des H.E. de *P. verticillata* du Maroc sont légèrement supérieurs à ceux de l'échantillon de l'Algérie étudié lors de ce travail. En Algérie, Daira et al., (2016), ont enregistré des rendements inférieurs par rapport à ceux obtenus dans cette étude avec un taux de  $1,9 \pm 0,25$  % pour la région de Ain Zana et de  $1,91 \pm 0,1$  pour la région de Mechrouha,  $2,16 \pm 0,1$  pour la région semi-aride de Merrahna et  $1,77 \pm 0,44$  et  $1,99 \pm 0,08$  respectivement pour les régions semi arides de Regouba et Oum El-Adaim. Cependant, les rendements obtenus sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par la même espèce poussant à Pakistan indiqués dans l'étude publiée par Ashraf et al., (2016) et qui varient entre 3,5–5,2 %.

### 6.1.2. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique de l'huile essentielle isolée à partir des parties aériennes de *P. verticillata* collectée à Guelma et de *S. satureioides* collectées à Saida, Tieret, Naama et Mechria, qui connaissent des conditions climatiques et géographiques plus ou moins différentes, a été déterminée par analyse GC / MS.

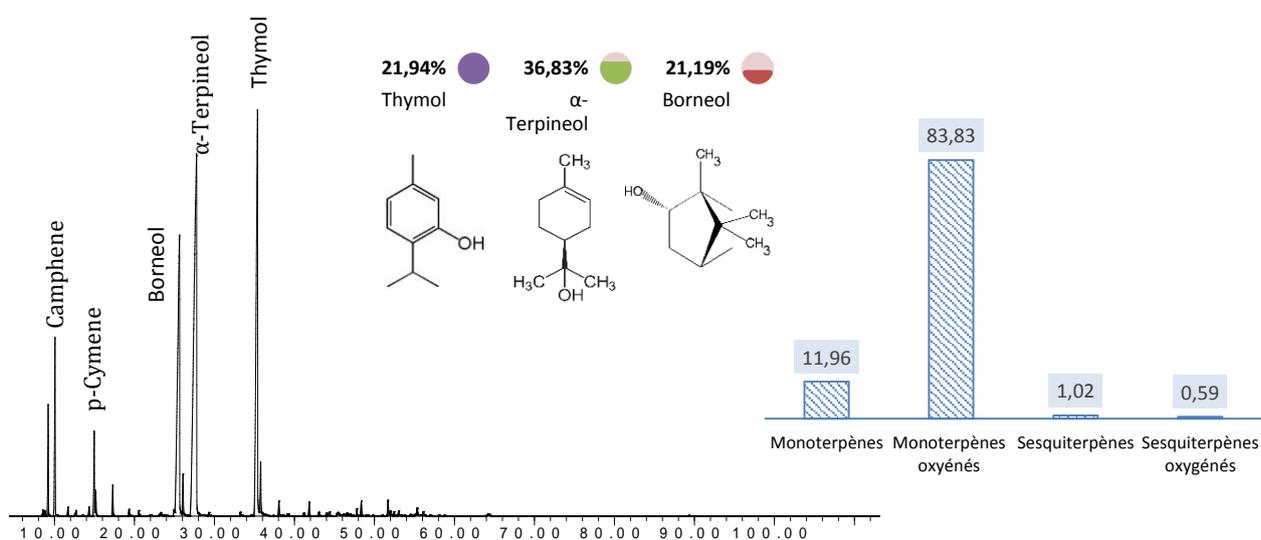
Lors de la collecte des échantillons, on a pris soin de recueillir toutes les plantes au même stade de développement et à la même saison. Ces analyses chromatographiques des huiles essentielles (tableau 16) de *P. verticillata* ont identifiées seize (16) composés représentant 99,83% de la composition globale contre environ trente-deux (32) composés pour *S. satureioides* qui représentent approximativement 97,29% de la composition chimique totale pour les échantillons de Mechria, 98,98% pour la région de Aouank Djmel, 98,35% pour Asla Naama et 98,26%, 99,08% et 99,38% respectivement pour les régions de Bedrous, El baiod et Tiert. Les monoterpènes sont plus abondants chez les deux espèces que les sesquiterpènes mais l'H.E. de *P. verticillata* qui contient le pourcentage le plus élevé de monoterpènes (41%) par rapport à *S. satureioides* (16,17%, comme valeur maximale pour l'échantillon de Bedrous-Saida). Les monoterpènes oxygénés sont les plus abondants avec un pourcentage dans l'intervalle de (81,12 – 87,18%) pour tous les échantillons de *S. satureioides* et de 58,83% pour *P. verticillata*. Inversement, les sesquiterpènes sont inexistant dans l'HE de cette dernière espèce tandis qu'ils sont présents en faibles quantités entre 0,84% contre 1,5% dans les HE des différents *S. satureioides*. En effet, comme le montre le tableau 16, on a déterminé environ 32 composés différents qui existent presque dans tous les échantillons choisis des différentes régions de l'ouest Algérien.

**Tableau 16 :** Composition chimique des huiles essentielles des plantes identifiées par GC/MS.

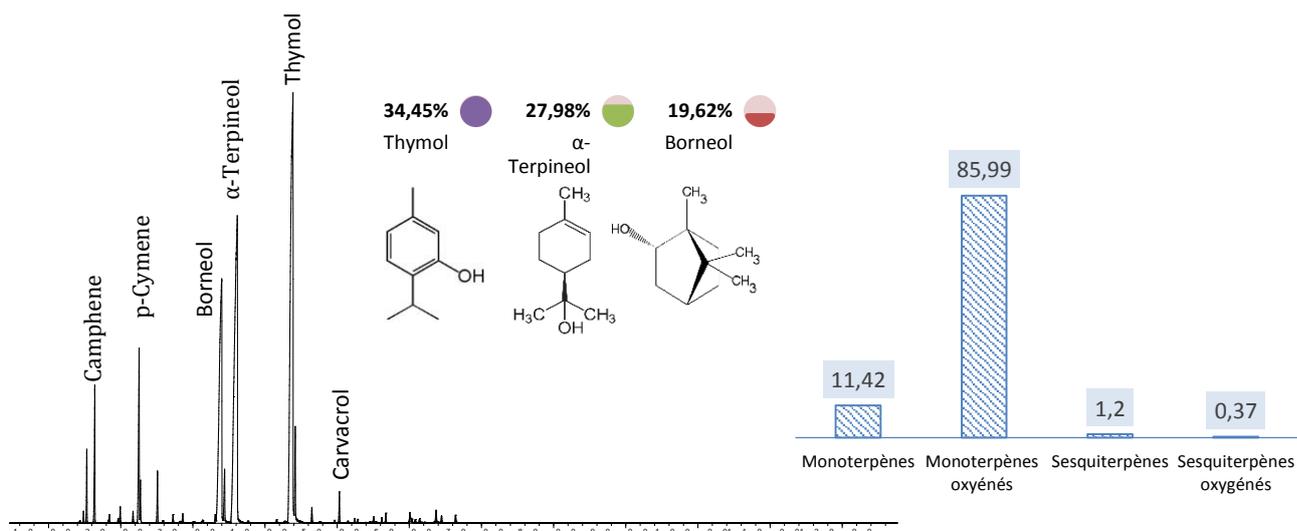
Composés <sup>[1]</sup>	IR <sup>[2]</sup>	S . M	S A j N	S A N	S B s	S E B	S s T	P V	Identification <sup>[3]</sup>
	HP5MS								
1. Tricyclene	923	0,16	t	t	0,07	t	0,1	-	Ir-SM
2. $\alpha$ -Thujene	925	t	0,22	0,18	0,39	0,23	0,46	0, 12	Ir-SM
3. $\alpha$ -Pinene	939	2,66	1,32	1,22	2,39	1,4	2,69	-	Ir-SM
4. Camphene	951	4,47	2,78	2,32	4,58	2,87	5,13	-	Ir-SM
5. $\beta$ -Pinene	978	0,23	0,22	0,15	0,32	0,22	0,35	-	Ir-SM
6. $\beta$ -Myrcene	992	0,22	0,29	0,22	0,41	0,42	0,42	0,17	Ir-SM
7. $\alpha$ -Phellandrene	1007	0,13	-	-	-	-	-	-	Ir-SM
8. $\alpha$ -Terpinene	1017	0,24	0,24	0,22	0,3	0,24	0,29	0,27	Ir-SM
9. p-Cymene	1026	2,21	4,45	3,44	5,48	4,61	5,58	14,2	Ir-SM
10. Limonene	1044	0,65	0,73	0,62	0,87	0,72	0,84	-	Ir-SM
11. $\beta$ - Phellandrene	1045	t	t	t	t	t	t	0,2	Ir-SM
12. $\gamma$ -Terpinene	1060	0,81	1	0,94	1,2	1,08	1,14	26,04	Ir-SM
13. $\alpha$ -Terpinolene	1093	0,18	0,17	0,16	0,16	0,14	0,12	-	Ir-SM
14. Linalool	1104	0,18	0,2	0,15	0,19	0,2	0,19	-	Ir-SM
15. Borneol	1167	21,19	19,62	16,57	19,2	20,62	19,37	t	Ir-SM
16. 4-Terpineol	1177	1,34	1,33	1,4	1,41	1,52	1,29	0,17	Ir-SM
17. $\alpha$ -Terpineol	1190	36,89	27,98	27,93	26,23	26,71	26	t	Ir-SM
18. Thymol	1235		t	t	1,1	t	t	5,98	Ir-SM
methylether									
19. Carvacrolmethyl ether	1245	0,07	t	0,3	2,0	t	t	-	Ir-SM
20. Cis-dihydrocarvone			t	t	0,14	t	t	-	Ir-SM
21. Borneol acetate		0,11	t	t	0,08	0,08	t	-	Ir-SM
22. Thymol	1297	21,94	34,45	39,02	31,74	33,77	32,05	52,01	Ir-SM
23. Carvacrol	1317	1,62	2,1	1,23	2,21	2,23	1,91	0,67	Ir-SM
24. Terpinylacetate	1356	t	t	0,2	-	t	t	t	Ir-SM
25. Thymylacetate	1362	0,38	0,31	0,28	0,31	0,34	0,31	t	Ir-SM
26. $\alpha$ -Copaene	1372	0,11	t	0,1	-	t	t	-	Ir-SM
27. Eugenol	1373	t	t	-	0,1	t	t	-	Ir-SM
28. $\beta$ -Caryophyllene	1417	t	0,64	0,71	0,54	0,62	0,43	-	Ir-SM
29. $\beta$ -Selinene		0,10	0,09	0,21	0,08	0,17	0,3	-	Ir-SM
30. Germacrene D	1480	0,17	0,15	0,15	0,13	0,15	0,11	-	Ir-SM
31. $\gamma$ -Cadinene	1511	0,22	0,11	0,13	0,09	0,1	t	-	Ir-SM
32. $\delta$ -Cadinene	1519	0,42	0,21	0,28	0,17	0,19	t	t	Ir-SM
33. $\alpha$ -Cadinol	1650	0,59	0,37	0,22	0,47	0,45	0,3	t	Ir-SM
<b>Rendement (% w/w)</b>		2,97	2,65	2,43	2,21	2,04	1,97	3,85	
<b>Composés identifiés (%)</b>		97,29	98,98	98,35	98,26	99,08	99,38	99,83	
▪ <i>Monoterpènes</i>		11,96	11,42	9,47	16,17	11,93	17,12	41	
▪ <i>Monoterpènes oxygénés</i>		83,83	85,99	87,18	84,71	85,47	81,12	58,83	
▪ <i>Sesquiterpènes</i>		1,02	1,2	1,58	1,01	1,23	0,84	0	
▪ <i>Sesquiterpènes oxygénés</i>		0,59	0,37	0,22	0,47	0,45	0,3	0	
<b>Activité antioxydante</b>									
<b>DPPH (EC50 en <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		278 $\pm$ 8,03	317 $\pm$ 17,77	300 $\pm$ 8,83	413 $\pm$ 13,97	360 $\pm$ 9,59	390,82 $\pm$ 8,89	270 $\pm$ 14,68	
<b>Pouvoir réducteur (EC50 en <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		224 $\pm$ 7,56	291 $\pm$ 20	253 $\pm$ 12,56	304 $\pm$ 14	297 $\pm$ 8,17	287 $\pm$ 5,88	197 $\pm$ 7,45	

**S . M** : *S. saturoioides* de Mechria ; **S A j N** : *S. saturoioides* Aouk Djmel ; **S A N** : *S. saturoioides* Asla Nâama ; **S B s** : *S. saturoioides* Bedrous Saida **S E B** : *S. saturoioides* El baiod **S s T** : *S. saturoioides* Tiert ; **P V** : *P. verticillata* ; 1 : Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne non polaire HP5MS ; 2 Indices de rétention relatifs aux n-alcanes C7-C23 ; 3 Identification : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.05%) ; \* tentative d'identification.

Bien qu'il n'y ait pas de différences qualitatives très marquées dans la composition de tous les échantillons de l'espèce *S. satureioides* récoltées, l'H.E. (obtenue des parties aériennes) prélevée de Aouk Djmel, Asla, Bedrous, El baiod et Tiert contiennent du *Thymol* déterminé à avoir une concentration plus élevée avec respectivement les pourcentages suivants, 34,45 % ; 39,02 % ; 31,74 % ; 33,77 % et 32,05 %. De même, le thymol était le composé dominant dans l'H.E. de *P. verticillata* avec plus de 50% de la composition globale. L' $\alpha$ -Terpineol avec une concentration d'environ 36% a été trouvé comme le composant principal dans l'échantillon de *S. satureioides* de Mechria, de même, toutes les autres H.E. collectées à partir de Aouk Djmel, Asla, Bedrous, El baiod et Tiert (Tableau 16, fig.42, 43, 44 et 45) contiennent également de l' $\alpha$ -Terpineol comme composés principale avec des pourcentages légèrement différents. Les autres composants principaux de l'huile essentielle sont le borneol, la p-cymène, le camphène dans toutes les espèces de *S. satureioides* de différentes régions étudiées.



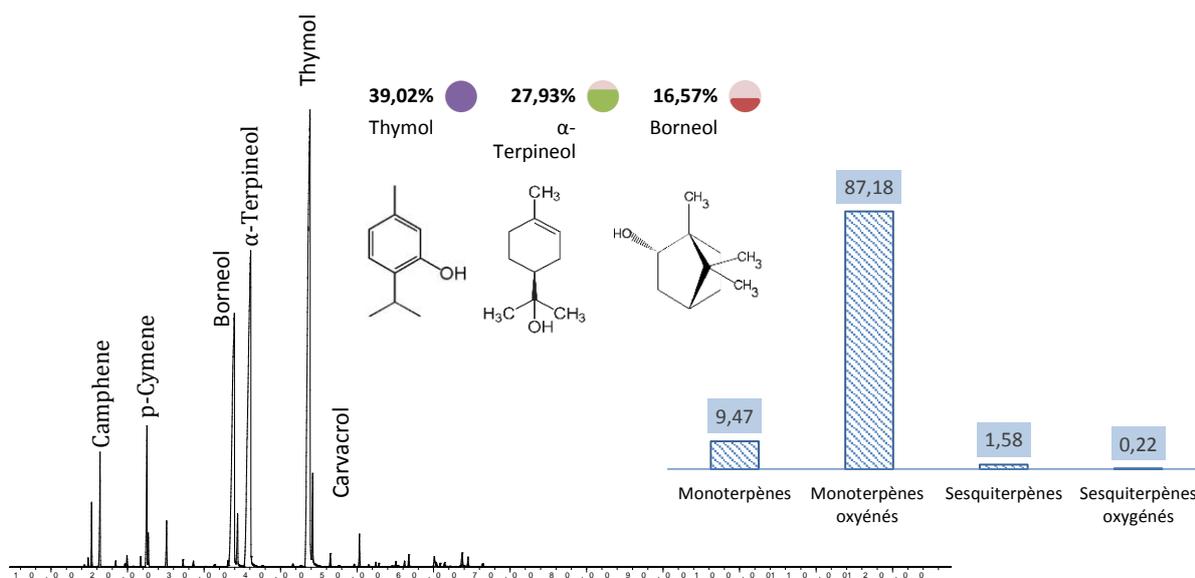
**Figure 42.** Chromatogramme GC/MS reconstruit de *S. satureioides* (de Mechria) et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.



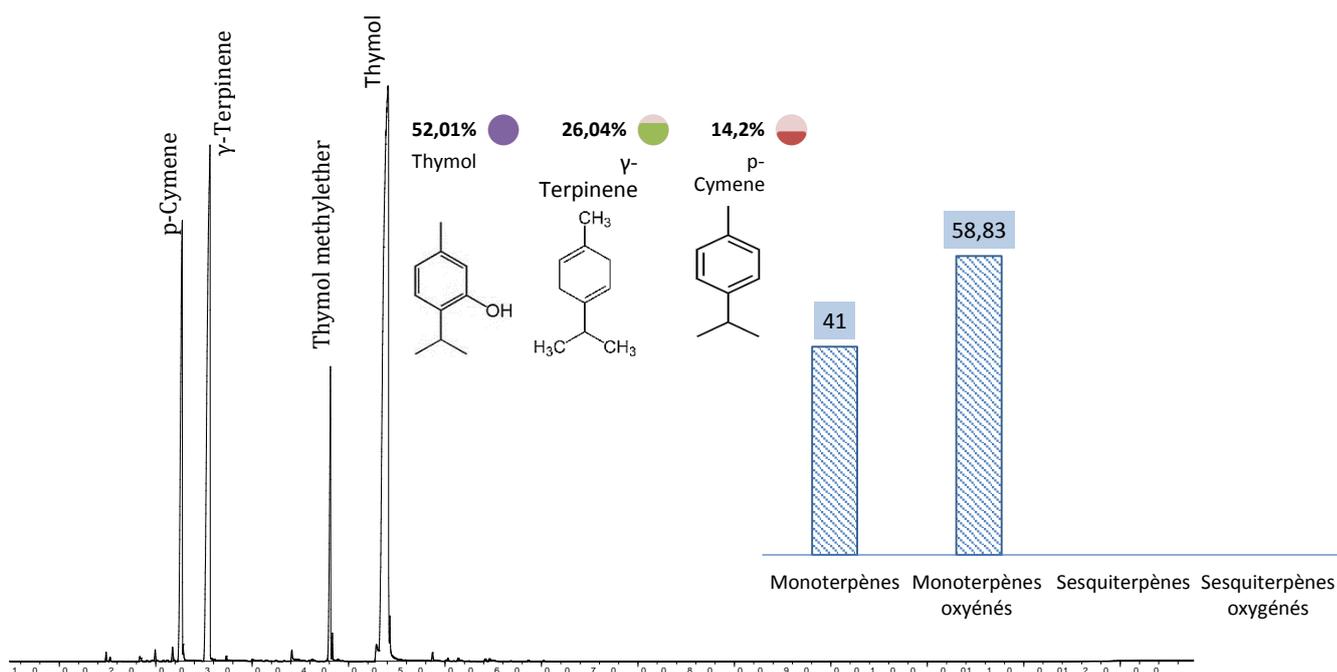
**Figure 43:** Chromatogramme GC/MS reconstruit de *S. satureioides* (Aouk djmel) et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.

