

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université L'arbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi
Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre :

Thèse

Présentée par

BOUTELLAA Saber

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Spécialité: *Biochimie des produits naturels*

**Etude des biomolécules végétales de la flore des
zones humides et subhumides à visé thérapeutique:
Anti Alzheimer, antioxydante et antimicrobienne**

Devant le jury

Président:	GHERRAF Nouredine	Professeur	Université d'Oum El Bouaghi
Rapporteur:	ZELLAGUI Amar	Professeur	Université d'Oum El Bouaghi
Examineurs:	LAOUER Hocine	Professeur	Université de Sétif
	BOUBENDIR Abdelhafid	MCA	Université de Mila
	MOSBAH Asma	MCA	Université de Constantine 1

Année Universitaire 2019/2020

Remerciement

En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse,

Mes sincères remerciements vont à mon encadreur : Monsieur ZELLAGUI Ammar ; professeur à l'université d'Oum El Bouaghi et Directeur du Laboratoire de Biomolécules végétales et Amélioration des Plantes, pour sa disponibilité, ces conseils judicieux et constants qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail.

Mon respect et reconnaissance sont adressés à Monsieur GHERRAF Noureddine ; professeur à l'université d'Oum El Bouaghi, qui ma fait l'honneur de présider le jury de cette Thèse.

Mes remerciement vont également à Monsieur LAOUER Houcin ; professeur à l'université de Setif, Monsieur BOUBENDIR Abdelhafid ; Maître de Conférences « A » à l'université de Mila et M^{lle} MOSBAH Asma ; Maître de Conférences « A » à l'université de Constantine 1, d'avoir aimablement accepté d'examiner ce travail.

Une part importante de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Biochimie du Centre de Recherche en Biotechnologie à Constantine sous la responsabilité du Docteur BENSOUICI Chawki, que je lui exprime mes sincères remerciements, pour son aide et son accueil chaleureux au laboratoire.

Mes respects et reconnaissances sont adressés à Monsieur le professeur Mehmet ÖZTÜRK ; Directeur du laboratoire de Chimie et Monsieur le professeur Özgür CEYLAN Directeur du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Muğla, Turquie, qui malgré leurs nombreuses obligations ont aimablement accepté de m'accueillir au niveau de leurs laboratoires.

En fin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et mes remerciements.

Table des matières

Résumé	I
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VII
Introduction	01

Partie bibliographique

Chapitre I : Aperçu sur les espèces étudiées

1. <i>Thymus numidicus</i> Poiret.	04
1.1. Description botanique	04
1.2. Composition et phytochimie	05
1.2.1. Composés phénoliques	05
1.2.2. Composés phénoliques isolés du genre <i>Thymus</i>	06
1.2.3. Huiles essentielles	07
1.2.4. Huiles essentielles isolées de l'espèce <i>T.numidicus</i> Poiret.	08
1.3. Ethnopharmacologie	09
2. <i>Crithmum maritimum</i> L.	11
2.1. Description botanique	11
2.2. Composition et phytochimie	11
2.3. Ethnopharmacologie	12
3. <i>Satureja graeca</i> L.	14
3.1. Description botanique	14
3.2. Composition et phytochimie	15
3.3. Ethnopharmacologie	17

Chapitre II : Activités biologiques

1. Rappel sur l'activité antioxydante	19
1.1. Origine du stress oxydatif	19
1.2. Conséquences du stress oxydatif	20
1.3. Antioxydants et systèmes de défense	20
1.3.1. Antioxydants enzymatiques	20
1.3.2. Antioxydants non enzymatiques	21
1.4. Activité antioxydante des composés phénoliques	22
1.5. Activités antioxydantes des HEs	23
2. Alzheimer et activité anticholinestérase	24
2.1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer	24
2.2. Relation entre le stress oxydatif et la maladie d'Alzheimer	25
2.3. Activité anticholinestérase	25
2.4. Traitement actuel	26
2.5. Traitement traditionnel	27
2.6. Action des substances naturelles sur la MA	28
3. Activité antimicrobienne et résistance aux antimicrobiens	29
3.1. Généralités sur l'activité antimicrobienne	29

3.2.Résistances aux antibiotiques	29
3.3.Formation des biofilms	30
3.4.Activité antimicrobienne des HEs	31
3.5.Activité antimicrobienne des composés phénoliques	32

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal	34
1.1. <i>Thymus numidicus</i> Poiret.	34
1.2. <i>Crithmum maritimum</i> L.	34
1.3. <i>Satureja graeca</i> L.	35
2. Etude phytochimique	36
2.1.Extraction des huiles essentielles	36
2.2. Analyse des HEs par GC/MS	36
2.3.Préparation des extraits à partir de <i>C.maritimum</i> L. et <i>S.graeca</i> L.	37
2.4.Quantification des composés phénoliques totaux	40
2.5.Quantification des flavonoïdes	40
2.6.Analyse des composés phénoliques par CLHP-DAD	40
3. Etude des activités biologiques	41
3.1.Activité antioxydante	41
3.1.1. Piégeage du radical libre DPPH	41
3.1.2. Piégeage de l'ABTS	42
3.1.3. Piégeage de l'anion superoxyde	43
3.1.4. Blanchissement du β -carotène	43
3.1.5. Pouvoir réducteur	44
3.1.6. Test de réduction du cuivre (CUPRAC)	44
3.2.Activité Anti-Alzheimer	44
3.2.1. Activité anti-acétyl (butyryl) cholinestérase	44
3.3.Activité antimicrobienne	46
3.3.1. Microorganismes et conditions de culture	46
3.3.2. Détermination des CMI's	46
3.3.3. Activité antibiofilm	47
4. Analyses statistiques	47

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Etude phytochimique	48
1.1.Huiles essentielles de <i>T. numidicus</i> Poiret.	48
1.1.1. Aspects et rendements des HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret	48
1.1.2. Composition chimique des huiles essentielles de <i>T.numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	49
1.2.Huiles essentielles de <i>C.maritimum</i> L.	54
1.2.1. Aspects et rendements des HEs de <i>C.maritimum</i> L.	54
1.2.2. Composition chimique des huiles essentielles de <i>C. maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	55
1.3.Fractions phénoliques de <i>C. maritimum</i> L. et <i>S. graeca</i> L.	62

1.3.1. Rendements	62
1.3.2. Teneurs en Phénols Totaux et flavonoïdes	63
1.3.3. Identification des composés phénoliques	66
1.3.3.1.Fractions de <i>C.maritimum</i> L.	66
1.3.3.2.Fractions de <i>S. graeca</i> L.	71
2. Activités biologiques	76
2.1.Activité antioxydante	76
2.1.1. HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	77
2.1.2. Huiles essentielles de <i>C.maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	80
2.1.3. Fractions de <i>C.maritimum</i> L.	82
2.1.4. Fractions de <i>S. graeca</i> L.	85
2.1.5. Corrélation entre la teneur en CPT et l'activité antioxydante	88
2.2.Activité anti-Alzheimer	90
2.2.1. HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	90
2.2.2. Fractions de <i>C.maritimum</i> L.	93
2.2.3. Fractions de <i>S. graeca</i> L.	93
2.3.Activité antimicrobienne	95
2.3.1. HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	95
2.3.2. HEs de <i>C. maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	99
2.3.3. Fractions phénoliques de <i>C.maritimum</i> L.	101
2.3.4. Fractions phénoliques de <i>S. graeca</i> L.	103
Conclusion	106
Références bibliographiques	109
Annexes	

Résumé

Les travaux présentés contribuent à une évaluation des biomolécules végétales de trois espèces provenant des régions humides et subhumides (Jijel et Mila), dont les huiles essentielles et fraction phénoliques de *T.numidicus* Poiret., *S.graeca* L. et *C.maritimum* L. ont été caractérisés chimiquement et testés pour leurs activités antioxydantes, anticholinestérases et antimicrobiennes. Les HEs, obtenus par hydrodistillation, sont analysées par GC/MS. Une variation en rendements et en composition chimique a été enregistrée par les huiles en fonction du stade phénologique. Le thymol et l'apiol représentent les composés actifs dominants des HEs de *T. numidicus* et *C. maritimum* respectivement, avec des teneurs maximale enregistrés en stade de fructification (89,69% et 35,32%). Les fractions AcOEt et *n*-but de *S.graeca* L. et de *C.maritimum* L. analysés quantitativement par spectrométrie ont montré une grande richesse en CPT et flavonoïdes. L'analyse qualitative par HPLC/DAD a permis d'identifier une diversité de composés phénoliques. L'acide chlorogénique connu pour ses propriétés pharmacologiques diverses a été détecté comme composé majeur dans toutes les fractions, allant jusqu'à 120 µg/g dans la fraction *n*-but de *C.maritimum* L. L'évaluation du potentiel antioxydant *in vitro* par six méthodes (DPPH, ABTS, β-carotène, O₂^{•-}, CUPRAC et PR) a révélé des capacités antioxydantes à différents niveaux chez les HEs et fractions et que les fractions AcOEt et *n*-but des deux espèces *S.graeca* et *C.maritimum* sont les plus puissantes. Ces résultats montrent clairement une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en CPT, surtout avec les tests CUPRAC, O₂^{•-} et β-carotène. Par ailleurs, l'étude de l'activité anti-cholinestérase montre que les HEs de *T.numidicus* sont des inhibiteurs très puissants de l'AChE et BChE. L'huile en stade de fructification était le plus efficace, offrant de meilleurs pourcentages d'inhibition (95,39±2,35 et 83,35±0,51% de l'AChE et de la BChE respectivement) à 200 µg/mL, mieux que la galanthamine. Nos extraits ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne. Les HEs de *T.numidicus* ont révélé la plus forte activité vis-à-vis toutes les souches microbiennes testées en donnant des CMI comprises entre (0,062 - 0,25) mg/mL. L'HE en stades 2 et 3 était plus actif que celle en stade végétatif contre *S. aureus*. De plus, l'huile en pleine floraison a montré une réduction de 64,25% de la formation de biofilm par *P. fluorescens* à 0,25 mg/mL. Ces résultats indiquent que les espèces étudiées sont une source riche en diverses biomolécules naturelles qui pourraient être utiles dans la prévention et le traitement des maladies liés au stress oxydatif, Alzheimer et des maladies infectieuses.