En général, on peut distinguer qu'il existe une légère modification de la composition chimique des huiles de *S. satureioides* selon l'origine géographique (tableau 16). Ce changement est remarquable dans les principaux composés (*Thymol* et  *$\alpha$ -Terpinenol*). Ses taux se situent entre 21,94 et 36,89% pour H.E. de Mechria et 39,02% et 27,93% pour ceux de la région de Asla (Nâama). D'autres composés sont présents dans toutes les espèces, mais l'H.E. de Mechria a montré des niveaux plus élevés que les autres régions (Aouk Djmel, Asla, Bedrous, El baiod et Tiert): Borneol (21,19 ; 19,62 ; 16,57 ; 19,2 ; 20,62 et 19,37%), p-Cymene (2,21 ; 4,45 ; 3,44 ; 5,48 ; 4,61 et 5,58%), Camphene (4,47 ; 2,78 ; 2,32 ; 4,58 ; 2,87 et 5,13%), le Carvacrol (1,62 ; 2,1 ; 1,23 ; 2,21 ; 2,23 et 1,91%) et l' $\alpha$ -pinene (2,66 ; 1,32 ; 1,22 ; 2,39 ; 1,4 et 2,69%) respectivement.

Cependant, des composés tels que Thymol methylether (1,1%), Cavracrol methylether (2%) et Cis-dihydrocarvone (0,14%), l'Eugenol (0,1%) ne sont présents que dans l'H.E. de Bedrous. Aussi au même titre de l' $\alpha$ -phellandrene qui est présente uniquement dans l'H.E. de Mechria (0,13%), le Borneol acetate est uniquement présent dans l'H.E. de cette dernière (0,11%), de Bedrous et d'el-Baiod avec 0,08%, La composition chimique des huiles étudiées s'accorde avec celle rapportée par certaines recherches précédemment réalisées (Bendahou et al., 2014; Biondi et al., 2006; Zerroug et al., 2011).



**Figure 44.** Chromatogramme GC/MS reconstruit de *S. satureioides* (Asla Nâama) et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.



**Figure 45.** Chromatogramme GC/MS reconstruit de *P. verticillata* et pourcentage des principales familles chimiques des composés identifiés.

L'huile de *S. satureioides* obtenue à partir de la région de Ain safra (Tlemcen) (Bendahou et al., 2014) où 68 composés identifiés, était riche en borneol (28%), thymol (18%), l' $\alpha$ -terpinéol (17%) et le camphène (8% et 6%). Cependant, le thymol (25,0%) suivi par le

borneol (21,6%), l' $\alpha$ -terpineol (11,7%) et l'o-méthylbenzoate d'éthyle (2,6%) ont été les principaux constituants des matières volatiles extraites par l'hexane lors de l'extraction assistée par Micro-ondes.

Mais celle de la région de Bousaada-m'sila-, présente des monoterpènes oxygénés comme composés prédominants (76,9%), avec de l' $\alpha$ -terpinéol (32,7%) comme composé majoritaire suivie par le thymol (22,8%), le borneol (11,6%) et le carvacrol (6,9%). Le p-Cymène (5,0%), le camphène (2,9%), le  $\gamma$ -terpinène (2,8%), l'a-pinène (1,8%) et le limonène (1,5%) étaient des hydrocarbures monoterpènes présents avec des quantités significatives (Biondi et al, 2006), les résultats de ces derniers auteurs pour *S. satureioides* de la région de Bousaada se rapprochent beaucoup de celle obtenu pour la région de Mechria où l' $\alpha$ -terpinéol a été trouvé aussi comme composé majoritaire avec un taux de 36,89%, suivie de du thymol (21,94%) et du Borneol (21,19%), sauf que le Carvacrol était moins présent par rapport à la région de Bousaada avec seulement 1,62 % .

D'un point de vue qualitatif, l'huile obtenue dans cette étude ressemble à celle obtenue par Laouer et al., 2004, sur une autre population algérienne de *S. satureioides*. En réalité, alors que dans cette étude, le thymol, l' $\alpha$ -terpinéol, le borneol et le p-cymène ont été identifiés comme les composants principaux, avec une grande prédominance thymol, l' $\alpha$ -terpinéol; où on a observé une relation quantitative différente. Différents chimiotypes, différents temps de collecte ou des conditions environnementales différentes pourraient expliquer les différences observées entre les populations de *S. satureioides* tel que vérifiée par la comparaison de la composition des huiles essentielles étudiées ici et celles de la littérature.

En outre, lorsqu'on élargi la comparaison au sein de la famille des Lamiaceae, il est intéressant de souligner quelques similitudes de l'huile de *S. satureioides* avec celle de *Thymus satureioides*, aussi connu sous le nom de thym marocain (Miquel, Richard & Sandret, 1976 ; Benjilali et al., 1987). Il n'est pas fortuite, en effet, que *S. satureioides* est décrit comme «Plante à odeur de thym».

Auparavant, on a prétendu que les différences qualitatives et quantitatives dans la composition des huiles essentielles dépendaient davantage de la part de la plante et non de la saison d'échantillonnage (Papachristos et al., 2004). On a également constaté qu'en fonction de la localisation géographique la composition de l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes de *S. satureioides* est plus ou moins différente en termes d'analyse qualitative et quantitative (tableau 16). Bisio et al. (1999) ont affirmé que les facteurs écologiques (climat et conditions du sol) ont une forte influence sur la teneur en huile essentielle, ceci dit qu'on n'a pas pu observer de grandes variations qualitatives marqués sauf quelques variations

significatives au niveau quantitatif dans la composition des huiles essentielles de *S. satureioides* des régions d'études. Le facteur écologique dans ce cas n'implique pas un effet marqué vu que les régions de disponibilité de l'espèce se trouvent dans le même étage climatique.

Cependant, il est important de constater que le thymol est le composé majeur de l'huile essentielle obtenue à partir de la plupart des régions à part celui de Mechria alors que l' $\alpha$ -Terpinenol était le composé majoritaire de cette dernière (Tableau 16). Dans cette étude, on a également constaté que si on écarte l'effet de la saison et du stade de développement de la plante on peut exhiber dans ce cas un effet de la région et des conditions édaphoclimatiques très marqué principalement sur la teneur des composés de l'H.E., ceci a été expliqué précédemment par plusieurs chercheurs (Hamrouni et al., 2009; Zekri et Satrallah, 2016).

Bien qu'il y a suffisamment de preuves sur le rôle biologique de ces composés majoritaires lors d'études préalables, plusieurs études ont indiqué que l' $\alpha$ -Terpinenol, le Borneol, le Carvacrol et en particulier le Thymol, ont un effet antioxydant remarquable ou plus généralement contre les radicaux libres (Bnouham et al., 2012; Chizzola et al., 2008). Récemment, certains travaux ont indiqué que ces composés exercent une activité antimicrobienne et antitumorale sur certains types de cellules cancéreuses en induisant l'apoptose (Nikolic et al., 2014).

L'huile essentielle extraite de *P. verticillata*, est également marquée par le Thymol (52,01%) et l' $\gamma$ -Terpinene (26,04 %) et avec des taux de p-cymène (14,2%) plus importants que ceux trouvés dans *S. satureioides* et une quantité plus élevée du Thymol méthylether (5,98%). De plus, El Ouariachi et al., (2011), ont rapporté que les principaux constituants du *P. verticillata* du Maroc (Ahfir) étaient le Carvacrol (44.6%) et Limonène (18,4%) et le thymol (3.4%), la p-Cymène (9,4%), Geranyl acetate (4,7%) et le Sabinène (2,2%). Bekhechi et al., (2013), ont trouvé que l'huile essentielle de *P. verticillata* contient de l'isothymol comme composé majoritaire (51.2%) avec du  $\gamma$ -cymène (14.1%), thymol (13.0%), limonène (11.9%) et  $\gamma$ -terpinène (6.8%); par contre les H.E. des grains de cette plante sont connues pour être riches en Thymol.

Dernièrement, Attou et al., (2017), ont étudié la composition chimique de *P. verticillata* de l'ouest Algérien (Ain timouchent) et ont signalé le thymol en tant que composant majeur (45,77 %), suivi de monoterpènes avec 44,31 % (p-cymène, limonène, le  $\gamma$ -terpinène) comme principales composantes. Tandis qu'au même titre que l'H.E. des parties aériennes de *P. verticillata* étudiée ici, l'échantillon de cette plante provenant de la région de Ain timouchent a été caractérisée par 12 composés représentant 96.67% de la composition globale de l'huile, avec la prédominance de phénols (thymol, 45,77%), p-cymène (20.19%), limonène (15.70%),

le  $\gamma$ -terpinène (8.42%). Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus avec l'étude de Mohagheghzadeh et al., (2007) indique que le Thymol et le Carvacrol sont les chemotypes les plus abondants. Par conséquent, l'huile étudiée ici est de chemotype *Thymol* au même titre que l'huile de la région de Ain timouchent.

Par ailleurs, dans les études de Kambouche & El-abed, (2003), le chemotype était l'isothymol avec une caractérisation du 2-isopropyl-4-méthylphénol et 3-isopropyl-6-méthylphénol (carvacrol). De même, une étude récente a trouvé que l'isothymol était le composé majoritaire de l'huile de *P. verticillata* au début du stade floraison, et dans d'autres cas, le thymol était prédominant (7,18%). De même, dans l'étude de Laouer et al., (2011), le thymol (44.5%) est également le constituant principal de l'espèce *Ammoides pusilla* (Brot.), suivie par  $\gamma$ -terpinène (32.9%) et le p-cymène (13.5%).

### 6.1.3. Activité antioxydante des Huiles Essentielles

L'essai de l'activité antioxydante des huiles essentielles (représentés dans le tableau 16) a permis de déterminer leur pouvoir antiradicalaire et réducteur du Fe<sup>3+</sup>. Les H.E. des échantillons de plantes étudiées ont été caractérisés par une plus grande capacité de piégeage des radicaux libres par rapport à celle de l'antioxydant synthétique BHT ( $EC_{50} = 25 \pm 2,03 \mu\text{g/mL}$ ).

Il a été rapporté que les huiles riches en phénols (*Carvacrol* et *Thymol*) possèdent une activité antioxydante très importante (Aminzadeh et al., 2010). En revanche, cette activité a été évaluée lors de cette étude sur tous les échantillons d'huiles étudiées et les résultats sont représentés dans le tableau 16. Les meilleures  $EC_{50}$  déterminées pour le test de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur sont de  $270 \pm 14,68$  et  $197 \pm 7,45 \mu\text{g/mL}$  respectivement pour l'H.E. de *P. verticillata*.

Les activités antioxydantes des extraits volatils de thym ont été rapportées par un certain nombre de groupes appliquant différentes méthodes, qui attribuent des effets antioxydants à la présence de composés phénoliques (Lee & Shibamoto, 2002). Undeger, Basaran, Degen & Bassaran, (2009), ont évalué la capacité antioxydante des principaux constituants du thym (Thymol, Carvacrol et  $\gamma$ -terpinène) par TEAC et ont démontré que le thymol et le carvacrol présentaient une activité antioxydante à toutes les concentrations testées alors que le *Gamma-terpinène* qui ne possède pas de groupe phénolique ne présente aucune activité antioxydante.

Les études de El Mokhtar et al., (2011), sur la même espèce d'origine marocaine de Chemotype cavacrol (44.6%) a permis de trouver des faibles valeurs d' $EC_{50}$  exprimés en %

(23%) pour le test DPPH, ce qui indique que L'H.E. de cette étude est meilleure par rapport à son chémotype Thymol (52,01%). Aussi, l'H.E. d'*Ammoides verticillata* de la région d'Ain timouchent (Chémotype Thymol) permet de piéger 60.12% du radical à une concentration de 31.25 µg/ml, cette activité est supérieure à celle trouvée lors de cette étude.

Le faible pouvoir antioxydant parmi les H.E. de *S. satureioides* des différentes régions d'étude est enregistré pour la région de Bedrous, avec des EC<sub>50</sub> de 413 ± 13,97 et 304 ± 14 µg/mL respectivement pour le test DPPH et PR. Par ailleurs, le fort potentiel antioxydant est enregistré pour l'huile de la région de Mechria avec des valeurs d'EC<sub>50</sub> de 278 ± 8,03 et de 224 ± 7,56 µg/mL pour les deux tests DPPH et PR. De même, pour ces deux tests, l'huile des régions Aouank Djmel et de Asla (Naama) ont manifesté un potentiel antioxydant remarquable avec des EC<sub>50</sub> de (317 µg/mL, 291 µg/mL) et (300 µg/mL, 253 µg/mL) respectivement.

Le composé majoritaire "thymol" réagit avec le DPPH aussi bien à travers les mécanismes de transfert d'atome d'hydrogène et par un séquentiel transfert de proton (Hazzit, 2008), ce qui confère à l'huile un haut potentiel sans oublier le rôle additionnel des monoterpènes (limonene, p-cymene, et γ-terpinene) pour augmenter l'activité de donation d'hydrogène.

En effet, il est à noter que le pouvoir antioxydant des H.E. augmente avec l'augmentation de leurs concentrations. A des concentrations élevées les valeurs d'EC<sub>50</sub> approchent les valeurs d'EC<sub>50</sub> du BHT utilisé comme standard. Compte tenu de la teneur élevée en phénols (thymol) qui est supposé jouer un rôle important dans l'activité biologique d'une huile essentielle (Chizzola et al., 2008; Dob et al., 2006; Méndez-tovar et al., 2015), ce résultat était prévisible parce que les phénols présents dans les H.E. permettent d'exercer une action réductrice sur le radical DPPH en hydrazine lors de la réaction avec des groupements donateurs d'hydrogène.

Pour autant qu'on connaisse les seuls documents publiés liés à la capacité des huiles essentielles de *S. satureioides* et *P. verticillata* à piéger le DPPH et réduire le Fe<sup>3+</sup> est ceux de Bounatirou et al. (2007), dans lequel les huiles essentielles de ces deux dernières plantes ont montré des valeurs d'EC<sub>50</sub> plus élevée (> 250 µg.mL<sup>-1</sup>) que celle obtenue dans cette étude, révélant une activité antioxydante plus faible. Selon ces auteurs, des échantions d'H.E. de *S. satureioides* et *P. verticillata* extraits des parties aériennes possédaient des capacités efficaces de balayage des radicaux libres.

A partir de cette vue d'ensemble simplifiée, il est clair qu'une attribution exacte de l'activité antioxydante à certains composés ou petits groupes de composés des extraits de plante est une tâche difficile du fait que l'activité effective dépend de plusieurs paramètres, tels que : le type de matrice, la concentration, les formes isomériques ou l'interaction synergétique avec d'autres composés, pour pouvoir antioxydant et antiradicalaire, son activité réductrice (capacité de livrer rapidement des atomes d'hydrogène et/ou des électrons) et sa capacité de liaison au métal.

Pour ces raisons, plusieurs méthodes ont été développées pour l'évaluation de l'activité antioxydante d'un extrait indépendamment de la teneur quantitative du composé individuel à qui l'activité antioxydante est attribuée. Plusieurs méthodes existent, simples, de coût abordable et qui ont l'habileté d'identifier l'activité effective d'un composé particulier ou d'un extrait complexe (Apak et al., 2007).

Les différences de composition et de teneur en huile peuvent être attribuées à plusieurs facteurs: la méthode utilisée, les parties de plantes utilisées, les produits et réactifs utilisés dans l'extraction, l'environnement, le génotype de la plante, l'origine géographique, la période de récolte de la plante, le degré et les conditions de séchage (la température et le temps de séchage) et la présence de parasites, de virus et de mauvaises herbes (Aminzadeh et al., 2010; Bousbia, 2013). Selon Hazzit, (2008), les huiles essentielles sont des mélanges complexes pour lesquels il est très difficile d'attribuer l'activité antioxydante à un ou plusieurs composés principaux. Tous les auteurs s'accordent à dire que les phénols jouent un rôle très important dans l'activité antioxydante des huiles essentielles, sans qu'ils soient les seuls responsables de cette activité.

Certaines huiles dont les compositions étaient similaires pouvaient avoir des activités parfois très différentes et imprévisibles. Ces différences ont été relevées dans plusieurs travaux rapportés dans la littérature et attribuées à des composés mineurs qui pourraient jouer un rôle de synergie prooxydante ou antioxydante. Mais de manière générale, on a vérifié que pour la majorité des tests de l'activité antioxydante, les huiles essentielles riches en phénols (thymol et/ou carvacrol) étaient souvent les plus actives.

## 6.2. Analyse des extraits phénoliques par chromatographie liquide

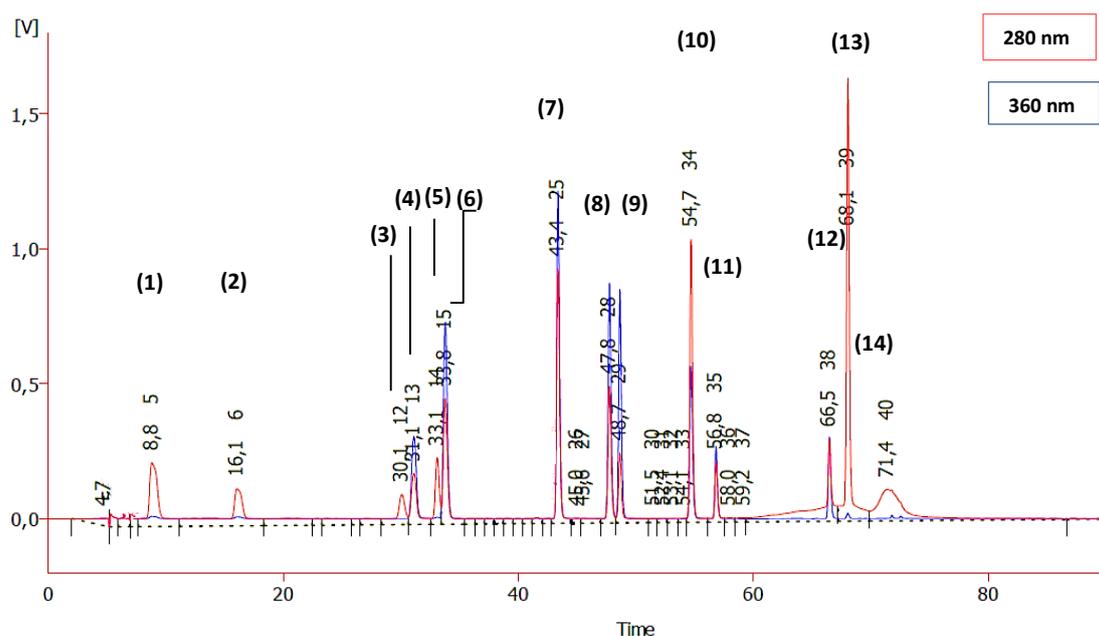
### 6.2.1. Optimisation des conditions chromatographiques par RP-HPLC-UV/Vis

Le but de cette étude était d'établir une procédure d'injection séquentielle, qui a la capacité de fournir des conditions de séparation appropriées pour la détermination de certains composés phénoliques en particulier les acides phénoliques tels que : l'acide gallique, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide sinapique, l'acide rosmarinique, l'acide hydroxycinnamique trans, l'acide trans-cinnamique ; certains flavonoïdes : la (+) – catéchine, la quercétine et la Myricétine (fig :46) et optimiser la méthode pour l'application sur des extraits de plantes.