Mots clés : Huiles essentielles, composés phénoliques, antioxydants, anticholinestérases, antimicrobiens, antibiofilm.

Abstract

The present work describes the assessment of plant biomolecules of three species from humid and subhumid regions (Jijel and Mila). The essential oils and polar fractions of *T. numidicus* Poiret., *S. graeca* L. and *C. maritimum* L. have been chemically characterized and also investigated for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. The EOs, obtained by hydrodistillation, were analyzed by GC/MS. A variation in yields and chemical composition was recorded by the oils as a function of the phenological stage. Thymol and apiol represent the dominant active compounds of the EOs of *T. numidicus* and *C. maritimum* respectively, with maximum levels recorded in the fruiting stage (89.69% and 35.32%). The ethyl acetate and *n*-butanol fractions from *S. graeca* L. and *C. maritimum* L. were quantified spectrometrically, both fractions showed high amounts of total phenolics and flavonoids. The qualitative analysis by HPLC/DAD allowed identifying a variety of phenolic compounds. Chlorogenic acid known for its various pharmacological properties has been detected as a major compound in all fractions, up to 120 µg/g in the *n*-but fraction of *C. maritimum* L. The antioxidant potential was assessed by six *in vitro* methods (DPPH, ABTS, β-carotene, O₂^{•-}, CUPRAC and RP) revealed antioxidant capacities at different levels in all extracts and that the EtAcO and *n*-but fractions were the most powerful. These results clearly show a positive correlation between antioxidant activity and total phenolic content, especially with the CUPRAC, O₂^{•-} and β-carotene tests. Furthermore, the study of anticholinesterase activity shows that the EOs of *T. numidicus* are very potent AChE and BChE inhibitors. Hence the activity varies according to different phenological stages. The EO at fruiting stage was the most effective, offering better inhibition percentages (95.39 and 83.35 % of AChE and BChE respectively) at 200 µg/mL, which were better than galanthamine. Our extracts were also screened for their possible antimicrobial activity. The EOs of *T. numidicus* revealed the best activity against all microorganisms tested with MICs between (0.062 - 0.25) µg/mL. The EOs in beginning and full flowering were more active than that in vegetative stage against *S. aureus*. In addition, The EO in full flowering stage Showed 64.25% reduction in biofilm formation of *P. fluorescens* at 0.25 mg/mL. These findings indicate that studied species are a rich source of various natural biomolecules which could be useful in the prevention and treatment of diseases related to oxidative stress, Alzheimer's and infectious diseases.

Key words: Essential oils, phenolic compounds, antioxidants, anticholinesterases, antimicrobials, antibiofilm.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تقييم المواد الفعالة بيولوجيا لثلاثة أنواع نباتية من المناطق الرطبة و شبه الرطبة (جيجل و ميلة). و ذلك من خلال دراسة التحاليل الفيتوكيميائية والبيولوجية للزيوت الأساسية والقطفات الفينولية لكل من *T. numidicus* Poiret. ، *S. graeca* L. و *C. maritimum* L. . حيث تم تقييم أنشطتها المضادة للأكسدة، المثبطة للكولينستراز والصد ميكروبية. فقد سمح التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بواسطة GC/MS بالكشف عن وجود تباين في المردود و التركيب الكيميائي وفقاً لمراحل النمو المختلفة. يمثل كلا من thymo1 و apio1 المركبات الأعظمية النشطة لكل من *T. numidicus* و *C. maritimum* ، مع تسجيل مستويات قصوى في مرحلة الإثمار (89,69 % و 35,32 % على التوالي). و قد أظهر التحليل نصف الكمي للقطفات الفينولية أسيئات الإيثيل و ن-بيوتانول بواسطة قياس المطيافية مستويات عالية من المركبات الفينولية الكلية والفلافونويدات. كما سمح التحليل النوعي بواسطة HPLC/DAD بتحديد مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية، حيث تم اكتشاف حمض الكلوروجينيك المعروف بخصائصه الفارماكولوجية المختلفة كمركب رئيسي في جميع القطفات، و قد بلغ 120 مكغ/غ في مستخلص ن-بيوتانول لـ *C. maritimum* L. . تم تقييم الفعالية المضادة للأكسدة بواسطة ستة طرق اعتماداً على آليات مختلفة (DPPH ، ABTS ، β -كاروتين ، $O_2^{\cdot-}$ ، CUPRAC) والقدرة الإرجاعية) ، وقد أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات تملك قدرات مضادة للأكسدة على مستويات مختلفة مع تسجيل فعالية معتبرة من طرف القطفات الفينولية لكل من *S. graeca* L. و *C. maritimum* L. . كما بينت هذه النتائج وجود علاقة إيجابية بين النشاط المضاد للأكسدة والمحتوى الكلي للمركبات الفينولية، سيما مع اختبارات CUPRAC و $O_2^{\cdot-}$ و β -كاروتين. علاوة على ذلك ، تشير دراسة النشاط المثبط لإنزيمات الكولينستراز إلى أن الزيوت الأساسية لـ *T. numidicus* هي مثبطات قوية للغاية لكلا من الانزيمين AChE و BChE. يختلف هذا النشاط وفقاً لمراحل النمو المختلفة، و قد أبدى الزيت في مرحلة الإثمار أكثر فعالية، حيث قدم نسب تثبيط (95,39 و 83,35% لكل من AChE و BChE على التوالي) بتركيز 200 ميكروغرام/مل أفضل من جالانثامين. كما تم فحص المستخلصات لنشاطها المضاد للميكروبات، و قد أبدت الزيوت الأساسية لـ *T. numidicus* نشاطاً قوياً تجاه جميع السلالات الميكروبية التي تم اختبارها ، و ذلك بتسجيل قيم أدنى تراكيز للتثبيط بين (0,062-0,25) ملغ/مل. و كانت الزيوت في مرحلتي بداية الإزهار والإزهار الكامل أكثر نشاطاً من تلك في المرحلة الخضرية ضد *S. aureus* . كما أظهر الزيت في مرحلة الإزهار الكامل قدرة كبيرة على تثبيط تكوين الأغشية الحيوية خاصة للسلالة *P. fluorescens* بنسبة 64,25% عند 0,25 ملغ/مل. تشير هذه النتائج إلى أن الأنواع التي شملتها الدراسة هي مصدر غني للعديد من الجزيئات الحيوية الطبيعية التي يمكن أن تكون مفيدة في العلاج و/أو الوقاية من الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي ومرض الزهايمر والأمراض المعدية.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية، المركبات الفينولية ، مضادات الأكسدة ، النشاط المثبط