Il est bien connu que l'ordre d'élution des composés phénoliques dans la RP-HPLC est étroitement lié à leur polarité, les plus polaires étant élués en premier, puis les moins polaires (El-Achi et al., 2014).

Une fois que les types des analytes sont identifiés, les paramètres affectant la performance de rétention HPLC tels que les solvants d'échantillon, la composition de phase mobile, la température de colonne et le débit sont fixés. Le choix du type d'acide utilisé comme modificateur est important pour minimiser le pic de résidus. Les acides phénoliques ont des valeurs de pKa d'environ 4 tandis que des flavonoïdes possèdent plusieurs groupes hydroxyle ionisables et ont des valeurs de pKa relativement proches mais certainement supérieure à 4. Par conséquent, l'intervalle du pH pour le dosage HPLC est de 2 à 4.

Une préparation des phases mobiles (acétonitrile/eau et 1% d'acide formique/Acétonitrile/Eau) à 30°C a été testée pour cribler les conditions chromatographiques optimales.



**Figure. 46** - Profils chromatographiques RP-HPLC d'acides phénoliques, de flavonoïdes des étalons mesurés à 280 nm et à 360 nm. Le nombre de pics correspond à: (1) Acide Gallique, (2) Acide 3,4-OH benzoïque, (3) Acide chlorogénique, (4) Acide Vanillique, (5) Acide caféique, (6) Acide rosmarinique, (7) Acide coumarique, (8) Acide sinapique, (9) Acide rosmarinique, (10) Acide 3,4-OH cinnamique Trans, (11) Myrecitine, (12) Quercétine, (13) Acide cinnamique trans, (14) Catechine.

Les pics pour les composés phénoliques élués par l'acétonitrile sont bien clairs et larges dans cette étude. On a également observé des pics asymétriques (catéchine) et des pics d'éluion très tardive (quercétine) dans l'éluion à l'acétonitrile. Ceci peut être attribué au moment dipolaire plus élevé de l'acétonitrile, avec l'interaction résultante plus forte de l'interaction analyte-phase mobile (interactions donneur-accepteur).

Les pics aigus et les temps d'exécution plus courts observés lors de l'utilisation de l'acétonitrile étaient similaires aux résultats rapportés par d'autres auteurs (Zhang et al., 2013). Les pics d'acide vanillique et d'acide caféique se sont avérés difficiles à séparer dans un chromatogramme en raison de leurs propriétés de rétention similaires. L'utilisation d'une solution d'acide formique à 1% comme additif en phase mobile a permis une bonne séparation et une bonne résolution de tous les composés phénoliques intéressants dans cette étude. Le débit optimisé et la température de colonne étaient de 0,8 ml / min et 30 ° C, respectivement, pour réduire les temps d'analyse et améliorer la forme du pic après plusieurs essais.

Les composés phénoliques absorbent bien dans la gamme UV avec une intensité d'absorption et des temps de réponse différents en raison de leurs structures caractéristiques respectives, par conséquent, le choix de longueurs d'onde de détection appropriées pour chaque

analyte doit être sérieusement considéré et une seule longueur est insuffisante pour la détermination simultanée des composés dans les extraits de diverses plantes.

Les temps de rétention des 14 composés phénoliques analysés par le détecteur UV-VIS ont été répertoriés dans le tableau 17. Bien que les composés phénoliques aient plus d'un pic d'absorption dans leurs spectres UV-VIS, à l'exception de l'acide gallique, de la (+) – catéchine et de l'acide p-coumarique, les plus intenses ont été choisies comme leurs longueurs d'onde de détection (Tuzen et Ozdemir, 2003). Il s'avère que 280 nm et 360 nm sont les longueurs d'onde de détection les plus généralement utilisées pour la détermination simultanée de différents composés phénoliques.

**Tableau 17 :** Temps de rétention et  $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption des 14 composés phénoliques analysés par HPLC-UV-VIS.

N°	Standard	Temps de rétention (min)	$\lambda_{\text{max}}$ D'absorption (nm)*
1	Acide Gallique	7,67-8,8	271
2	Acide 3,4-OH benzoïque	13,24-14,5	280
3	Acide 4-OH benzoïque	16,1-17,5	280
4	Acide chlorogénique	29,4-30	328
5	Acide Vanillique	30,1-31,8	260
6	Acide caffeique	33,1-35,3	324
7	Acide coumarique	43,9-44,9	330
8	Acide sinapique	46,4-47,8	340
9	Acide rosmarinique	48,5-48,8	330
10	Acide 3,4--OH cinnamique Trans	49-50,1	270
11	Myrecitine	55,5-56,8	280
12	Quercétine	66,1-66,6	374
13	Acide cinnamique trans	68,1-69,6	270
14	Catechine	71,4-72,7	280

\* :  $\lambda_{\text{max}}$  des composés phénoliques déterminées par un balayage UV au spectrophotomètre.

Les acides phénoliques analysés correspondent aux dérivés d'acide hydroxybenzoïque tel que l'acide gallique, vanillique et de l'acide hydroxycinnamique à savoir les acides chlorogéniques, une famille d'esters formés entre certains acides cinnamiques, les plus couramment les acides cafféique, p-coumarique et rosmarinique et l'acide quinique.

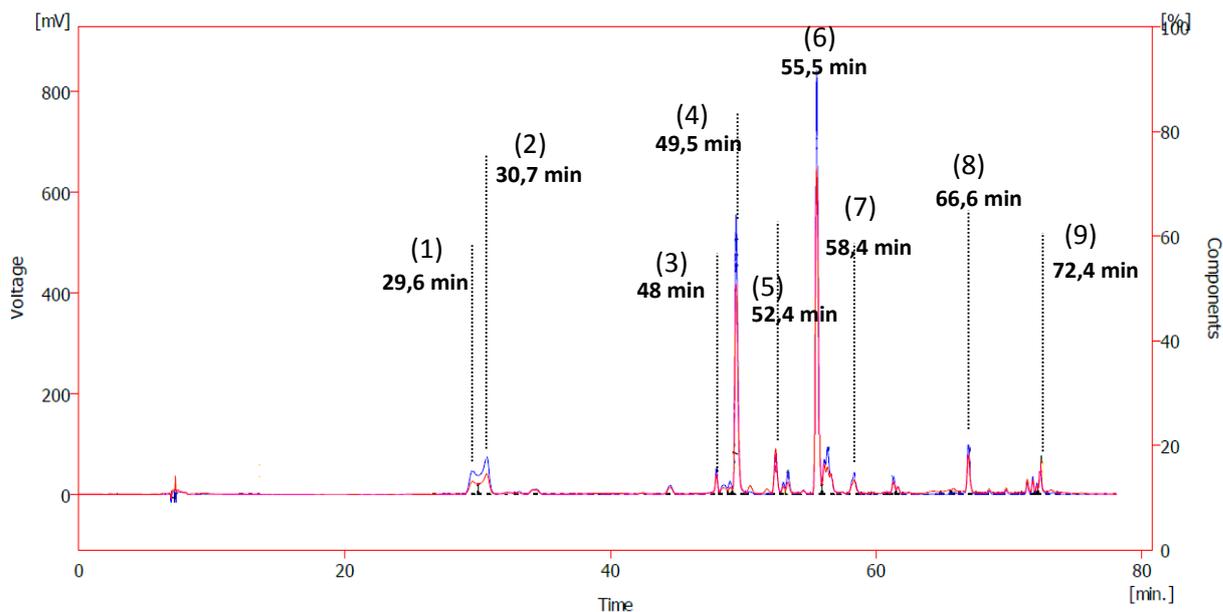
### 6.2.2. Analyses par RP-HPLC-UV-Vis de l'infusion de *P. verticillata* et *S. satureioides*

Dans le but de démontrer l'efficacité de la technique HPLC-UV-Vis dans la détection des composés phénoliques des extraits présents dans les infusions, on a analysé, à titre indicatif, deux échantillons de plantes à savoir *P. verticillata* et *S. satureioides* (Figure 47 et 48). Les composés phénoliques de ces échantillons ont été séparés et détectés à deux longueurs d'ondes (280 et 360 nm). Les deux chromatogrammes, présentés ci-dessous, montrent respectivement les échantillons de *P. verticillata* et *S. satureioides* de la région de Mechria .

En se basant sur les temps d'apparition des pics ainsi que sur l'ordre d'élution des composés phénoliques on peut à priori dire que les principaux constituants de l'extrait de ces deux plantes sont les acides phénoliques et les flavonoïdes qui sont présents dans des niveaux relativement importants. Ceci est conforme aux résultats obtenus par le chlorure d'aluminium et les méthodes du dosage colorimétriques des phénols totaux par F-C dans les sections précédentes.

La figure 47 montre l'analyse de la fraction phénolique par HPLC de *P. verticillata* qui a une teneur en phénols totaux importante ( $259 \pm 3$  mg GAE/g d'infusion lyophilisée) précédemment mesurée.

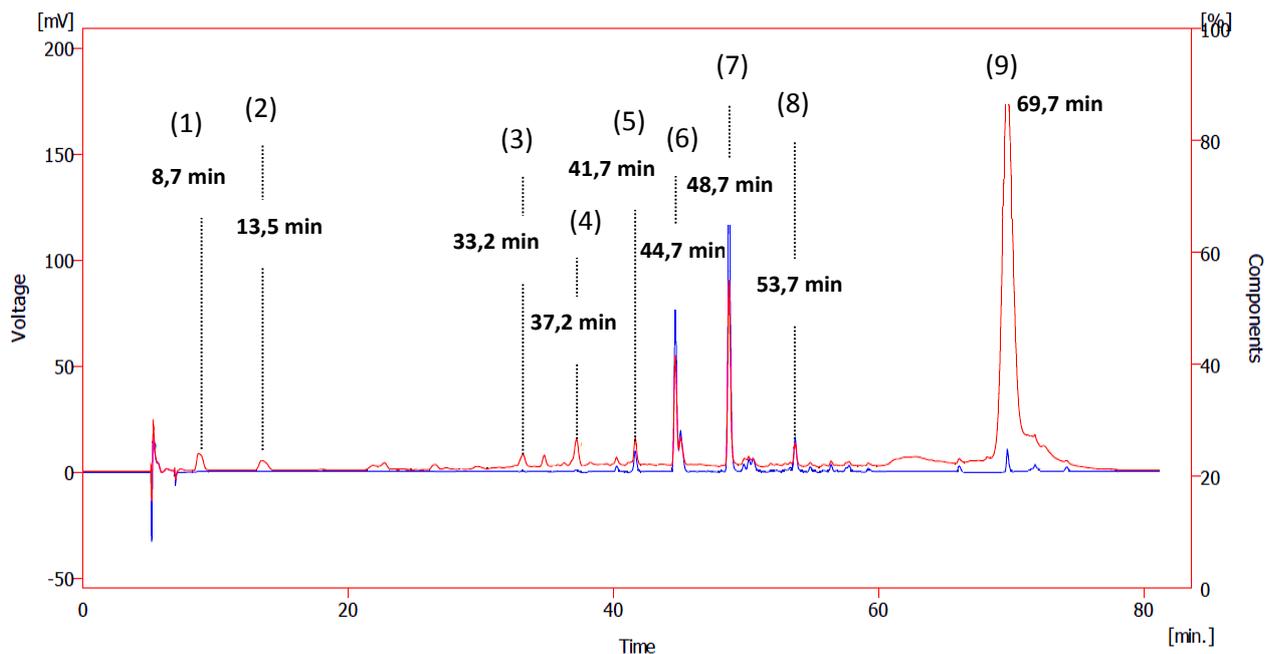
Dans l'ensemble l'extrait aqueux de *P. verticillata* présente un profil chromatographique très diversifiés (fig.47). L'examen global du chromatogramme fait apparaître un profil en composés phénoliques riche et varié ce qui induit un fort potentiel biologique tel que précédemment indiqué. En effet, c'est une plante qui possède un important pouvoir anti-oxydant car elle contient beaucoup de phénols dits « complexes » (temps de rétention des composés entre 16 et 70 min).



**Figure 47.** Chromatogrammes HPLC-UV-Vis de l'extrait aqueux de *Ptychotis verticillata* représentant les composés phénoliques analysés à 280 nm (en rouge) et à 360nm (en bleu).

Les pics clairement résolus dans la majorité de l'échantillon sont numérotés (fig .47). Par contre l'examen du profil chromatographique permet de constater que les phénoliques les plus abondants sont les composés numéro 4, 6 et 8 avec un temps de rétention de 49,5 min , 55,5 min et 66,6 min respectivement, alors que selon le profil chromatographique des étalons précédemment injectés et les longueurs d'ondes d'absorption, ils peuvent s'agir des acides phénoliques, étaient l'acide 3,4-OH cinnamique Trans, la Myrecitine et la quercétine. L'acide vanillique était aussi présent ( $t_r=30,7$  min) au même titre que l'acide férulique ( $t_r=48$  min) et la Chatéchine avec un temps de rétention de 72,4min.

La présence de composés phénoliques déterminée lors de cette section confirme la bioactivité des extraits de cette plante. Cependant, concernant cette plante il n'y a pas eu des données bibliographiques relatives à l'analyse par chromatographie liquide alors que la majorité des travaux scientifique ont été orienté vers l'étude de la fraction volatil des extraits.



**Figure 48.** Chromatogrammes HPLC-UV-Vis de l'extrait aqueux de *Saccocalyx satureioides* représentant les composés phénoliques analysés à 280 nm (en rouge) et à 360nm (en bleu).

De même, le profil chromatographique de *Saccocalyx satureioides* déterminé à 280 et 360 nm permet de distinguer les composés numéro 6, 7 et 9 avec respectivement les temps de rétention de 44,7 min, 48,7 min et 69,7 min comme les phénoliques les plus abondants alors que selon le profil chromatographique des étalons précédemment injectés et les longueurs d'ondes d'absorption maximales, ils peuvent correspondre à l'acide coumarique, rosmarinique et de l'acide cinnamique Trans.

Le composé numéro 1, est de l'acide gallique qui absorbe bien à 280nm avec un temps de rétention de 8,7 min, le composé numéro 2 qui à un temps de rétention de 13,5 min avec une zone d'absorption au alentour de 280 nm avec un profil spectrale caractéristique, ce composé peut s'agir de l'acide 3,4-OH benzoïque. Quant aux composés 3 et 4, ils peuvent bien s'agir d'acides phénoliques dérivés des acides hydrocinnamiques (acide caféïque ou acide chlorogénique).

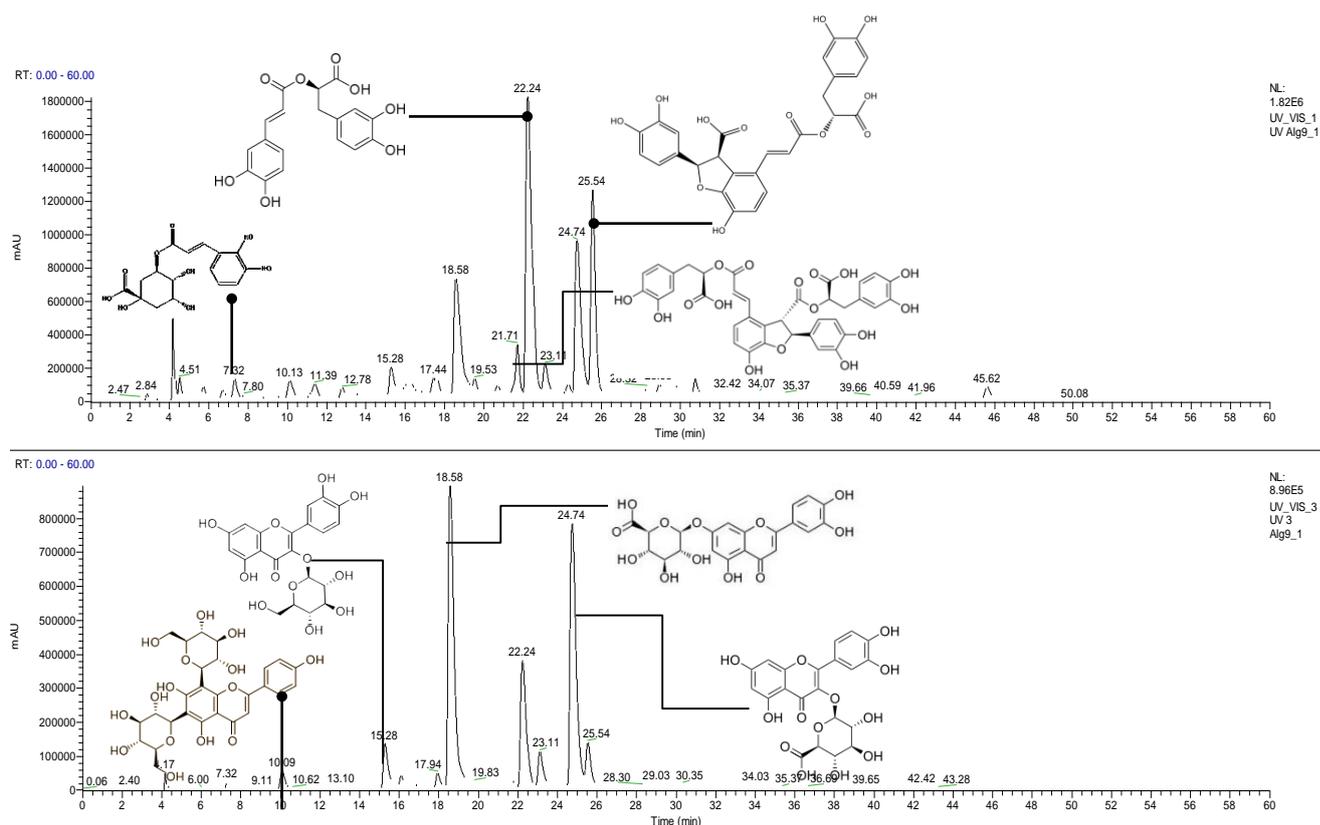
En fait les composés mises en évidence ont montré une analogie avec les composés des classes des acides benzoïques, cinnamiques et des flavonoides, indiqués par les analyses spectrales (UV-Vis) et chromatographiques (HPLC) des étalons de référence. Les composés phénoliques du groupe acides phénoliques sont représentés exclusivement par des dérivés d'acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques souvent liés à l'acide quinique ou plus rarement à des acides aminés aromatique comme le tryptophane ou la tyrosine (Dias et al., 2016).

### 6.3. Analyses par LC-DAD/MS-ESI

Aucune donnée n'est disponible concernant la composition phénolique des deux plantes étudiées par l'analyse chromatographique liquide LC-MS. Ici, pour la première fois, la détermination qualitative par une tentative d'identification des composés phénoliques présents dans les infusions a été réalisée par chromatographie liquide type LC-DAD/MS-ESI (fig. 49,50). Les résultats des mesures de masse précises s'accordent bien avec la composition élémentaire des composés. Les schémas de fragmentation diagnostique des composés lors de la dissociation induite par ESI ont permis d'élucider les informations structurelles des composés analysés.

La lecture de chromatogramme LC-DAD à deux longueurs d'ondes (280 nm & 370 nm) et la détermination des fragments de masse de diagnostic obtenus par MS-ESI en mode négatif [M-H]<sup>-</sup>, permettent d'identifier les composés phénoliques présents dans les infusions des plantes étudiées.

L'identification des composés phénoliques a été réalisée en comparant les temps de rétention et les spectres de masse avec ceux des normes authentiques. Si les normes n'étaient pas disponibles, les composés phénoliques sont identifiés sur la base de la masse précise des données pseudomoléculaires [M - H]<sup>-</sup> et des données de spectrométrie de masse en tandem (MS / MS). Cette caractérisation chimique des composés phénoliques est effectuée pour la première fois lors de ce travail et aucune étude précédente n'a fait l'objet de telle caractérisation sur les plantes choisies. Néanmoins, certaines études ont cerné quelques espèces appartenant à famille botanique de ces plantes d'où on se base pour comparer les molécules identifiées.

❖ *Thymus pallescens*

**Figure 49.** Chromatogramme LC/MS de l'infusion *T. pallescens* mesurés à deux longueurs d'ondes  
A :280nm ;B :370nm.

Le profil phénolique de *T. pallescens*, obtenu pour l'infusion, et enregistré à 280 et 370 nm est représenté sur la figure 49. Douze (12) composés ont été identifiés, dont cinq dérivés d'acides phénoliques et sept flavonoïdes. En ce qui concerne les acides phénoliques, l'acide 5-O-caffeoylquinic (tr = 7,32 min) dérivé d'acide hydroxycinnamique, l'acide chlorogénique (tr = 19,53 min), l'acide salvianolique K (tr = 21,71 min), l'acide rosmarinique (tr = 22,24 min) et l'acide Lithospermique (tr = 25,54 min) ; identifiés en fonction de leurs caractéristiques de rétention et de masse. Le pic 11 ([M-H]<sup>-</sup> à m/z 521) a été identifié comme l'acide rosmarinique-glucoside, composé précédemment rapporté dans le genre *Thymus* (Nagy et al., 2011). L'acide salvianolique (c.-à-d., 3'-O- (8'' -Z-caffeoyl), et l'acide lithospermique et Rosmarinique ont été également identifiés dans les feuilles de *T. vulgaris* par Dapkevicius et al. (2002) et rapporté dans le thym séché par Nagy et al. (2011). Cependant, le modèle de fragmentation du pic 12 correspondait mieux à celui décrit pour l'acide lithospermique A que pour l'acide salvianolique I de (Ruan et al., 2012; Zeng et al., 2006). Par conséquent, le composé a été provisoirement attribué à l'acide lithospermique A.

Les flavonoïdes détectés dans l'échantillon analysé appartenait aux groupes de flavones, flavonols et flavanones. L'apigenin-6,8-dihexoside (tr = 10,13 min), la quercétine 3-

O-glucoside (tr = 15,28 min), la Luteolin-diglucuronide (tr = 16,1 min), Luteolin-rutinoside (tr=17,94 min), luteolin-7-O-glucuronide (tr=18,58), Apigenin-O-glucuronide (tr=23,11 min) et Kaempferol-O-glucuronide (tr=24,74 min) ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention, et leur spectre de mass caractéristique. La quercétine 3-O-glucoside a été signalée auparavant chez *Thymus vulgaris* (Vergara-Salinas et al., 2012), tandis que la luteoline 7-O-glucoside a été identifiée dans les infusions de thym (Kulisic et al., 2006), les feuilles de *Thymus vulgaris* (Hossain et al., 2011; Vergara-Salinas et al., 2012) et le thym sauvage (*T. serpyllum*) (Miron et al., 2011). La rutine (c'est-à-dire, la quercétine 3-O-rutinoside) a également été précédemment rapportée par Boros et al. (2010) et Hossain et al. (2010).

Les pics 4, 5 et 6 ont été identifiés comme des dérivés de lutéoline en fonction de leurs caractéristiques UV et de spectre de masse. Le pic 6 ([M-H] - à m / z 461) a été attribué à la lutéoline 7-O-glucuronide, en raison de l'identification de ce composé dans des feuilles de *Thymus vulgaris* par Dapkevicius et al. (2003) et Vergara-Salinas et al. (2012) et le thym sauvage (*T. serpyllum*) par Miron et al. (2011). Le pic 4 ([M-H] - à m / z 637) a été provisoirement identifié comme lutéoline-diglucuronide et le pic 5 ([M-H] - à m / z 447) a été attribué à un hexoside de lutéoline (Luteolin-rutinoside). Le pic 3 ([M-H] - à m / z 463) a été désigné sous le nom de quercitin-3-O-glucoside et la présence de 7-O-glucoside de quercétine dans le thym a été citée par Roby et al. (2013).

Le pic 10 ([M-H] - à m / z 445) a été provisoirement attribué en tant qu'apigénine O-glucuronide. Tandis que l'apigénine 7-O-glucuronide a été signalée dans le thym sauvage par Miron et al. (2011), et l'apigénine-glucuronide indéfini a également été trouvé dans les épices de thym séchées par Nagy et al. (2011). De même, le pic 11 ([M-H] - à m / z 477 et l'ion de fragment MS2 à m / z 285) pourrait être attribué en kaempferol O-glucuronide. De même les travaux de (Martins et al., 2014) ont permis d'identifier 24 composés dans les infusions, décoction et l'extrait hydroethanolique du *T. vulgaris* dont les principaux ont quasiment été présents dans l'échantillon de *T. pallescens* étudié ici.

Parmi les douze (12) composés phénoliques identifiés, l'acide rosmarinique, l'acide Lithospermique, la lutéoline-7-O-glucuronide, le Kaempferol-O-glucuronide (dans l'infusion) étaient les acides phénoliques et les flavonoïdes les plus abondants trouvés avec une forte concentration. Cela peut également être lié aux meilleurs résultats de l'activité antioxydante, l'activité antitumorale et à l'activité antibactérienne obtenue dans les sections précédentes.

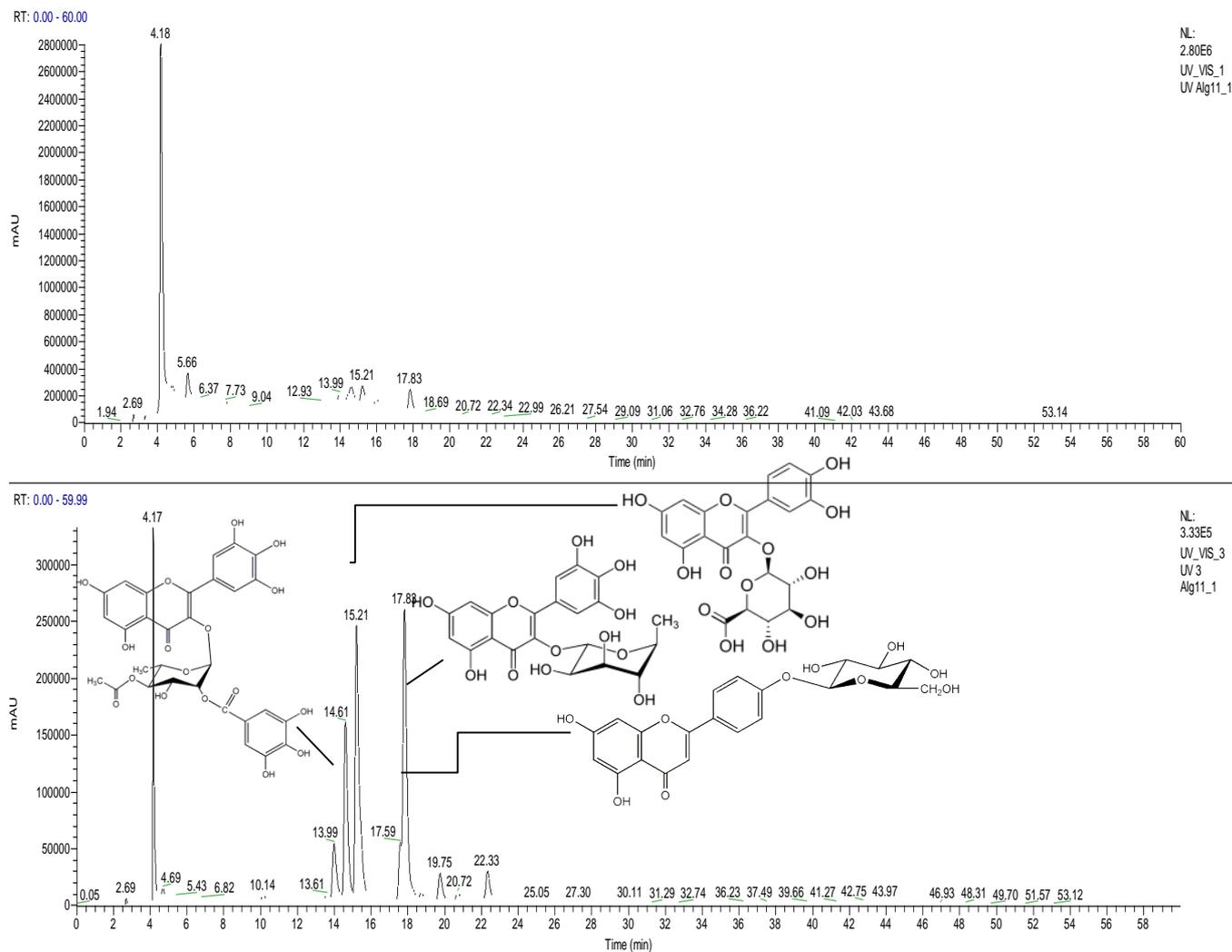
Il existe diverses publications qui rapportent la composition phénolique de Thym provenant de différentes origines et qui sont obtenues par différentes méthodes d'extraction (Zheng & Wang, 2001; Dapkevicius et al., 2002; Boros et al., 2010; Hossain et al., 2010; Miron

et al., 2011; Nagy et al., 2011; Vergara-Salinas et al., 2012; Roby et al., 2013), bien que les profils phénoliques rapportés soient différents dans chaque cas, ne présentant que des similitudes dans certains des composés identifiés dans cette étude.

Ils ont également détecté quelques flavonoïdes, tels que l'hispiduline, la lutéoline, la lutéoline-7-O-glucuronide. Ce dernier composé a également été identifié dans la présente étude. Aucune étude de caractérisation chimique de l'extrait de *T. pallescens* n'a été effectuée. Tandis que, Proestos et al. (2005) ont analysé un échantillon de thym de Grèce, en utilisant un extrait méthanolique aqueux avec une nouvelle hydrolyse de l'extrait. Ces auteurs ont identifié et quantifié cinq acides phénoliques (acides gentisique, caféique, p-coumarique, syringique et p-hydroxybenzoïque) et trois flavonoïdes (apigénine, lutéoline et épicatechine). Ces auteurs n'ont pas déterminé l'acide rosmarinique qui est l'acide phénolique majeur trouvé dans le *T. pallescens* étudié ici. En outre, Koşar et al. (2005) ont identifié quatre flavonoïdes (luteolin glucuronide, eriodictyol, luteolin et apigenin) et un acide phénolique (acide rosmarinique), dans un extrait méthanolique de *T. vulgaris* de Finlande où il était le composé phénolique le plus abondant.

Zheng et Wang (2001) et Berdowska et al. (2013) ont étudié un échantillon de *T. vulgaris* des États-Unis et de la Pologne, après extraction à l'acétone et à l'eau (eau bouillante et hydrolyse ultérieure), respectivement. Tous les deux ont identifié l'acide caféique et l'acide rosmarinique; ces composés ont également été identifiés lors de cette étude et l'acide rosmarinique a également été le composé phénolique le plus abondant détecté.

Roby et al. (2013) et Kulisic et al. (2006) qui ont étudié des échantillons du *T. vulgaris* d'Égypte (extrait méthanolique) et de Croatie (préparation par infusion), respectivement, ont pu identifié huit acides phénoliques, étant l'acide cinnamique, un composé apparenté à l'acide phénolique, la molécule principale trouvée. Ces auteurs ont également identifié cinq flavonoïdes, dans lesquels l'aglycone apigénine était la plus abondante. Les coïncidences avec les composés phénoliques détectés par d'autres auteurs (Dapkevicius et al., 2002, Boros et al., 2010, Hossain et al., 2010, Miron et al., 2011, Nagy et al., 2011) et ceux détectés lors de ce travail ainsi que les similitudes observées dans les profils phénoliques d'échantillons provenant de différentes espèces pourraient s'expliquer par les conditions de croissance (sol, climat, précipitations, altitude), la récolte, la transformation, entre autres, qui interfèrent directement avec la teneur en constituants chimiques (par exemple les composés phénoliques) et, par conséquent, leurs effets thérapeutiques (Naghdi Badi, Yazdani, Ali, & Nazari, 2004).

❖ *Limoniastrum guyonianum*

**Figure 50.** Chromatogramme LC/MS de l'infusion *L. guyonianum* mesurés à deux longueurs d'ondes A :280nm ;B :370 nm.

Dans le cas de l'infusion de *L. guyonianum*, on a détecté uniquement des flavonoïdes appartenant au groupe des flavonoles (Fig. 50), Tous les pics détectés ont été identifiés comme des dérivés de la Myricetin comme flavonoïde majoritaire déterminée en fonction de leur caractéristiques UV et de spectre de masse (un fragment MS2 unique à  $m/z$  317). Les dérivés flavonoïdes glycosylés constituent la majeure partie des polyphénols dans cette espèce. On a le plus souvent observé des conjugués hexavalents de flavonoïdes. Les domaines MS / MS ont révélé que les ions  $[M-H]^-$  -  $m/z$  631, 493, 479, 535, 463 et 535 éluant à 13,99, 14,61, 15,21, 17,5, 17,83 et 19,75min étaient respectivement attribués à la Myricetin-galloylglucoside,

Myricetin-O-glucuronide, Myricetin-O-glucoside, Myricetin-acetylglucuronide, Myricetin-O-rhamnoside et Myricetin-acetylglucuronide.

L'application de la technique LC-DAD-MS-ESI dans l'étude actuelle a fourni des informations utiles pour caractériser les composés phénoliques dans les infusions de 2 espèces appartenant à de différentes familles botaniques. Les fragments produits lors de l'analyse des composés mentionnés ci-dessus sont les clés du diagnostics de ces composés, qui peuvent être utilisés pour les identifier dans différents extraits.

Les résultats de mesures de masse exactes sont une autre caractéristique de diagnostic de ces composés et s'avèrent utiles pour différencier des composés ayant la même masse. De même, la spectrométrie de masse était avantageuse dans l'identification des polyphénols pour les composés qui ne se séparaient pas en tant qu'entités différentes dans la colonne à phase inversée.

Néanmoins, pour les polyphénols isomères, ce qui posait des problèmes pour l'identification spectrale (UV-Vis) le LC couplée au spectroscopie de masse était capable de résoudre le problème des isomères. Une faiblesse inhérente aux études MS / MS sur l'énergie à faible collision était qu'elles ne pouvaient pas localiser la position dans le cycle phénolique indigène qui a subi une modification. Dans un tel scénario, l'application de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) serait utile. La RMN aurait également la capacité de révéler l'identité du composé responsable de la modification. D'autant plus que dans la littérature, il n'existe pas de données fournissant une analyse complète des polyphénols dans les extraits d'espèces étudiées ici.

En conclusion, la combinaison d'une mesure de masse précise pour déterminer la composition élémentaire et la capacité de la LC à séparer les composés isomères ont fourni un outil puissant dans l'identification de la diversité polyphénolique chez les plantes sujettes à cette étude.

## 7. Analyse statistique

### ❖ Analyse des composantes principales (ACP)

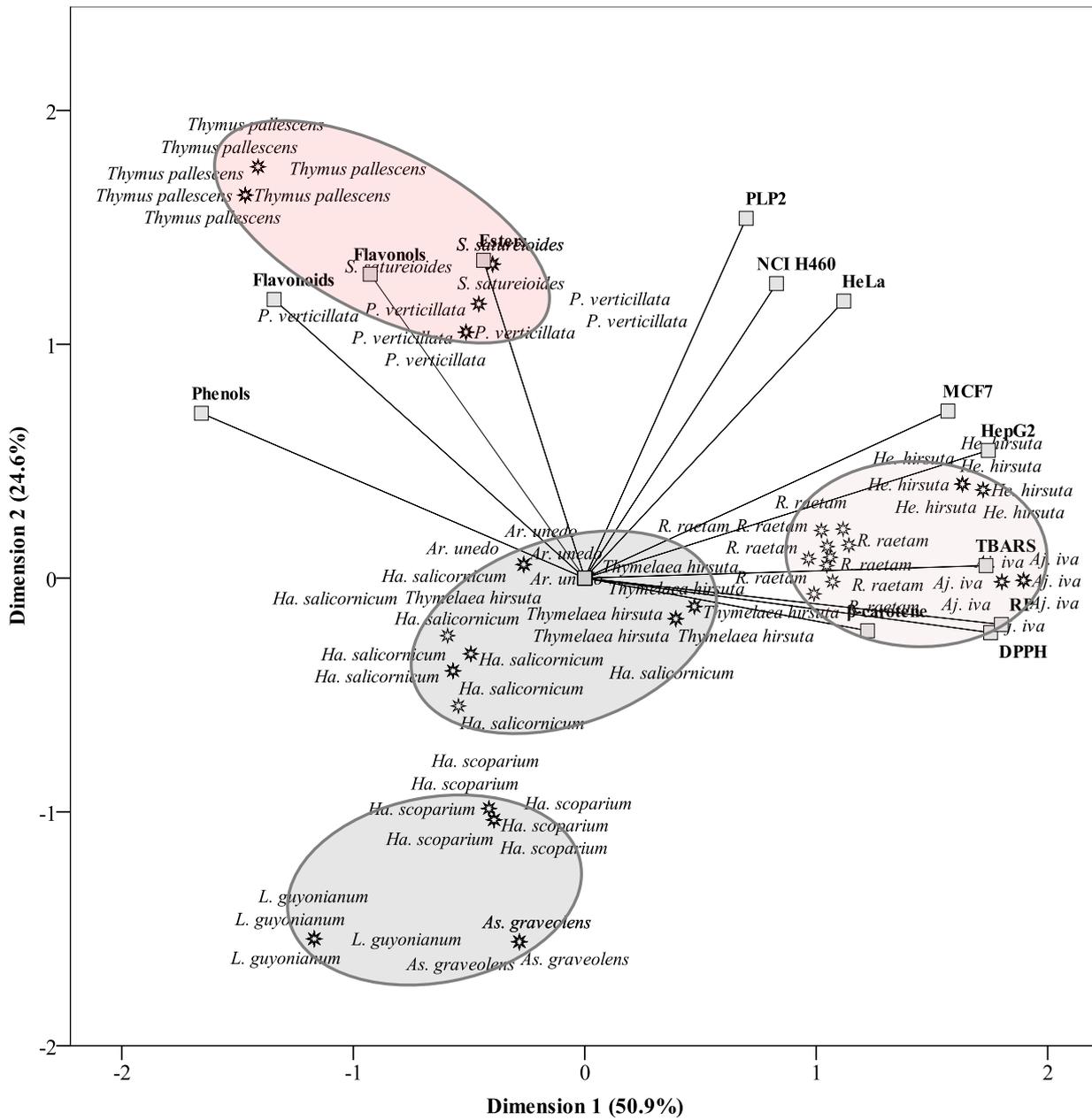
Dans l'ensemble, les espèces étudiées présentaient une grande hétérogénéité en ce qui concerne les paramètres évalués. Les données des tableaux 11, 13 et 15 pourraient être utilisées pour tirer des conclusions spécifiques.