للكوليناستيراز، النشاط ضد ميكروبي، النشاط المثبط للأغشية الحيوية.

Liste des abréviations

- ABTS** : 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
- ACh** : Acétylcholine
- AChE** : Acétylcholinesterase
- ATCC** : American type culture collection
- A β** : Protéine β -Amyloid
- BChE** :Butyrylcholinesterase
- BHA** : Butyle hydroxyanisole
- BHT** : Butyle hydroxytoluène
- CAT**: catalase
- CLHP- DAD**: Chromatographie liquide à Haute Performance- Diode Array Detector
- CMI**: Concentration minimale inhibitrice
- CPT**: composés phénoliques totaux
- CUPRAC** : Cupric Reducing Antioxidant Capacity
- DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- DPPH** : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
- FDA**: Food and Drug Administration
- GC/MS**: Gas Chromatography/ Mass Spectrometry
- GPx** : glutathion peroxydase
- GR** : glutathion réductase
- GSH** : glutathion
- GSSG** : disulfure de glutathion
- HEs** : Huiles essentielles
- MDA**: Malonyldialdehyde
- MHB** : Bouillon Mueller Hinton
- MUKK** : Culture Collection of Mugla Sitki Kocman University
- NBT** : Nitroblue Tetrazolium
- NCCLS**: National Committee for Clinical Laboratory Standards
- NMDA** : N-Methyl-D-Aspartate
- O $_2^{\cdot-}$** : Anion superoxide
- PG** : propyle gallate
- SOD** : Superoxyde dismutase
- TBHQ** : tert-butylhydroquinone
- TSB** : bouillon Tryptone-Soja (TSB)
- UFC** : Unité formant des colonies