La sélection des meilleures plantes en tenant compte de la contribution de tous les paramètres analysés simultanément ne peut être obtenue qu'à l'aide d'un outil d'analyse statistique plus avancé. Par conséquent, les résultats ont été évalués en appliquant l'analyse des composantes principales (ACP).

Les résultats ont été évalués à l'aide d'une analyse catégorielle des composantes principales (CATPCA) en tenant compte des données pour toutes les espèces étudiées. La courbe des scores d'objet (figure 51) indique que les deux premières dimensions (première:  $\alpha$  de Cronbach, 0,919, valeur propre, 6,611, seconde:  $\alpha$  de Cronbach, 0,744, valeur propre, 3,196) expliquent la plus grande partie de la variance de toutes les variables quantifiées (50,9 % et 24,6%, respectivement). Les marqueurs correspondant à chaque espèce ont tendance à former quatre groupes distincts : 1- *T. pallescens* + *S. satureioides* + *P. verticillata*; 2- *H. scoparium* + *L. guyonianum* + *A. graveolens*; 3- *H. salicornicum* + *A. unedo* + *T. hirsuta*; 4- *A. iva* + *R. raetam* + *H. hirsuta*.

Les objets correspondant au troisième groupe ont été répartis à proximité de l'origine des coordonnées, en soulignant leur score moyen dans les paramètres analysés (ces espèces ne présentaient pas de résultats particulièrement élevés ou faibles dans aucun des cas). Le premier groupe a été caractérisé principalement par ses niveaux élevés de composés bioactifs, tandis que le groupe 2 a montré une grande activité comme agent cytotoxique contre les lignées de cellules tumorales humaines. Enfin, le groupe 4 est facilement interprété comme ayant l'activité antioxydante la plus faible.

En conséquence, et considérant les résultats du CATPCA, *T. pallescens*, *S. satureioides* et *P. verticillata* seraient les choix préférables en tant que sources potentielles de composés bioactifs, alors que *H. scoparium*, *L. guyonianum* et *A. graveolens* représenteraient la solution la plus appropriée si l'objectif visé était de sélectionner des espèces végétales présentant une bioactivité élevée (en particulier la cytotoxicité).



**Figure 51.** Biplots de points d'objets (espèces différentes) et de charges de composants (indicateurs de bioactivité évalués).

## ENRICHISSEMENT DE L'HUILE D'OLIVE

### 1. Analyses physico-chimiques de l'Huile d'olive

#### 1.1.L'indice d'acide

L'indice d'acide permet d'évaluer le degré d'altération par l'hydrolyse d'une huile. Il est largement utilisé comme critère de classification commercial de huile d'olive (Mattia et al., 2014). L'huile de la variété étudiée présente un taux relativement faible d'indice d'acide (0,8%), ce qui est conforme aux normes de COI (2015) pour une huile d'olive vierge extra. Cependant, cette huile est légèrement acide comparativement aux huiles des variétés tunisiennes analysées par Zarrouk et al. (2008), où l'acidité libre est comprise entre 0,38 et 0,41% d'acide oléique. Haddada et al. (2007), ont obtenues des résultats inférieurs concernant la même variété d'huile tunisienne (NJ), tournant au tour de 0,1% et 0,25%. Selon ces auteurs, ces faibles acidités traduisent une faible hydrolyse durant l'extraction et le stockage de l'huile.

D'autres études menées par Dugo et al. (2004), ont montré une augmentation de l'acidité de l'huile durant la maturation des olives. Cette augmentation résulte d'une part de l'hydrolyse des triglycérides provoquée par les enzymes lipolytique et d'autre part de la biosynthèse des acides organiques (Matos et al., 2007).

#### 1.2.L'indice de peroxyde

Selon Perrin (1992), l'indice de peroxyde est un moyen pour prévoir une détérioration intérieure des qualités organoleptiques de l'huile. Selon, Ryan et al. (2002), l'indice de peroxyde détermine les hydro peroxydes et constitue l'un des moyens les plus directs pour mesurer l'oxydation lipidique. L'huile analysée montre une valeur relativement faible de 2,09 meq O<sub>2</sub>/Kg, cette valeur est inférieure à la norme du COI pour les huiles d'olives de catégorie extra-vierge (20 meq O<sub>2</sub>/Kg), ce qui indique une faible oxydation de l'huile. L'indice de peroxyde de l'huile de laté Neb Djmel analysée par Haddada et al. (2007) et Faouzia et al. (2008) est plus élevé que celle obtenue lors de cette étude, ces auteurs ont enregistré des valeurs de 7,9 et de 6,68 meq d'O<sub>2</sub> /kg respectivement. Ce paramètre peut être influencé par plusieurs facteurs, à savoir l'état des fruits et les conditions de récolte, transport, de stockage des olives et de leur transformation (Aidli ,2009).

### 1.3. Extinction spécifique

Extinction spécifique à 232 et à 270 nm a été mesurée afin d'évaluer les niveaux d'oxydation. La détermination de l'absorbance à 232 nm et au voisinage de 270 nm fournis des informations au sujet de la présence des diènes conjugués (k 232) et des triènes conjugués (K270) formé pendant l'autoxydation d'huile. Les diènes et les triènes conjugués sont proportionnels au degré d'oxydation de l'acide oléique, linoléique et linoléique (Dabbou et al., 2010). Les travaux de Perrin (1992), montrent que plus l'absorbance à 232 nm est forte plus le corps gras est peroxydé et que plus l'absorbance à 270 nm est forte plus il est riche en produits secondaires d'oxydation.

Pour l'huile de la variété Neb Djmel la valeur du coefficient K232 enregistré est de 1,48. Cette valeur résulte d'une oxydation possible de l'huile conduisant par conséquent à la formation d'hydroperoxydes conjugués, quant à la valeur du coefficient K270 est 0,22, ceci se justifie par la décomposition des hydroperoxydes ainsi formés et la formation des triènes conjugués.

En effet, selon ces résultats la valeur de l'IP était  $< 20$  meq O<sub>2</sub>/Kg d'huile, cette faible valeur ne signifie pas toujours l'absence du phénomène d'oxydation. Le recours à la détermination des coefficients (K232, K270) d'absorbance dans l'ultraviolet, renseigne sur la présence ou l'absence de produits d'oxydation primaire et secondaire dans l'huile.

Le résultat des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K232, K270) est proche de ceux enregistrés pour les variétés européennes introduites en Tunisie *Ascolana Tenera*, *Koroneiki* et *Picholine* qui varient entre 1,6 et 2,8 (pour le coefficient K232) et entre 0,1 et 0,2 (pour le coefficient K270) (Dabbou et al., 2009).

Les résultats d'extinction spécifique à 232 nm notés par Haddada et al., (2007) sont proches des valeurs obtenues lors de cette étude (1,64 et 1.63). Tandis que les résultats d'extinction spécifique à 270 nm enregistrés par les mêmes auteurs (0,11 et 0,10) sont inférieurs par rapport à la valeur trouvée qui est de 0,22.

**Tableau 18 :** Les indices physicochimique des huiles d'olives vierges établies selon le COI (2015) et la variété *Neb Djmel* testée.

	IA (%acide oléique)	IP (meq O2/kg)	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	Référence
<i>Huile d'olive vierge extra</i>	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	COI (2015)
<i>Huile d'olive vierge</i>	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,6	≤ 0,25	COI (2015)
<i>Huile d'olive vierge courante</i>	≤ 3,3	≤ 20	≤ 2,6	≤ 0,3	COI (2015)
<i>Huile d'olive vierge lampante</i>	≤ 3,3	Non limité	≤ 2,6	≤ 0,3	COI (2015)
<b><i>Huile variété Neb Djmel</i></b>	<b>0,8</b>	<b>2,09</b>	<b>1,48</b>	<b>0,22</b>	-

## 2. Stabilité oxydative de l'huile d'olive

La stabilité à l'oxydation d'une huile d'olive vierge est connue pour être plus importante par rapport à celle d'autres huiles comestibles, en raison de sa forte teneur en antioxydants naturels (tocopherols et composés phénoliques) et des niveaux d'insaturations relativement bas (Aguilera et al., 2005). La stabilité oxydative est l'un des paramètres les plus importants pour estimer la qualité de l'huile d'olive vierge. Le test de stabilité oxydative évalue le degré de susceptibilité d'une huile à l'oxydation (Mattia et al., 2014). La mesure de la stabilité d'un corps gras est réalisée par des tests d'oxydation accélérée au moyen de « Rancimat ». Il permet de déterminer le temps de résistance d'un échantillon à l'oxydation par conductimétrie (Rolland., 2004 ; Manai et al., 2008).

Dans ce travail, l'huile d'olive vierge (VOO) a été enrichie par des antioxydants provenant de plantes médicinales (*P. verticillata* et *S. satureioides*) sélectionnées pour leur vertus médicales et les résultats de l'analyse de leur activité biologiques et la composition chimique de leur composés bioactifs, le processus d'enrichissement a été effectué après optimisation de méthode de macération assistée par ultrason pendant une durée fixée.

En fait, l'enrichissement sous agitation à température ambiante suivi par une application de sonication pendant 15 min a été trouvé optimal pour permettre un transfert efficace des antioxydants à l'huile vierge.

Avant enrichissement, la variété *Neb Djmel* témoin a enregistré une période d'induction de 5,97 h. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par (Lecheb et al., 2015) qui ont enregistré une valeur de 6,25 h sur la même variété 'huile d'olive extra vierge.

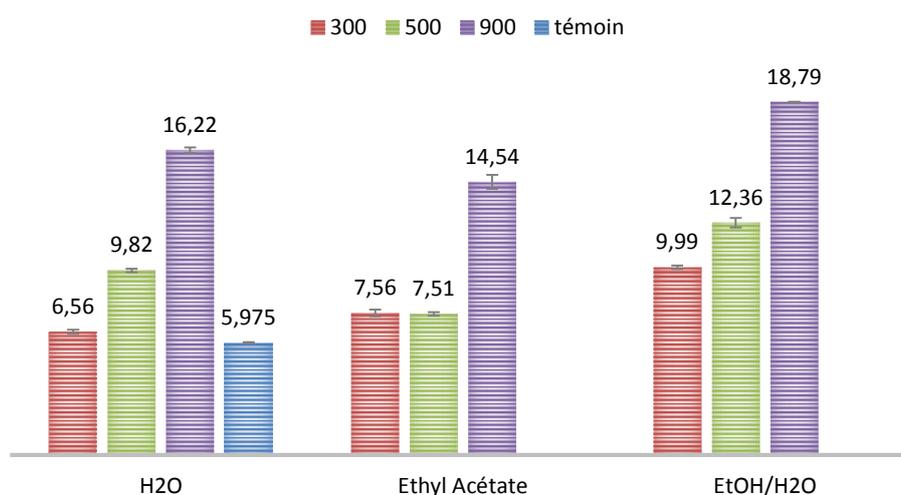
Comme cela était montré lors de la section précédente l'huile d'olive de la variété *Neb Djmel* contient une faible teneur en composés phénoliques (phenols totaux 73 mg AG/mg d'E et Flavonoides 19, 24 µg ECAT/mg d'E). En outre, plus le taux des polyphénols est bas plus la stabilité oxydative est faible et par conséquent la durée nécessaire à l'oxydation totale de la matière grasse est plus courte, ceci est confirmé par les travaux de Gonzalez et al. (1997). Cependant, selon Boskou., (2006), pour une meilleure stabilité, il convient que les huiles d'olives ne contiennent pas plus de 10 % d'acide linoléique, car cet acide gras insaturé est le principal responsable du vieillissement chimique de l'huile, tandis que l'étude de Lecheb et al., (2015) indique que l'huile de la variété *Neb Djmel* présente une teneur en acide linoléique de 14,33 % qui est légèrement supérieure à 10 %, ce qui laisse l'huile sujette à une oxydation rapide. (Haddam et al., 2014) ont évalué la stabilité oxydative de trois variétés d'huile d'olive (*Arbequine*, *Picholine marocaine*, *Picual*), Les résultats obtenus, montrent que les valeurs les plus élevées sont enregistrées chez la variété *Picual* (36 h), dues principalement à sa composition faible en acides gras polyinsaturés et à sa teneur élevée en antioxydants naturels (tocophérols gamma et orthodiphénols).

L'enrichissement de l'huile d'olive *Neb djmel* par des extraits naturels est nécessaire pour prolonger sa stabilité oxydative. Après enrichissement on constate (fig. 52 ; 53) que le temps d'induction d'huiles enrichies a augmenté proportionnellement avec la quantité et le type d'extrait ajouté. Cette conclusion est en accord avec les travaux de Ben rached et al . (2014). Les fig. n°52 et 53 ont montré que les huiles traitées avec les extraits de *P. verticillata* et *S. satureoides* ont subi une détérioration oxydative beaucoup moins accentuée que celle du témoin. Tandis que l'effet antioxydant des extraits de *S. satureioides* manifeste une meilleure stabilité oxydative comparativement à celui de *P. verticillata* qui peut être expliquée par la teneur en phenols totaux et Flavonoides de cette plante qui est relativement plus élevée que la seconde plante, induisant un pouvoir antioxydant développé lors de la section précédente par l'activité antiradicalaire (DPPH) et la capacité de chélation des métaux.

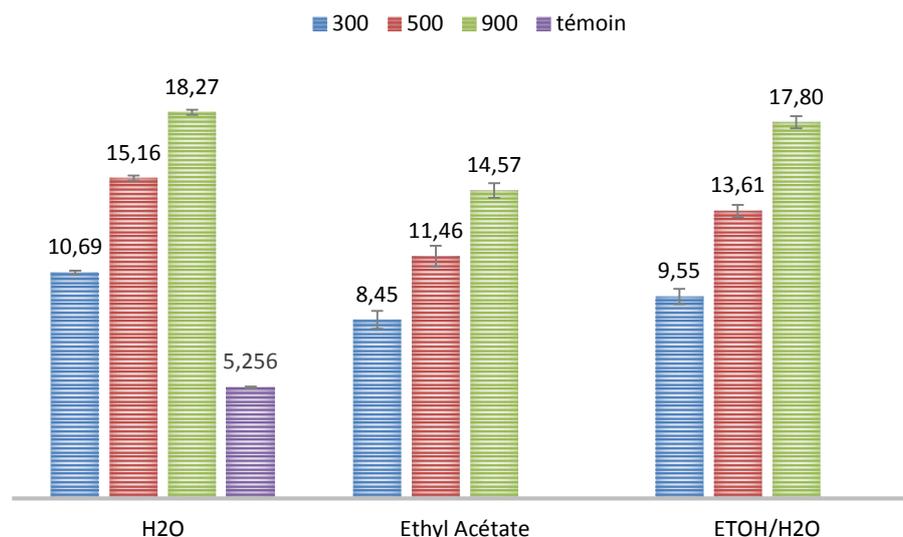
Par ailleurs, l'enrichissement des huiles comestibles avec les polyphénols des plantes médicinales, peut être effectué de trois manières différentes : la première est de faire une extraction au solvant avant d'ajouter l'extrait à l'huile (extraction liquide-liquide). La deuxième méthode dans laquelle l'extrait sera purifié et séché, est partiellement dissout dans l'huile (extraction solide-liquide). La troisième est la combinaison de ces deux types d'extraction (Japon-Lujan et al., 2008).

Parmi les extraits utilisés à différentes concentrations l'extrait hydroéthanolique manifeste le meilleur effet protecteur atteignant à 900 ppm des valeurs de 17,80 et 18,79h comme valeurs les plus élevées respectivement pour *S. satureioides* et *P. verticillata* suivie par l'extrait aqueux et d'éthylacétate à 900 ppm qui un effet oxydative remarquablement élevé, ceci est probablement dû à la nature des molécules phénoliques a caractère antioxydant extraites par ces solvants.

Parmi les échantillons enrichis par les différents extraits de *P. verticillata*, l'huile qui enregistre le meilleur TI (18,79h) est celle enrichie à 900 ppm par l'extrait hydroéthanolique. Cet extrait présente la meilleure activité antiradicalaire parmi les autres extraits de *P. verticillata* (Extrait aqueux ; Extrait hydroéthanolique). Cependant, concernant *S. satureioides*, la période d'induction la plus élevée (18,27h) est enregistré par l'huile enrichie à 900 ppm par l'extrait aqueux qui a déjà donné une meilleure activité antioxydante et antiperoxydante dans la section plus haut.



**Figure 52.** Stabilité oxydative au Rancimat exprimée en temps d'inductions (h) des huiles enrichies par les différents extraits (en ppm) de *P. verticillata*.



**Figure 53.** Stabilité oxydative au Rancimat exprimée en temps d'inductions (h) des huiles enrichies par les différents extraits (en ppm) de *S. satureioides*.

La stabilisation des huiles végétales (huile d'olive, tournesol, soja...etc.), a fait l'objet de nombreuses recherches, ayant opté pour l'enrichissement de ces huiles à base de matrices végétales (origan, feuilles d'olivier...etc.). Kahouli., (2010) a étudié l'effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis L*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa Europea L.*) dans l'huile de canola chauffée. Bouhadjra., (2011), c'est intéressé à l'étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, les résultats obtenus ont montré que tous les échantillons d'huile contenant des antioxydants ont subi une détérioration oxydative moins accentuée que celle du témoin (sans additif). L'étude de certains auteurs (Suarez et al., 2010), se concentre sur l'étude du rôle des composés phénoliques dans la protections des corps gras, ces composés naturels extraits de feuilles d'olivier et de grignons et qui se mélange de façon systématique lors de l'extraction de l'huile d'olive offre une meilleure protection contre l'oxidation, ce qui mène à proposer un enrichissement pareil pour les huiles de friture raffinées afin de prolongez leur stabilité et la durée d'utilisation.

Une autre étude de Gharby et al. (2014), permet le suivie l'effet des Polyphénols extraits des margines sur la stabilité de l'huile de tournesol. Les résultats obtenus ont montré que les huiles traitées avec les antioxydants des extraits de margines ont subi une détérioration oxydative moins accentuée que celle du témoin (sans additifs). Yong.,

(2016) a prouvé que l'extrait du romarin peut être utilisé comme un antioxydant pour améliorer la stabilité à l'oxydation de l'huile végétale. Alors que, Abdeaziz et al. (2015), on étudié l'effet des polyphénols extraits à partir des tourteaux et des feuilles de l'olivier (*Olea europaea L*) sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive. Les résultats obtenus ont montré que les huiles traitées avec les antioxydants des extraits de l'olivier ont subi une détérioration oxydative beaucoup moins accentuée que celle du témoin.

L'amélioration de la qualité de l'huile par enrichissement à base d'extraits de plantes pourrait être un outil important envisageable pour fournir un produit avec une composition équilibrée et maintenu en acides gras durant la période du stockage ainsi qu'avec des niveaux optimaux de composés antioxydants naturels (Ben Rached et al., 2014), afin d'inhiber l'oxydation tout en préservant la qualité nutritionnelle et organoleptique de l'huile d'olive (Karabourniotis et al., 1996).

### Conclusion générale

---

**L**es substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans différentes industries. Par ailleurs, l'utilisation des molécules chimiques de synthèse est actuellement remise en cause, en raison des risques toxicologiques potentiels qu'engendrent ces molécules. Désormais, de nouvelles sources de biomolécules sont recherchées pour palier à ce problème. Toutefois, en raison des changements socio-économiques et culturels des consommateurs et des industriels au cours du temps, le milieu scientifique s'oriente vers l'investigation de nouvelles molécules d'origine végétale de fortes activités biologiques et sans risque sur la santé des consommateurs.

Ce travail a été réalisé dans le but de valoriser les connaissances de la médecine traditionnelle de la flore Algérienne vers des propositions d'applications industrielles par l'étude phytochimique par RP-HPLC et LC-DAD/MS-ESI de Douze (12) plantes médicinales et la mise en évidence des propriétés biologiques (Antioxydantes, Antitumorales et Antibactériennes) et dosage des composés bioactifs vers une application à micro-échelle par enrichissement d'un corps gras exposé à l'oxydation.

Cependant, les plantes choisies lors de cette étude ont des intérêts médicaux multiples, récoltées de plusieurs régions sur le territoire Algérien après des enquêtes ethnobotaniques et ethno-pharmacologiques pour orienter le choix des analyses à partir de l'usage traditionnel par les populations locales. Le mode d'administration le plus courant est sous forme d'infusion, ceci permet de choisir ce moyen d'extraction comme méthode adaptée pour l'analyse de toutes les plantes choisies.

☞ A l'issue de ce travail, il en ressort que tous les extraits (aqueux et par solvants) de ces plantes renferment des concentrations assez élevées en polyphénols et en flavonoïdes. De plus, l'étude de l'activité antioxydante des extraits bruts de la majorité des espèces par le piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du  $Fe^{3+}$  et par la décoloration du bêta-carotène et le test antiperoxydant TBARS a révélé une activité antioxydante importante.

- œ Ces plantes ont pu aussi agir comme agents anticancéreux avec des propriétés cytotoxiques bien marquées contre quatre lignées tumorales (Lignées HeLa et HepG2, NCI-H460 et MCF7) : En ce qui concerne la lignée MCF7, *T. pallescens*, *A. graveolens* et *L. guyonianum* donne le pouvoir le plus important. Tandis que *A. iva* s'avère être l'espèce ayant le plus faible potentiel antitumoral, sans aucune cytotoxicité contre les lignées cellulaires analysées. Au même titre que *A. unedo*, *H. hirsuta* et *P. verticillata* pour la lignée cellulaire NCI-H460 et *H. hirsuta* pour les lignées cellulaires HeLa et HepG2. D'autre part, aucune inhibition sur la culture primaire hépatique non tumorale (PLP2) a été observé ( $IG_{50} >400 \mu\text{g/mL}$ ) en dehors des espèces *A. graveolens* et *L. guyonianum* qui manifeste une action hépatotoxique.
- œ L'étude de l'HE des deux espèces *S. satureioides* (provenant de six régions) et *P. verticillata* montre des différences qualitatives et quantitatives dans la composition chimique. Le *Thymol* a été déterminé à avoir une concentration la plus élevée pour les deux espèces et avec plus de 50% pour de la composition globale pour *P. verticillata* qui était aussi l'espèce qui donne l'HE à fort potentiel antioxydant (DPPH et RP). L' $\alpha$ -Terpinenol avec une concentration moyenne d'environ 36% a été trouvé comme le composant principal dans les échantillons de *S. satureioides*. Les autres composants principaux de l'HE sont le borneol, la p-cymène, le camphène dans toutes les espèces de *S. satureioides*.
- œ L'analyse statistique montre que les espèces étudiées présentaient une grande hétérogénéité en ce qui concerne les paramètres évalués (dosage des composés phénoliques, activité antioxydante et antitumorale), ce qui nécessite l'application d'une analyse des composantes principales (ACP) pour pouvoir classer les meilleures espèces selon les paramètres étudiés.
- œ Les résultats de l'analyse catégorielle des composantes principales (CATPCA) permet de distinguer quatre groupes de plantes: 1- (*T. pallescens*, *S. satureioides* et *P. verticillata*) caractérisé principalement par leurs niveaux élevés en composés bioactifs; 2- (*H. scoparium*, *L. guyonianum* et *A. graveolens*) a montré une grande activité comme agent cytotoxique contre les lignées de cellules tumorales humaines); 3- (*H. salicornicum*, *A. unedo* et *T. hirsuta*) ne présentaient pas de résultats particulièrement élevés ou faibles dans aucun des cas; 4- (*A. iva*, *R. raetam* et *H. hirsuta*) ayant l'activité antioxydante la plus faible.

- œ Cette étude est la première de son genre en ce qui concerne l'identification des composés phénoliques de *T. pallescens*, *S. satureioides*, *L. guyonianum* et *P. verticillata* par chromatographie liquide (HPLC-UV-Vis et LC-MS). Les résultats indiquent que les infusions préparés du Thym (*T. pallescens*) et de *S. satureioides* contiennent des quantités considérables (les Pics majoritaires) d'acide Rosmarinique. Tandis que l'analyse par LC-DAD/MS-ESI du thym permet de distinguer l'acide Lithospermique et la Lutéoline-7-O-glucuronide comme des composés présents en forte quantité, au même titre que la Myricetine et ses dérivés glucolisés (Myricetin-galloylglucoside, Myricetin-O-glucuronide, Myricetin-O-glucoside, Myricetin-acetylglucuronide, Myricetin-O-rhamnoside et Myricetin-acetylglucuronide) pour l'espèce *L. guyonianum*. Cependant, *P. verticillata* a été majoré par l'acide 3,4-OH cinnamique Trans, la Myrecitine et la quercétine.
- œ L'empreinte phénolique de ces quatre espèces exhibe un large spectre d'action antibactérienne contre des isolats cliniques à fort potentiel de pathogénicité (CMI allant entre 2,5 et 20 mg/mL), ce qui permet de dévoiler une relation structure/activité très distinguée autorisant de conclure que les composés identifiés sont des principes actifs qui peuvent être utilisés comme alternative aux antibiotiques chimiquement synthétisés susceptibles de développer une résistance microbienne accrue. Toutefois, des test ultérieurs sont nécessaires pour isoler et caractériser ces composés bioactives avec plus d'investigations scientifiques *in-vivo* pour mieux comprendre leur efficacité et déterminer leurs propriétés pharmacodynamiques à plusieurs niveaux d'action.
- œ Durant ce travail, l'huile d'olive vierge (VOO) de la variété Neb Djmel, a été enrichie avec des plantes endémiques riches en antioxydants (*S. satureioides* et *P. verticillata*), le processus a été conduit en utilisant une technique optimisée par macération et ultrasons. L'enrichissement sous macération à température ambiante est trouvé très efficace pour le transfert des molécules antioxydantes vers l'huile exposée à l'oxydation accélérée au Rancimat. Les résultats des temps d'induction on permet globalement de distinguer un pouvoir protecteur de l'huile pauvre en antioxydant naturelles et permettent aussi de constater une possibilité d'enrichissement à une échelle industrielle.

En générale ces espèces apparaissent comme des sources promotrices de composés bioactifs qui peuvent être exploité dans l'industrie alimentaire et

pharmaceutique. D'autres recherches sont toutefois nécessaires pour convertir ce potentiel biologique des plantes vers un traitement prometteur du cancer dans une forme viable pour concevoir des options de traitement avec peu ou pas d'effets secondaires.

Tout de même, la liste de ces résultats qui en découlent ouvre de nombreuses nouvelles avenues pour les chercheurs en alimentation et pour les biomédicaux pour concevoir éventuellement des aliments et des traitements très efficaces et à faible coût pour plusieurs maladies générées du stress oxydatif. Bien que l'effet de l'alimentation équilibrée et riche en antioxydants sur les maladies cardiovasculaires et la carcinogénèse est encore à l'étude ; l'utilisation directe des plantes pour atténuer, prévenir et guérir ces maladies est clairement indicative. Dans un passé récent, un grand nombre d'espèces végétales ont été identifiées comme des agents antioxydants, antimicrobiens et anticancéreux potentiels qui peuvent être utilisés dans plusieurs applications industrielles. Toutefois, il sera irrefutable de :

- Suivre une étude détaillée sur la composition chimique par caractérisation des molécules phénoliques responsables de ces effets biologiques ;
- Procéder à la fraction, purification et à la séparation de ces molécules individuellement ;
- Faire des essais in-vivo par une expérimentation menée sur le vivant ;
- Envisager un moyen d'enrichissement direct des aliments, sans avoir un recours à l'extraction qui fait appel à l'utilisation des solvants chimiques parfois toxiques ;
- Conduire le contexte de ce travail vers une application industrielle de correction des aliments appauvri par une mise en œuvre de méthodologie bien adaptée sans altérer les qualités organoleptiques et conserver ou améliorer les qualités nutritionnelles.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelaziz L., Kaies S., Patrick M. (2015). Effet des polyphénols extraits à partir des tourteaux et feuilles de l'olivier (*Olea europaea* L) sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive. *IUT de Béthune – Université d'Artois*, 2-10.
- Achat, S., Tomao, V., Madani, K., Chibane, M., Elmaataoui, M., Dangles, O., & Chemat, F. (2012). Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 19(4), 777–786. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.12.006>
- Aguilera, M. P., Beltr, G., Ortega, D., Fern, A., Jiménez, A., & Uceda, M. (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars : “ Frantoio ” and “ Leccino ”, grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89, 387–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.046>
- Aidli A. (2009). Caractéristiques physico-chimiques et pouvoir antioxydant de l'huile d'olive de variétés algériennes. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Magister. *Université Abderahmane Mira de Bejaia*.p 56.
- Akrout, A., Gonzalez, L. A., El Jani, H., & Madrid, P. C. (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.003>
- Alcaraz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomas, F., & Ferretti, F. H. (2000). Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biologie*, 205, 231–240. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2000.2062>
- Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Park, C. H., & Park, S. U. (2014). Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal*, 13, 1192–1195.
- Algandaby, M. M., Alghamdi, H. A., Ashour, O. M., Abdel-Naim, A. B., Ghareib, S. A., Abdel-Sattar, E. A. and Hajar A. S. (2010). Mechanisms of the antihyperglycemic activity of Retama raetam in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2448-53.
- Alghazeer, R., El-saltani, H., Saleh, N., Al-najjar, A., & Hebail, F. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Science*, 4(5), 324–335.
- Almela, L., Blas, S., Fern, A., Roca, J., & Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic – mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.056>
- Amari, N. O., Bouzouina, M., Berkani, A., & Lotmani, B. (2014). Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), 104–109. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60324-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60324-8)
- Amin, N., Shawahna, R., Mustafa, A., Al-ramahi, R., Kasem, M., & Naser, A. (2016). Herbal remedies use by breast cancer patients in the West Bank of Palestine. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.050>
- Aminzadeh, M., Amiri, F., Abadi, E. A., & Mahdevi, K. (2010). Factors Affecting on Essential Chemical Composition of *Thymus kotschyanus* in Iran Former MSc Student of Natural Resources , *University of Tehran , Iran*, 8(7), 847–856.
- Amrani, F. El, Rhallab, A., Alaoui, T., Badaoui, K. El, & Chakir, S. (2009). Hypoglycaemic effect of *Thymelaea hirsuta* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9), 625–629.
- Andersen, Ø. M., & Markham, K. R. (2006). *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications* (Taylor & Francis).
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., Duarte, A.P. (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Industrial Crops and Products*, 30, 165–167.
- Ansari, M. A., Anurag, A., Fatima, Z., & Hameed, S. (2013). Natural Phenolic Compounds : A Potential Antifungal Agent. In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. A. Méndez-Vilas. (pp. 1189–1195).

## Références bibliographiques

- Anton R. & Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Lavosier, Tec & Doc. 521p. [ISBN 13 : 9782743007201](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8)
- Aouadi, R. J., Taoua, H. M., Alah, M. B. E. N. S., & Erchichi, A. F. (2009). Pomological Characterization and Mineral Study of Fruit of Some Local and Introduced Varieties of Olive-tree (*Olea europaea* L.) Cultivated in South of Tunisia. *Journal of Arid Land Studies*, 19-1, 181-184.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Dilek Özyurt. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, (12), 1496-1547.
- Aparicio, R., & Harwood, J. (2013). *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (Second Edi). Springer New York Heidelberg Dordrecht London. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8>
- Armstrong, D. (2010). *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. (D. Armstrong, Ed.). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1>
- Asami, D. K.; Hong, Y. J.; Barrett, D. M.; Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1237-1241.
- Ashok S, Jayashree G, Pankaja N (2012). Effects of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A review. *J. Dental Allied Sci.* 1(2), 63-66.
- Ashraf, A., Bhatti, I. A., Sultana, B., & Jamil, A. (2016). Study of Variations in the Extraction Yield, Phenolic Contents and Antioxidant Activities of the Bark of *F. religiosa* as a Function of extraction procedure. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 12, 8-13. <https://doi.org/10.6000/1927-5129.2016.12.02>
- Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Msanda, F., Saadi, B., Aoumar, A. A. Ben. (2012). In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Protection*, 40, 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.04.023>
- Atmani, D., Ruiz-larrea, M. B., Ruiz-sanz, J. I., Lizcano, L. J., Bakkali, F., & Atmani, D. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(4), 589-598.
- Atmani, F., Slimani, Y., Mimouni, M., Aziz, M., Hacht, B., & Ziyat, A. (2004). Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsuta* L. on experimentally nephrolithiasic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.028>
- Attou, A., Davenne, D., Benmansour, A., & Lazouni, A. (2017). Chemical Composition and Biological Activities of *Ammoides verticillata* Essential Oil from West Algeria. *Phytothérapie*, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1108-1>
- Azimova, S. S., & Vinogradova, V. I. (2013). *Natural Compounds: Flavonoids, Plant Sources, Structure and Properties* (1st ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0535-1>
- Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, Z. F., Benmehdi, H., & Belkacem, N. (2012). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(10), 2041-2050. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1796>
- Bakchiche, B., Gherib, A., Aazza, S., Gago, C., & Grac, M. M. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46, 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.020>
- Bakkali, F., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb. f.: An underexploited and highly disseminated. *Industrial Crops and Products*, 89, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.024>

## Références bibliographiques

- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Barros, L., Queiro, B., Ferreira, I. C. F. R., & Baptista, P. (2007). Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103, 413–419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.038>
- Basanta, M. F., Marin, A., & Leo, S. A. De. (2016). Antioxidant Japanese plum (*Prunus salicina*) microparticles with potential for food preservation. *Journal of Functional Foods*, 24, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.015>
- Bekhechi C, Boti JB, Bekkara FA, et al. (2010) Isothymol in ajowan essential oil. *Nat Prod Commun* 5:1107–10.
- Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires. Ibis Press, Paris.
- Belmekki, N., & Bendimerad, N. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in methanol crude extracts from three Lamiaceae grown in southwestern Algeria. *Journal of Natural Products and Plant Resources*, 2(1), 175–181.
- Ben Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-hamada, R., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49, 904–914. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.047>
- Ben Jannet, H., Chaari, A., Mighri, Z., Martin, M.T., Loukaci, A., 1999. Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga pseudoiva* leaves. *Phytochemistry* 52, 1541–1545.
- Ben Rached M., Abdallah M., Guerfel M., 2014. Compositional quality of Zalmati virgin olive oil: Effect of the aromatization process with rosemary essential oils (*Rosmarinus officinalis* L.). *African Journal of Agricultural*. Vol. 9(44), 3276-3282.
- Ben, I., Hadj, E., Chaouachi, M., Bahri, R., & Chaieb, I. (2015). Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Industrial Crops & Products*, 77, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.046>
- Benarba, B. (2016). Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria : An ethnobotanical study. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(4), 320–330. <https://doi.org/10.5455/jice.20160814115725>
- Bendahou, M., Benyoucef, M., Muselli, A., Desjobert, J., Paolini, J., Bernardini, A., & Costa, J. (2014). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. Essential Oil and Extract Obtained by Microwave Extraction. Comparison with Hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 20(2), 174–178. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9699984>
- Bendahou, M., Benyoucef, M., Muselli, A., Desjobert, J.-M., Paolini, J., Bernardini, A.-F., Costa, J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. essential oil and extract obtained by microwave extraction, comparison with hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 20, 174–178.
- Benjilali B, Hammoumi M, M'Hamedi A, Richard H. (1987). Essential oil composition of different Moroccan thyme varieties: principal component analysis. *Sci. Aliments*, 7, 275–299
- Berdowska, I., Zielinski, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J., & Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chemistry*, 141, 1313–1321.
- Biondi, D. M., Sari, M., Ghani, Z. A., & Ruberto, G. (2006). Essential oil of Algerian *Saccocalyx satureioides* Coss. et Durieu. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 546–548. <https://doi.org/10.1002/ffj.1661>
- Bisio A., Corallo A., Gastaldo P., Romussi G., Ciarallo G., Fontana N., De Tommasi N. (1999). *Annals of Botany (London)*, 83, 441p.
- Bnouham, M., Benalla, W., Asehraou, A., & Berrabah, M. (2012). Antibacterial activity of essential oil from *Ptychotis verticillata*. *Spatula DD*, 2(1), 69–73. <https://doi.org/10.5455/spatula.20120119070423>
- Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., Ziyat, A. (2002). Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diab. Metab.* 10, 1–33.
- Bnouham, M., Merhfour, F.Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maâllem, S., Ziyat, A., (2007). Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Pharmazie* 62, 630–632.