Liste des figures

Figure 01	Voies de biosynthèse des composés phénoliques	06
Figure 02	Biosynthèse des principaux constituants métaboliques des huiles essentielles	07
Figure 03	Aspects de lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA	24
Figure 04	Schéma de fonctionnement des inhibiteurs de la Cholinestérase	26
Figure 05	Représentation photographique de l'espèce <i>T.numidicus</i> Poiret. en floraison ..	34
Figure 06	Représentation photographique de l'espèce <i>C. maritimum</i> L. en floraison	34
Figure 07	Représentation photographique de l'espèce <i>S. graeca</i> L. en floraison	35
Figure 08	Image satellitaire de la localisation des trois stations d'étude	35
Figure 09	Montage d'extraction des huiles essentielles (type Clevenger)	36
Figure 10	Protocole d'extraction des composés phénoliques	39
Figure 11	Réduction radical libre du DPPH'	42
Figure 12	Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H ⁺ ...	42
Figure 13	Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman	45
Figure 14	Rendements en HEs de l'espèce <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	48
Figure 15	Classes chimiques des HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	50
Figure 16	Répartition des composés majoritaires des HEs de <i>T.numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	50
Figure 17	Structures des composés majoritaires des HEs de <i>T.numidicus</i> Poiret.	51
Figure 18	Rendements en HEs de l'espèce <i>C.maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	54
Figure 19	Classes chimiques des HEs de <i>C. maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	57
Figure 20	Répartition des composés majoritaires des HEs de <i>C. maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	58
Figure 21	Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile de <i>C. maritimum</i> L. en stade végétatif	58
Figure 22	Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile de <i>C. maritimum</i> L. en stade de floraison	59
Figure 23	Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile de <i>C. maritimum</i> L. en stade de fructification	59
Figure 24	Rendements des fractions de l'espèce <i>S. graeca</i> L.	62
Figure 25	Rendements des fractions de l'espèce <i>C. maritimum</i> L.	62
Figure 26	Chromatogramme de la fraction AcOEt de <i>C. maritimum</i> L. à 254 nm	67
Figure 27	Chromatogramme de la fraction <i>n</i> -but de <i>C. maritimum</i> L. à 254 nm.	67
Figure 28	Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction AcOEt de <i>C.maritimum</i> L.	68
Figure 29	Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction <i>n</i> -but de <i>C.maritimum</i> L.	69
Figure 30	Chromatogramme de la fraction AcOEt de <i>S. graeca</i> L. à 254 nm.	72
Figure 31	Chromatogramme de la fraction <i>n</i> -but de <i>S. graeca</i> L. à 254 nm.	72

Figure 32	Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction AcOEt de <i>S. graeca</i> L.	73
Figure 33	Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction <i>n</i> -but de <i>S. graeca</i> L.	74
Figure 34	Activité antioxydante des HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret.	77
Figure 35	Activité antioxydante des fractions de <i>C.maritimum</i> L.	82
Figure 36	Activité antioxydante des fractions de <i>S. graeca</i> L.	86
Figure 37	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des huiles essentielles de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	90
Figure 38	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des huiles essentielles de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	90

Liste des tableaux

Tableau 01	Classification botanique de l'espèce <i>Thymus numidicus</i> Poiret.	04
Tableau 02	Composition de l'huile essentielle de l'espèce <i>T.numidicus</i> Poiret. de différentes régions.	08
Tableau 03	Classification botanique de l'espèce <i>Crithmum maritimum</i> L.	11
Tableau 04	Classification botanique de l'espèce <i>Satureja graeca</i> L.	14
Tableau 05	Distribution des flavonoïdes dans les espèces du genre <i>Satureja</i>	15
Tableau 06	Distribution des acides phénoliques dans les espèces du genre <i>Satureja</i> . .	17
Tableau 07	Composition chimique des HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	49
Tableau 08	Composition chimique de l'HE de <i>T. numidicus</i> provenant de différentes régions en Algérie.	52
Tableau 09	Composition chimique des HEs de <i>C. maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	55
Tableau 10	Teneurs en PT et flavonoïdes des fractions de <i>C.maritimum</i> L. et <i>S. graeca</i> L.	63
Tableau 11	Travaux antérieurs sur les composés phénoliques de l'espèce <i>C. maritimum</i> L.	64
Tableau 12	Travaux antérieurs sur les composés phénoliques du genre <i>Satureja</i>	65
Tableau 13	Analyse HPLC-DAD des fractions AcOEt et <i>n</i> -but de <i>C.maritimum</i> L.	66
Tableau 14	Analyse HPLC-DAD des fractions AcOEt et <i>n</i> -but de <i>S. graeca</i> L.	71
Tableau 15	Valeurs de CI ₅₀ et A _{0,50} obtenus par les HEs de <i>T. numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	78
Tableau 16	Pourcentages d'inhibition à la concentration maximale obtenus par les HEs de <i>C.maritimum</i> L. en fonction du stade phénologique	80
Tableau 17	Valeurs de CI ₅₀ et A _{0,50} des fractions de <i>C.maritimum</i> L.	83
Tableau 18	Valeurs de CI ₅₀ et A _{0,50} obtenus par les fractions de <i>S. graeca</i> L.	85
Tableau 19	Valeurs R (coefficient de corrélation) entre l'activité antioxydante et la teneur en CPT de <i>S.graeca</i> L. et <i>C.maritimum</i> L.	88
Tableau 20	Activité inhibitrice de l'ACHé et BChE à la concentration maximale et valeurs de CI ₅₀ des HEs de <i>T.numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	91
Tableau 21	Activité inhibitrice de l'ACHé et BChE à la concentration maximale (200 µg/mL) des fractions phénoliques de <i>C.maritimum</i> L.	93
Tableau 22	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des fractions phénoliques de <i>S.graeca</i> L.	94
Tableau 23	Valeurs CMI obtenues par les HEs de <i>T.numidicus</i> Poiret. en fonction du stade phénologique	95
Tableau 24	Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les HEs de <i>T.numidicus</i> en fonction du stade phénologique	96
Tableau 25	Valeurs CMI obtenues par les HEs de <i>C. maritimum</i> L.en fonction du stade phénologique	100

Tableau 26	Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les HEs de <i>C. maritimum</i> en fonction du stade phénologique	100
Tableau 27	Valeurs CMI obtenues par les fractions phénoliques de <i>C. maritimum</i> L.	102
Tableau 28	Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les fractions phénoliques de <i>C. maritimum</i> L.	102
Tableau 29	Valeurs CMI obtenues par les fractions phénoliques de <i>S. graeca</i> L.	104
Tableau 30	Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les fractions phénoliques de <i>S. graeca</i> L.	104

INTRODUCTION

Introduction

Actuellement, il existe un intérêt mondial pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives à partir de sources naturelles, afin de prévenir diverses pathologies liées au stress oxydatif, telles que les maladies neurodégénératives, et de découvrir de nouveaux antimicrobiens pouvant faire face à la résistance aux antibiotiques.