## Références bibliographiques

- Bnouham, M., Merhfour, F.Z., Ziyat, A., Aziz, M., Legssyer, A., Mekhfi, H. (2010). Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 865–871.
- Bondi, M.L., Al-Hillo, M.R.Y., Lamara, K., Ladjel, S., Bruno, M., Piozzi, F., Simmonds, M.S.J. (2000). Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 1023–1025
- Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, A., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilar, F., et al. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7972–7980.
- Boskou D., Blekas G., Tsimidou M., 2006. Olive oil composition. Dans D. Boskou (Ed.), *Olive oil, chemistry and technology* (2nd edition). *Champaign Illinois: American oil chemists society. USA.* 15, 41-72.
- Bouderbala, S., Lamri-Senhadj, M., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M. (2008). Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. *Phytomedicine* 15, 453–461.
- Bouhadja K., (2011). Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive. *Thèse de magister. Université mouloud mammeri, Tizi-ouzou.*
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M., Costa, M. M., Figueiredo, A., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2007). Chemical composition antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff et Link. *Food Chemistry*, 105, 146–155.
- Bousbia, N. (2013). *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat.* Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Ex – INA El Harrach – Alger).
- Bouzabata, A., (2013). Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. *J. Pharmacog. Phytother.* 5, 12–20.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013a). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013b). The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236–1258.
- Carvalho, A. M., Henriques, M., & Santos-buelga, C. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC-DAD-ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Industrial Crops and Products*, 44, 104–110.
- Catarino, M. D., Talhi, O., Rabahi, A., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2016). The Antiinflammatory Potential of Flavonoids The Antiinflammatory Potential of Flavonoids: Mechanistic Aspects. In *Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 48, pp. 65–99). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63602-7.00003-5>
- Cavalcanti, R. N., Forster-Carneiro, T., Gomes, M. T. M. S., Rostagno, M. a., Prado, J. M., & Meireles, M. a. a. (2013). *Uses and Applications of Extracts from Natural Sources. Natural Product Extraction: Principles and Applications.* Royal Society of Chemistry.
- Chaieb, M., Boukhris, M. (1998). Flore succincte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie (Eds.). Association pour la protection de la nature et de l'environnement, Sfax, p. 67.
- Chamorro, E. R., Zambón, S. N., Morales, W. G., Sequeira, A. F., & Velasco, G. A. (2012). Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. In *Gas Chromatography in Plant Science* (pp. 307–324).
- Chemat, S., Aissa, A., Boumechhour, A., Arous, O., & Ait-amar, H. (2016). Extraction mechanism of ultrasound assisted extraction and its effect on higher yielding and purity of artemisinin crystals from *Artemisia annua* L. leaves. *Ultrasonics - Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.046>
- Chen, G., Li, X., Saleri, F., & Guo, M. (2016). Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. *Molecules*, 21, 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21101275>
- Chenni, A., Yahia, D. A., Boukourt, F. O., Prost, J., Lacaille-dubois, M. A., & Bouchenak, M. (2007). Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats

## Références bibliographiques

- fed a high-cholesterol diet. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.036>
- Chiacchierini, E., Mele, G., Restuccia, D., & Vinci, G. (2007). Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.008>
- Chizzola, R., Hanneliese, M., & Chlodwing, F. (2008). Antioxidative Properties of *Thymus vulgaris* Leaves : Chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6897–6904. <https://doi.org/10.1021/jf800617g>
- Choe, K. I., Kwon, J. H., Park, K. H., Oh, M. H., Kim, M. H., Kim, H. H., ... Lee, M. W. (2012). The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Phenolic Compounds Isolated from the Root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. *Molecules*, 17, 11484–11494. <https://doi.org/10.3390/molecules171011484>
- Cillard, J., Cillard, P., Cormier, M., Girre, L. (1980). a-Tocopherol prooxidants effect in aqueous media: increased autoxidation rate of linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 57, 252–255.
- CLSI, 2008. Document Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; M100-S18; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA
- Cossio, M. L. T., Giesen, L. F., Araya, G., Pérez-Cotapos, M. L. S., VERGARA, R. L., Manca, M., ... Ozawa, T. (2014). *Nutrition for Healthy Skin. Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Cristofari, G., Znini, M., Majidi, L., Mazouz, H., Tomi, P., Costa, J., & Paolini, J. (2012). Chemical Diversity of Essential Oils from *Asteriscus graveolens* (Forssk) Less: Identification of cis -8-Acetoxychrysanthenyl Acetate as a New Natural Component. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 727–738.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists*. (pp. 1250–1318).
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S. L., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2006). *Natural Products from Plants* (2nd ed.). CRC Taylor & Francis.
- Cushnie, Hamilton, V. E. S., Chapman, D. G., Taylor, P. W., & Lamb, A. J. (2007). Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1364–5072), 1562–1567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03393.x>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). International Journal of Antimicrobial Agents Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- Da Silva, A., & Jorge, N. (2014). Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 1208–1212.
- Dabbou D., Issaoui G., Servili M., Taticchi A., Sifi S., Montedoro G.F., Hammami M., 2009. Characterisation of virgin olive oils from European olive cultivars introduced in Tunisia. *European Journal of Lipids and Science Technology*. 111, 392-401.
- Dabbou S., Rjiba I., Nakbi A., Gazzah N., Issaoui M., Hammami M. (2010). Compositional quality of virgin olive oils from cultivars introduced in Tunisian arid zones in comparison to Chemlali cultivars, *Scientia Horticulturae*. 124, 122–127.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Daira, N. E., Maazi, M. C., & Chefrou, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de La Société Royale Des Sciences de Liège*, 85, 276–290.
- Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Lelyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J. P. H., et al. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *Journal of Natural Products*, 65, 892–896.

## Références bibliographiques

- Dastidar, S. G., Manna, A., Kumar, K. A., Mazumdar, K., Dutta, N. K., Chakrabarty, A. N., Shirataki, Y. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.06.003>
- Daur, I. (2013). Chemical composition of selected Saudi medicinal plants. *Arabian Journal of Chemistry*, 16, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.015>
- Dehak, D. (2013). *Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles Polyphénols Polyphénols*.
- Delattre J., Beaudoux J-L., Bonnefort-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : Aspect biologiques et pathologiques. Tec et Doc Lavoisier, Londres -Pris -New York.
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops & Products*, 82, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., & Chelghoum, C. (2006). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Aromatherapy*, 16, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2006.04.003>
- Dugo G., Lo Turco V., Pollicino D., Mavrogeni E. and Pipitone F., (2004). Caractérisation d'huiles d'olive vierges siciliennes. Variation qualitative des huiles des fruits des cultivars « *Biancolilla* », « *Nocellara del Belice* », « *Cerasuola* », « *Tonda Iblea* » et « *Crastu* » en fonction des techniques et de l'époque de récolte des olives. *Olivae*. 101, 44-52.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Louedec, L., Haloui, M., Michel, J.B. (2007). Antihypertensive activity of the aqueous extract of *Retama raetam* Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats. *J Herb Pharmacother*, 7, 65-77.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., Jouad, H. (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 97–103.
- Edziri, H., Mastouri, M., Cheraif, I. and M., Aouni (2010). Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia. *Natural Products Research*, 24, 789-96.
- El Amrani, F., Rhallab, A., Alaoui, T., El Badaoui, K., Chakir, S. (2009). Hypoglycaemic effect of *T. hirsuta* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 3, 625–629.
- El Haouari, M., Lopez, J.J., Mekhfi, H., Rosado, J.A., Salido, M.G. (2007). Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 325–331.
- El Hilaly, J., Lyoussi, B. (2002). Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 109–113
- El Hilaly, J., Tahraoui, A., Israili, Z.H., Lyoussi, B. (2006). Hypolipidemic effects of acute and subchronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 441–448.
- El Mokhtar, E. O., Tomi, P., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Desjobert, J., Costa, J., & Paolini, J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 533–536. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.019>
- El Ouariachi, E. mokhtar, Hamdani, I., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Majidi, L., Costa, J. Chetouani, A. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4), 281–286. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60573-9](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60573-9)
- El-Achi, N., Bakkour, Y., El-Nakat, H., & El-Omar, F. (2014). Journal of Natural Products HPLC analysis for identification and quantification of phenolic acids and flavonoids in *Juniperus excelsa*. *Journal of Natural Products*, 7, 162–167.
- El-hilaly, J., Tahraoui, A., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2007). Acute hypoglycemic, hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effects of continuous intravenous infusion of a lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* L. Schreber whole plant in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pakistanian Journal of Pharmaceutical Science*, 20(4), 261–268.

## Références bibliographiques

- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2003). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774–3779. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.062>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Stockholm, Sweden, 2013.
- Eymard S. (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. *Thèse Doctorat, Université de Nantes, France*.
- Fadeyi, S. A., Fadeyi, O. O., Adejumo, A. A., & Okoro, C. (2013). In vitro anticancer screening of 24 locally used Nigerian medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 1–9.
- Fakchich, J., Elachouri, M., 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 76–87.
- Faouzia M., H., Dhouha K., Hédia M., Imen O., Douja D., Mokhtar Z., 2008. Analytical evaluation of six monovarietal virgin olive oils from Northern Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 905–913.
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P.M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R.B., Santos, C.N. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients* 2, 214–229.
- Galati, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., O'Brien, P.J. (2000). Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabolism and Drug Interactions?* 17, 311–349
- Galvano, F., Fauci, L. La, Graziani, G., Ferracane, R., Masella, R., Giacomo, C. Di, Galvano, G. (2007). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Italian Extra Virgin. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 650–656. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.409>
- García, A., Ruiz-méndez, M. V., Romero, C., & Brenes, M. (2006). Effect of Refining on the Phenolic Composition of Crude Olive Oils. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 83(2), 2–7.
- Gharby S., Harhar H., Bouzoubaa Z., Roudani A., Chafchaoui I., Kartah B., Charrouf Z, 2014. Effet des Polyphénols extraits des margines sur la stabilité de l'huile de tournesol (Effect of Polyphenols extracts from margins on the stability of sunflower oil). *JMES*, 5, 446-469.
- Gonzalez G.R., Janer C., Janer M. L., Gutierrez F., Vazquez A., 1997. Relacion entre los polifenoles la calidad y estabilidad del aceite de oliva virgen. *Grasas Aceites*, 28, 101–106.
- Grassi, P.; Novak, J.; Steinlesberger, H. and Franz, C. (2004). A direct liquid, non- equilibrium solid-phase microextraction application for analysing chemical variation of single peltate trichomes on leaves of *Salvia officinalis*. *Phytochem. Anal.*, 15, 198–203.
- Guesmi, F., Ben Farhat, M., Mejri, M., & Landoulsi, A. (2014). In-vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtus* sp . algeriensis. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-114>
- Guimarães, R., Barros, L., Calhella, R. C., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal : A Comparative Study. *Plant Foods Human Nutrition*, 69, 37–42. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0394-5>
- Guimarães, R., Barros, L., Calhella, R. C., Maria, A., Santos-buelga, C., João, M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile : Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 136, 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.007>
- Gutteridge, J.M.C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41, 1819–1828.
- Haddada a., Faouzia m., Hédia m., Imen o., Douja d., Jacinto s., Emilio o. (2007). Fatty Acid, Triacylglycerol, and Phytosterol Composition in Six Tunisian Olive Varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 10941–10946.
- Haddam, M., Chimi, H., & Amine, A. (2014). Formulation d'une huile d'olive de bonne qualité. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 21(5), 1–10.
- Hajslova, J., Zachariasova, M., & Cajka, T. (2011). Mass Spectrometry in Food Safety. In *Methods in Molecular Biology* (Springer S, Vol. 747, pp. 259–266). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-136-9>

## Références bibliographiques

- Halliwell, B., (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* 9, 1–32.
- Halliwell, B., (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150.
- Halliwell, B., (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 107–112.
- Halliwell, B., Chirico, S., (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715–724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 125–126.
- Hamidi, A. (2013). *Etude phytochimique et activité biologique de la plante Limoniastrum guyonianum*. Université de Kasdi merbah ouargla.
- Hamrouni, I., Maamouri, E., Chahed, T., Aidi, W., Elyes, M., & Marzouk, B. (2009). Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.), 30, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.010>
- Hans-Jorg, J. (2011). Extraction of Natural Products from Plants – An Introduction. In H.-J. Bart & S. Pilz (Eds.), *Industrial Scale Natural Products Extraction* (1st ed., pp. 1–26).
- Harkati, B. (2011). *Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille asteraceae: scorzonera undulata*. Université mentouri-Constantine.
- Hayet, E., Maha, M., Samia, A., Mata, M., Gros, P., Raida, H., Ali, M. M., Mohamed, A. S., Gutmann, L., Mighri, Z. and A., Mahjoub (2008). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of Retama raetam (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 2933–40.
- Hayet, E., Samia, A., Patrick, G., Ali, M., Maha, M., Laurent, G., Mighri, Z. and L., Mahjoub (2007). Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alysson* and *Retama raetam* grown in Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 1759–62.
- Hazzit, M. (2008). *Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie. Thèse de Doctorat*. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry*, 03–01
- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Jo, M., Ferreira, I. C. F. R., Morales, P., & Fern, V. (2015). Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.040>
- Heleno, S. A., Martins, A., João, M., Queiroz, R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1, 3–6. <https://doi.org/10.1007/s10298-004-0003-8>
- Hodek P., Trefil P. and Stiborova M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139, 1–21.
- Holmes, O. W. (1992). How Essential Oils Work. In *Essential Oils*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5440-2.00002-4>
- Hong, H., Landauer, M. R., Foriska, M. A., & Ledney, G. D. (2006). Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. *Journal of Basic Microbiology*, 46, 329–335. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510073>
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10576–10581.
- Hossain, S., Rahman, S., Bashar, A. B. M. A., Jahan, R., & Abdullah Al-Nahain, M. R. (2014). Rosmarinic acid: a review of its anticancer action. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(9), 57–70.
- Houghton, P.J., Raman, A., (1998). *Laboratory Hand Book for the Fractionation of Natural Extracts*, 1st ed. ITPs, London.
- Huang, D., Boxin Ou, & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

## Références bibliographiques

---

- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Hussein, S. A. M., Barakat, H. H., Nawar, M. A. M., & Willuhni, G. (1997). Flavonoids from ephedra. *Phytochemistry*, 45(7), 1529–1532.
- Iinuma, M., Tsuchiya, H., Satot, M., Yokoyama, J., Ohyama, M., Ohkawa, Y. Fujiix, T. (1994). Flavanones with Potent Antibacterial Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, 892–895.
- Jackman, R.L.; Yada, R.Y.; Tung, M.A.; Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as food colorants - a review. *Journal of Food Biochemistry*, 11, 201-247.
- Japon-Lujan R., Janeiro P., Luque de Castro M.D. (2008). Solid-liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasound assisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 7231–7235.
- Johnson, C. B.; Kazantzis, A.; Skoula, M.; Mitteregger, U. and Novak, J. (2004). Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. *Phytochem. Anal.*, 15, 286–292.
- Jones, Jr., J.B. and V.W. Case. (1990). Sampling, handling, and analyzing plant tissue samples, pp. 389-427. In: R.L. Westerman (Ed.), *Soil Testing and Plant Analysis*. SSSA Book Series 3. *Soil Science Society of America*, Madison, WI.
- Jorge FSF, Devanand LL, Tomikazu S, Arne H (2010). Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*, 15, 3135-3170.
- Joung, T., Nihei, K., Kubo, I., 2004. Lipoxygenase inhibitory activity of octyl gallate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3177–3181.
- Kabouche, A. (2005). *Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae*. Mentouri-constantine.
- Kadri, A., Zarai, Z., Chobba, I. Ben, Gharsallah, N., & Damak, M. (2011). Chemical composition and in vitro antioxidant activities of *Thymelaea hirsuta* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(15), 2930–2935. <https://doi.org/10.5897/AJB11.028>
- Kahouli I., (2010). L'effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis* L, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa Europea* L.) dans l'huile de canola chauffée. Faculté des études supérieures de l'université Laval.
- Kalra, Y. (1998). *Handbook of reference methods for Plant Analysis* (Taylor & F). CRC Press. <https://doi.org/10.1177/014662168300700312>
- Kambouche N, El-Abed D (2003) Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* L. Sprague from Oran Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 10–11.
- Karabourniotis G., Fasseas C., (1996). The dense indumentum with its polyphenols content may replace the protective role of the epidermis in some young xeromorphic leaves. *Canadian Journal of Botany*, 74, 347–351.
- Khaled-khodja, N., Boulekbache-makhlouf, L., & Madani, K. (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops & Products*, 61, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.037>
- Kim, S., Roh, J., Kim, D., Lee, H., & Ahn, Y. (2003). Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*, 39, 293–303.
- Koriem, K. M. M., Farraqm A. R. H., Badawy, A. A. and S. A., El-Toumy (2009). Role of some Egyptian medicinal plants against liver and kidney toxicity induced by cadmium chloride. *Toxicological Mechanisms and Methods*, 19, 524- 34.
- Kosar, M., Dorman, H. J. D., & Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 91, 525–533.
- Kozyra, M., Biernasiuk, A., & Malm, A. (2017). Natural drugs analysis of phenolic acids and antibacterial activity of extracts obtained from the flowering herbs. *Acta Poloniae Pharmaceutica Ñ Drug Research*, 74(1), 161–172.

## Références bibliographiques

- Krifa, M., Skandrani, I., Pizzi, A., Nasr, N., Ghedira, Z., Mustapha, N., Chekir-ghedira, L. (2014). An aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall induces anti-tumor effects in melanoma-injected mice via modulation of the immune response. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.033>
- Kuete et al. (2011) Kuete, V.; Ango, P.Y.; Fotso, G.W.; Kapche, G.D.; Dzoyem, J.P.; Wouking, A.G.; Ngadjui, B.T.; Abegaz, B.M. (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC Complement. Altern. Med.*, 25, 11–42.
- Kulisic et al., 2006 Kulisic, T., Radonic, A., & Milos, M. (2005). Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllus* L.) essential oils. *Italian Journal of Food Science*, 17, 315–325.
- Labarbe, B.; Cheyner, V.; Brossaud, F.; Souquet, J.M.; Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 2719-2723.
- Lahrech, K. (2010). Extraction et analyse des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Saccocalyx satureioides* tests d'activités antibactériennes et antifongiques. Oran Es-Sénia Faculté des Sciences.
- Lala, G.; Malik, M.; Zhao, C.; He, J.; Kwon, Y.; Giusti, M.M. (2006). Magnuson, B.A. Anthocyanin- rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr. Cancer*, 54, 84-93.
- Lamchouri, F., Benali, T., Bennani, B., Toufik, H., Majdoub Hassani, L. I., Bouachrine, M., & Lyoussi, B. (2012). Preliminary phytochemical and antimicrobial investigations of extracts of *H aloxylon scoparium*. *Journal of Materials Environmental Science*, 3(4), 754–759.
- Laouer H., Chaker N., Ferretti G., Reynaud C., de Billerbeck G., Haddioui L. and Belkhelfa H. (2004). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur., Poster presentation in the 35<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils, Giardini Naxos ME, Italy, 29 September-2 October.
- Lecheb F., Chebrouk F., Boudriche L. (2015). Caractérisation physico-chimiques de trois variétés d'huiles d'olives (Neb Djmel et mélanges variétaux) d'Algérie. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*. 64-69.
- Lee, K. G., & Shibamoto, T. (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4947–4952.
- Lesage-meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J., & Lorquin, J. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75, 501–507.
- Li, M., & Xu, Z. (2008). Quercetin in a Lotus Leaves Extract May be Responsible for Antibacterial Activity. *Archives of Pharmacal Research*, 31(5), 640–644. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1206-5>
- Liang, X., & Fang, W. (2006). *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*. (X. Liang & W. Fang, Eds.). John Wiley & Sons.
- Lin, J., Dou, J., Xu, J., & Aisa, H. A. (2012). Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of the Essential Oils and Crude Extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. *Molecules*, 17, 5030–5039. <https://doi.org/10.3390/molecules17055030>
- Liu, Y., Murakami, N., Ji, H., Abreu, P., Zhang, S., Murakami, N., Zhang, S. (2007). Antimalarial Flavonol Glycosides from *Euphorbia hirta*. *Pharmaceutical Biology*, 45(4), 278–281. <https://doi.org/10.1080/13880200701214748>
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990). Fruit Phenolics. Boca Raton, FL: *CRC Press*. 1-126.
- Maghrani M, Michel JB, Eddouks M. (2005). Hypoglycaemic activity of *Retama raetam* in rats. *Phytother. Res.*, 19: 125-128.
- Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P., & Becke, K. (2007). Chapitre: Tannins. In *Plant Secondary Metabolites* (Vol. 393, pp. 67–81). Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Book: *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press.
- Manai H., Mahjoub-Haddada F., Oueslati I., Daoud D., Zarrouk M. (2008). Characterization of monovarietal virgin olive oils from six crossing varieties. *Scientia Horticulturae*. 115 , 252–260.
- Manthey, J.A.; Grohmann, K.; Guthrie, N. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.*, 8, 135-153.