L'âge étant l'un des principaux facteurs de risque pour la majorité des cas des maladies neurodégénératives, le stress oxydatif est inévitablement impliqué dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (MA) (**Chen et al., 2012**). La surproduction des radicaux libres dans l'organisme vivant, vue l'incapacité des systèmes antioxydants endogènes et exogènes, est à l'origine du stress oxydatif, ce qui entraîne des dommages excessifs à l'ADN, aux protéines, aux glucides et aux lipides de la cellule (**Vladimir et al., 2014**). Les cellules neuronales, tant qu'ils sont riches en acides gras peroxydables et ont une demande élevée en oxygène, sont considérées comme plus susceptibles aux dommages oxydatifs que d'autres tissus corporels (**Lee et al., 2010**). La MA est la forme grave de démence neurodégénérative, caractérisée par un déficit progressif des fonctions cognitives et des anomalies comportementales chez le patient. Bien que la maladie soit identifiée depuis plus d'un siècle, elle restait incurable en raison de sa pathogenèse complexe. Ainsi, les approches les plus prometteuses pour le traitement de la MA reposent généralement sur les inhibiteurs du cholinestérase (**Fang et al., 2016**). D'après **Dall'Acqua (2013)**, il existe quatre médicaments inhibiteurs de l'AChE, approuvés par la FDA américaine, qui peuvent aider à atténuer ou à stabiliser les symptômes cognitifs telles que la perte de mémoire et la confusion pendant une période limitée. Deux d'entre eux étant des alcaloïdes naturels dérivés d'isoquinolines et d'indoles sont : la galanthamine isolée de *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae) et la physostigmine de *Physostigma venenosum* (Leguminosae). Cependant, ces médicaments ont des effets secondaires indésirables tels que les troubles gastro-intestinaux résultant de la stimulation du système cholinergique autonome périphérique.

En plus, la résistance aux antibiotiques et la capacité de certains microorganismes à produire des biofilms est une autre préoccupation mondiale de santé publique. C'est l'une des plus grandes menaces du 21^{ème} siècle (**Junior et al., 2018**). L'émergence de nouveaux agents pathogènes ainsi que la résurgence d'anciens, et l'absence de nouveaux traitements efficaces aggravent les problèmes. Par conséquent, la découverte de nouvelles molécules actives reste une nécessité (**Radulovic et al., 2013**).

Le règne végétal propose une large gamme de molécules à activités biologiques et pharmacologiques très variées en particulier des polyphénols et huiles essentielles, qui ont été étudiés dans le but de trouver des composés capables ; d'une part de protéger contre un certain nombre de maladies liées au stress oxydatif et aux dommages induits par les radicaux libres, et d'autre part d'agir contre les bactéries en constituant une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

La flore algérienne, en particulier des zones humides et subhumides, est connue par sa richesse en plantes médicinales traditionnellement utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques multiples. Le thym, "Zaatar ou Zaitra" avec ses différentes espèces, est largement utilisée en médecine traditionnelle pour ces propriétés thérapeutiques diverses (**Giordani et al., 2008**). Le Thym de Numidie (*Thymus numidicus* Poiret) est une espèce endémique Algéro-Tunisienne (**Quezel et Santa, 1962**), fréquemment étudiée sur les plans phytochimiques et activités biologiques. Aussi, la criste marine (*Crithmum maritimum*) une plante aromatique halophyte appartient à la famille des Apiacées ; connue par sa richesse en composés phénoliques, vitamines et minéraux, de protéines, d'acides aminés et huiles essentielles, est fréquemment utilisée comme ingrédient alimentaire et en médecine traditionnelle (**Renna et Gonnella, 2012**). Encore, les espèces du genre *Satureja* (Lamiaceae) ont été tellement utilisées pour leurs propriétés analgésiques, antiseptiques, antioxydantes, antiproliférantes, anti-inflammatoires, anticholinestérasés et vasodilatatrices (**Amiri et al., 2011**). Ceci est grâce à leurs teneurs considérables en métabolites secondaires notamment les tanins, flavonoïdes, acides phénoliques, stéroïdes et huiles essentielles. L'espèce *Satureja graeca* L. est endémique en Algérie (**Quezel et Santa, 1962**).