## Références bibliographiques

- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 167, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.094>
- Matei, A. O., Gatea, F., & Radu, G. L. (2015). Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC – MS. *Journal of Chromatographic Science*, 12, 1–8.
- Matos L.C., Cunha S.C., Amaral J.S., Pereira J.A., Andrade P.B., Seabra R. M. and Oliveira B. P.P. (2007). Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. *Cobrançosa*, *Madural* and *Verdeal Transmontana*) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chemistry*. 102, 406–414.
- Mattia, C. Di, Paradiso, V. M., Andrich, L., Giarnetti, M., Caponio, F., & Pittia, P. (2014). Effect of Olive Oil Phenolic Compounds and Maltodextrins on the Physical Properties and Oxidative Stability of Olive Oil O/W Emulsions. *Food Biophysics*, 9, 396–405. <https://doi.org/10.1007/s11483-014-9373-0>
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B., (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4009–4017.
- McCann, M.J.; Gill, C.I.; G, O.B.; Rao, J.R.; McRoberts, W.C.; Hughes, P.; McEntee, R.; Rowland, I.R. (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 1224–1230.
- McDougall, G.J.; Ross, H.A.; Ikeji, M.; Stewart, D. (2008). Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown in vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 3016–3023.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., Carvalho, P., (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2285–2291.
- Méndez-tovar, I., Sponza, S., Asensio-s-manzanera, M. C., & Novak, J. (2015). Contribution of the main polyphenols of *Thymus mastichina* subsp. *mastichina* to its antioxidant properties. *Industrial Crops & Products*, 66, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.029>
- Menvielle-bourg, F. J. (2005). La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*, 3, 118–121. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0087-9>
- Merghem, R., Jay, M., Viricel, M., Bayet, C., & Voirin, B. (1995). Five 8-c-benzylated flavonoids from *thymus hirtus* (labiateae). *Phytochemistry*, 38(3), 637–640.
- Merghoub, N. (2011). Recherche de substances naturelles issues de plantes médicinales Marocaines capables d’inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du col de l’utérus et étude de leurs mécanismes d’action. *Thèse de Doctorat*. Université Mohammed V – Agdal Faculté Des Sciences Raba.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., Clydesdale, F.M. (1980). Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45, 1099–1100.
- Miguel, M.G., Faleiro, M.L., Guerreiro, A.C., Antunes, M.D., (2014). *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules* 19, 15799–15823.
- Miquel JD, Richard HMJ. (1976). Sandret FG. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* ;, 24: 833–835.
- Miron, T. L., Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2011). Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4918–4927
- Mohagheghzadeh M, Faridi P, Ghasemi Y (2007) *Carum copticum* Benth. & Hook. Essential oil chemotypes. *Food Chemistry*, 100, 1217–9.
- Mukne, A. P., Viswanathan, V., & Phadatare, A. G. (2011). Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 13–19. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79095>
- Murat U, Mustafa T, Serpil O, Yusuf M, Gulden K (2011). Apoptotic and necrotic effects of carboxylated quercetin/polyethylenimine complex on HeLa cells. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5, 894–902.
- Naghdi Badi, H., Yazdani, D., Ali, S. M., & Nazari, F. (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*, 19, 231–236.
- Nagy, T. O., Solar, S., Sontag, G., & Koenig, J. (2011). Identification of phenolic components in dried spices and influence of irradiation. *Food Chemistry*, 128, 530–534.

## Références bibliographiques

- Nawab, A., Yunus, M., Mahdi, A. A., & Gupta, S. (2011). Evaluation of Anticancer Properties of Medicinal Plants from the Indian Sub-Continent, *Molecular and Cellular Pharmacology* 3(1), 21–29. <https://doi.org/10.4255/mcpharmacol.11.04>
- Nicoue, E.E.; Savard, S.; Belkacemi, K. (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 5626-5635.
- Nikolic, M., Glamoclija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Giweli, A., & Sokovi, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.006>
- Norma, P. M., Virginia, N.-M., Ral, R.-H., Jos, C. E., & Cristbal, N. A. (2014). A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal of Biochemistry Research*, 8(1), 14–18. <https://doi.org/10.5897/AJBR2013.0669>
- Note, T. (2014). Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction. *Thermo Fisher Scientific*.
- Novak, J.; Bahoo, L.; Mitteregger, U. and Franz, C.; (2006). Composition of individual essential oil glands of savory (*Satureja hortensis* L., Lamiaceae) from Syria. *Flavour Fragr. J.*, 21: 731–734.
- Osborn, A. E., & Lanzotti, V. (2009). *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application*. (A. E. Osborn & V. Lanzotti, Eds.). Springer Dordrecht Heidelberg London New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-85498-4>
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of the browning reaction: Antioxidative activities of 599 browning reaction. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., Yılmaz-Ersan, L., & Delikanli, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 393–396. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.416>
- Ozenda, P. (2004). Flore du Sahara septentrional et central, 3ème ed. CNRS, Paris, France.
- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E., & Javidnia, K. (2010). A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activity and Total Content of Phenolic Compounds of Cell Cultures and Wild Plants of Three Endemic Species of Ephedra. *Molecules*, 15, 1668–1678. <https://doi.org/10.3390/molecules15031668>
- Peña-neira, E. O. A., Ramírez-escudero, R. L. C., & Zamora-marín, F. (2009). Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research Technology*, 229, 859–866. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1121-1>
- Pereira, C., Barros, L., Alves, M.J., Pereira, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Phenolic profile and antimicrobial activity of different dietary supplements based on *Cochlospermum angolensis* Welw. *Ind. Crops Prod.* 74, 412–416
- Perrin J.L. (1992). Analyse des corps gras. In. « Manuel des corps gras ». Ed : *Tec et Doc, Lavoisier*. 2, 1198-1202.
- Pibiri M., (2006). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs Thèse de doctorat, *Institut des infrastructures, des ressources de l'environnement, Lausanne, Suisse*.
- Piluzza, G., & Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*, 49, 240–247. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501083>
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 2983–2989. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.054>
- Pisoschi, A. M., Cheregi, M. C., & Danet, A. F. (2009). Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches, 480–493. <https://doi.org/10.3390/molecules14010480>
- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

## Références bibliographiques

- Proestos, C., Chorianopoulos Nychas, G.-J. E., & Komaitis, M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1190–1195.
- Quezel, P., & S. Santa. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* (Vol. Tome II, pp. 350–1170). CNRS, Paris.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-casassus, C., & Pouysøgu, L. (2011). Natural Products Plant Polyphenols : Chemical Properties , Biological Activities , and Synthesis \*\* Angewandte. *Natural Products*, 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rached, W., Calhelha, R. C., Bennaceur, M., Marouf, A., Barros, L., Santos-buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Phytochemical characterization and bioactive properties of *Osyris quadripartita* Salzm . ex Decne . leaves from Algeria. *Royal Society of Chemistry*, 6, 72768–72776. <https://doi.org/10.1039/C6RA11787B>
- Rachid, A. (2013). *Contribution à l ' étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l ' Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier ( Ficus carica ) et de coloquinte ( Citrullus col.* Thèse de Doctorat e. Université.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Inverv. Aging* 2, 219–236.
- Ramkisson, J. S., Mahomoodally, M. F., Ahmed, N., & Subratty, A. H. (2012). Relationship Between Total Phenolic Content, Antioxidant Potential, and Antiglycation Abilities of Common Culinary Herbs and Spices 1 1. *Journal of Medicinal Food*, 15(12), 1116–1123. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0113>
- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 3–12.
- Raymond, C., & Nicola, G. (2015). *Natural Products Chemistry: Sources, Separations, and Structures*. (Taylor & Francis, Ed.). CRC Press.
- Reguieg, L. (2011). Using medicinal plants in Algeria. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), 126–127. <https://doi.org/10.5251/ajfn.2011.1.3.126.127>
- Reis, F. S., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Martins, A. (2011). A comparative study of tocopherols composition and antioxidant properties of in vivo and in vitro ectomycorrhizal fungi. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 820–824. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.033>
- Revilla, E.; Ryan, J.-M.; Martin-Ortega, G. (1998). Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4592-4597.
- Rialdi, G. (1993). Le naturel est souvent nuisible. *Lexicon Vevy Europe*, 15, 65–67.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827–831.
- Rodrigues, S., Calhelha, R. C., Barreira, J. C. M., Maria, A., Abreu, R. M. V, Santos-buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts : Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC – DAD – ESI / MS. *Food Research International Journal*, 49(1), 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.046>
- Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, volume. 11, numéro 6, 419-424.
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., & Kong, L. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC – DAD – ESI-MSn. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 59, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.10.007>
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92, 147-176.
- Ryan, D., & Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31–44.
- Saada, M., Falleh, H., Jalleli, I., Snoussi, M., & Ksouri, R. (2014). Phenolic profile, biological activities and fraction analysis of the medicinal halophyte *Retama raetam*. *South African Journal of Botany*, 94, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.06.010>

## Références bibliographiques

- Saldanha, L. L., Vilegas, W., & Dokkedal, A. L. (2013). Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. *Molecules*, *18*, 8402–8416. <https://doi.org/10.3390/molecules18078402>
- Santos-buelga, C., Gonzalez-manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology* (Vol. 864, pp. 427–464). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>
- Sarker, D. S., & Nahar, L. (2009). *Natural products isolation: Methods and protocols*. (J. M. Walker, Ed.), *Life Sciences* (Third Edit, Vol. 531). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_1)
- Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Inuma, M., Tosa, H., & Ohkawa, Y. (1996). Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, *54*, 171–176.
- Sato, Y., Suzuki, S., Nishikawa, T., & Kihara, M. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, *72*, 483–488.
- Scarabelli, T. M., Mariotto, S., Abdel-azeim, S., Shoji, K., Darra, E., Stephanou, A., Suzuki, H. (2009). Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury. *FEBS Letters*, *583*(3), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.037>
- Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 9329-9339.
- Semwal, D. K., Semwal, R. B., Combrinck, S., & Viljoen, A. (2016). Myricetin : A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients Review*, *8*, 1–31. <https://doi.org/10.3390/nu8020090>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods , beverages and spices : Antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of Functional Foods*, 1–78. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sharangi, A. B. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*, *42*, 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.007>
- Shi, J.; Nawaz, H.; Pohorly, J.; Mittal, G.; Kakuda, Y.; Jiang, Y. (2005). Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology. *Food Rev. Int.* *21*, 139-166.
- Skandrani, I., Bouhlel, I., Limem, I., Boubaker, J., Bhourri, W., Neffati, A., Ghedira-chekir, L. (2009). Toxicology in Vitro *Moricandia arvensis* extracts protect against DNA damage, mutagenesis in bacteria system and scavenge the superoxide anion. *Toxicology in Vitro*, *23*(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.010>
- Son, H. Le, & Anh, N. P. (2013). Phytochemical composition, in vitro antioxidant and anticancer activities of quercetin from methanol extract of *Asparagus cochinchinensis* (LOUR.) Merr . tuber. *Journal of Medicinal Plants Research*, *7*(46), 3360–3366. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5257>
- Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras .” *LWT - Food Science and Technology*, *41*, 739–745. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.04.003>
- Stalikas, C. D. (2010). Phenolic Acids and Flavonoids : Occurrence and Analytical Methods. In *Free Radicals and Antioxidant Protocols, Methods in Molecular Biology* (Humana Pre). <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8>
- Stefanovits-Bányai É., Tulok M. H., Hegedós A., Renner C. et Varga I. S. (2003) Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis*, *47* (1- 4), 111-113.
- Stocker, P., Yousfi, M., Djerridane, O., Perrier, J., Amziani, R., El Boustani, S., Moulin, A. (2004). Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie* *86*, 919–925.
- Suarez, M., Romero, M., & Motilva, A. (2010). Development of a Phenol-Enriched Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 10396–10403. <https://doi.org/10.1021/jf102203x>
- Taleb-contini, S. H., Salvador, M. J., Watanabe, E., Ito, I. Y., & Rodrigues de Oliveira, D. C. (2003). Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *39*, 403–408.

## Références bibliographiques

---

- Taylor, P., Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., & Kakuda, Y. (2005). Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods — Engineering and Technology. *Food Reviews International*, 21(1), 139–166. <https://doi.org/10.1081/FRI-200040606>
- Teffo, L. S., Aderogba, M. A., & Eloff, J. N. (2010). Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany*.
- Terpinc, P. (2016). LC – MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. *Food Chemistry*, 210, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.030>
- Toubal, O., Djahoudi, A., Henchiri, C., & Bouazza, M. (2012). Phytochemical Screening and Antimicrobial Evaluation of the Aqueous Extracts of *Ammoides verticillata*, an Endemic Species. *Journal of Life Sciences*, 6, 243–247.
- Trabelsi, N., Oueslati, S., Henry-vitrac, C., Waffo-téguo, P., Medini, F., Mérillon, J., ... Ksouri, R. (2013). Phenolic contents and biological activities of *Limoniastrum guyonianum* fractions obtained by Centrifugal Partition Chromatography. *Industrial Crops & Products*, 49, 740–746. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.011>
- Trabelsi, N., Oueslati, S., Ksouri, R., Nassra, M., Marchal, A., Krisa, S., Waffo-téguo, P. (2014). The antioxidant properties of new dimer and two monomers of phenolic acid amides isolated from *Limoniastrum guyonianum*. *Food Chemistry*, 146, 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.077>
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., and Boskou, D. (1992). *Food Chem.*, 44, 53
- Tuzen, M., & Ozdemir, M. (2003). Chromatographic Determination of Phenolic Acids in the Snowdrop by HPLC. *Turk J Chem*, 27, 49–54.
- Undeger, U., Basaran, A., Degen, G. H., & Bassaran, N. (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2037–2043.
- Vadhana, P., Singh, B. R., Bharadwaj, M., & Singh, S. V. (2015). Pharmaceutica Emergence of Herbal Antimicrobial Drug Resistance in Clinical Bacterial Isolates. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 6(10). <https://doi.org/10.4172/21532435.1000434>
- Vagiri, M., Ekholm, A., Johansson, E., & Rumpunen, K. (2012). An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.).
- Veillet, S., Tomao, V., & Chemat, F. (2010). Ultrasound assisted maceration : An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil, 123, 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.005>
- Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R. (2012). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10920–10929.
- Wannes, W. A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M. Ben, Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Marzouk, B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower, 48, 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.002>
- Webster, R.P.; Gawde, M.D. (1996). Bhattacharya, R.K. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Lett.*, 109, 185-191.
- Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>
- Xu, B.J.; Chang, S.K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72, 159-166.
- Yang, C.S.; Maliakal, P.; Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 25-54.
- Yang, Z., Wu, Y., & Wu, S. (2015). A combination strategy for extraction and isolation of multi-component natural products by systematic two-phase solvent extraction-13C NMR pattern recognition and following conical counter-current chromatography separation: Podophyllotoxins and flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.074>

## Références bibliographiques

---

- Yong Y., Xiaoxiao S., Xiaonan S., Baokun Q., Zhongjiang Wan., Yang L.J., (2016). Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. *Industrial Crops and Products*, 80, 141–147.
- Zarrouk. W., Haddada F.M., Baccouri B., Oueslati I., Taamalli W., Fernandez Z., Lizzani- Cuvelier L., Daoud D., Zarrouk M. (2008). Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 110, 81-88.
- Zekri, N., & Satrallah, A. (2016). Effect of geographic locations on chemical composition of *M. spicata* L. essential oils from Moroccan Middle-Atlas. *Scholars Research Library*, 8(4), 146–150.
- Zeng, G., Xiao, H., Liu, J., & Liang, X. (2006). Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 20, 499–506. <https://doi.org/10.1002/rcm.2332>
- Zerroug, M. M., Laouer, H., & Nicklin, J. (2011). The Effect of Essential Oil of *Saccocalyx Satureioides* Coss. Et Dur. On the Growth of and the Production of Solanapyrone a by *Ascochyta Rabiei* (Pass.) Labr, 5(2), 501–506.
- Zhang, A., Wan, L., Wu, C., Fang, Y., Han, G., Li, HWang, H. (2013). Simultaneous Determination of 14 Phenolic Compounds in Grape Canes by HPLC-DAD-UV Using Wavelength. *Molecules*, 18, 14241–14257. <https://doi.org/10.3390/molecules181114241>
- Zhang, M.; Zhang, J.P.; Ji, H.T.; Wang, J.S.; Qian, D.H. (1999). Effect of six flavonoids on proliferation of hepatic stellate cells in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* 21, 253-256.
- Zhang, Y.; Seeram, N.P.; Lee, R.; Feng, L.; Heber, D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 670-675.
- Zheng, W. F., Tan, R. X., Yang, L., & Liu, Z. L. (1996). Two Flavones from *Artemisia giraldil* and their Antimicrobial Activity. *Planta Medica*, 62, 160–162.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165–5517.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 58, 45-54.
- Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Ansari, A., Bouyanzer, A., Paolini, J., Hammouti, B. (2012). Green Approach to Corrosion Inhibition of Mild Steel by Essential Oil Leaves of *Asteriscus graveolens* (Forssk.) in Sulphuric Acid Medium. *International Journal of Electrochemistry Science*, 7, 3959–3981.
- Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., & Ayadi, M. A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food and Bioproducts Processing*, 54, 169–188. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.11.006>