La présente étude consiste à la recherche des produits naturels à activités biologiques de différentes sources végétales, en se focalisant sur les composés phénoliques et huiles essentielles. Pour cela, nous avons fixés les objectifs suivants :

- Caractérisation quantitative et qualitative du contenu en composés phénoliques totaux et flavonoïdes dans les fractions polaires des deux plantes *S.graeca* L. et *C.maritimum* L.
- Caractérisation chimique des huiles essentielles obtenues à partir des espèces *T. numidicus* Poiret. et *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique.
- Evaluation *in vitro* des activités antioxydantes, anticholinestérasés, antimicrobiennes et antibiofilms de tout les extraits et huiles essentielles préparés.

Le choix de ces plantes est basé principalement sur la fréquence de leurs utilisations dans la médecine traditionnelle, la richesse en métabolites secondaires, l'endémisme des espèces *S.graeca* L. en Algérie et *T.numidicus* Poiret. en Algérie et Tunisie et le peu des études sur la caractérisation chimique et les activités biologiques de leurs HEs en fonction du stade phénologique. De plus, la recherche bibliographique exhaustive effectuée sur l'espèce *S. graeca* L. a montré qu'elle n'a pas fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique auparavant.

Méthodologiquement, ce travail est subdivisé en deux grandes parties : une partie théorique qui rassemble une description des espèces étudiées, leurs principales molécules bioactives isolées antérieurement et leurs ethnopharmacologies dans un premier chapitre, et le deuxième est destiné aux rappels sur les activités biologiques en étude. Outre, la partie expérimentale est consacrée d'une part à l'étude phytochimique (Extraction, Dosages des CPT et flavonoïdes, analyses HPLC/DAD, hydrodistillation et analyses des HEs par GC/MS), et d'autre part à l'étude des activités biologiques, dont l'activité antioxydante, mesurée par six méthodes complémentaires (DPPH, ABTS, β -carotène, anion superoxyde, CUPRAC et pouvoir réducteur), activité inhibitrice de la cholinestérase mesurée par deux méthodes (AChE et BChE), et enfin l'activité antimicrobienne et antibiofilm). Ensuite, les résultats seront présentés et discutés séparément.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Aperçu sur les espèces étudiées

1. *Thymus numidicus* Poiret.

1.1. Description botanique

Le thym "Zaatar, Zaitra" en arabe ou *Thymus* en latin est appartient à la famille des Lamiaceae, la sous-famille des Nepetoideae, la tribu des Mentheae et à la sous-tribu des Menthinae (Kabouche *et al.*, 2005 ; Ghorab *et al.*, 2014). Ce genre comprend près de 350 espèces autour du monde (Hussain *et al.*, 2013). Ce sont des plantes basses sous-ligneuses, les feuilles sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ses structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose (Quezel et Santa, 1962). Le genre *Thymus* est très répandue dans le grand Maghreb, et pousse également sur les montagnes d'Éthiopie et d'Arabie du sud ouest allant jusqu'au Egypte (Dob *et al.*, 2006). Environ 215 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen (Hazzit *et al.*, 2009).

En Algérie, le genre *Thymus* est représenté par 12 espèces : *T. capitatus* (L.) Hoffm. et Link. , *T. Fontanesii* Boiss. et Reut., *T. commutatus* (Ball.) Batt., *T. dreatensis* Batt., *T. numidicus* Poiret., *T. Guyonii* de Noé, *T. lanceolatus* Desf., *T. pallidus* Coss., *T. glandulosus* Lag., *T. hirtus* Willd., *T. algeriensis* Boiss. et Reut. et *T. ciliatus* Desf. (Quezel et Santa, 1962). L'espèce *Thymus numidicus* Poiret. est une plante buissonnante, caractérisée par ces tiges érigées, feuilles en général lancéolées, 2 à 5 fois plus longues que larges. Les Fleurs roses sessiles ou presque, réunies à l'extrémité des rameaux en épis courts. C'est une espèce endémique Algéro-Tunisienne, sa période de floraison est souvent entre mois d'Avril jusqu'au début du Juillet tout dépend la zone géographique (Quezel et Santa, 1962). La position systématique est décrite dans le **tableau 01**.

Tableau 01 : Classification botanique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret.

Règne	Plantae
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous-famille	Nepetoideae
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus numidicus</i> Poiret.

1.2. Composition et phytochimie

Les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Thymus* ont permis essentiellement l'isolement des composés phénoliques et huiles essentielles. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés par la composition des huiles essentielles de différentes espèces *Thymus*.

1.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué dans le royaume des végétaux. Ils résultent biogénétiquement de deux voies biosynthétiques principales: la voie du shikimate, où se forment principalement les phénylpropanoïdes et de l'acétate dont les principaux produits sont les phénols simples (**figure 01**). La combinaison des deux voies conduit à la formation de flavonoïdes, le groupe le plus abondant de composés phénoliques dans la nature (**Sánchez-Moreno, 2002**). Les composés phénoliques sont classés selon leur source d'origine, leur distribution naturelle, leur fonction biologique et leur structure chimique. La classification la plus fréquente est celle en fonction des structures chimiques des aglycones. **Harborne (1989)** a divisé les composés phénoliques en 16 classes principales: phénols simples, benzoquinones, acides phénoliques, acétophénones, acides phénylacétiques, acides hydroxycinnamiques, phénylpropènes, coumarines et isocoumarines, chromones, naphthoquinones, xanthones, stilbènes, anthraquinones, flavonoïdes, lignanes et néolignanes. Ces structures peuvent également être acylées ou glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarité (**Bruneton, 1993**).

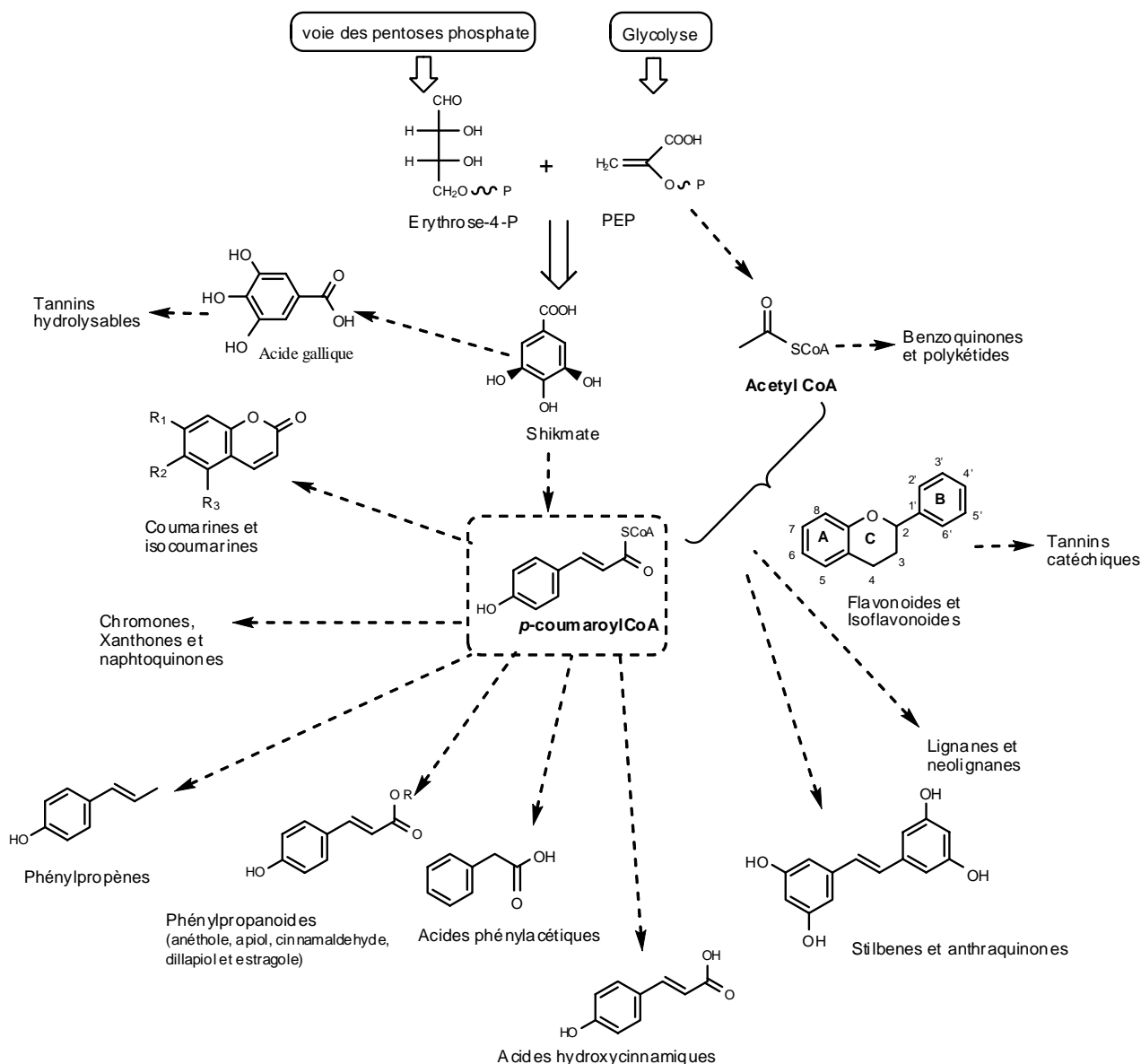


Figure 01 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques (Vogt, 2010)

1.2.2. Composés phénoliques isolés du genre *Thymus*

Les principaux composés phénoliques du genre *Thymus* sont les flavonoïdes et les acides phénoliques. La lutéoline et ses dérivés sont des chémomarqueurs de la sous-famille des Nepetoideae et en particulier des espèces *Thymus*, la thymusine (5,6 dihydroxy-7,8,4'-triméthoxyflavone) est aussi caractéristique de cette sous-famille (Kabouche, 2005 ; Georgiou *et al.*, 2015). Ainsi, les flavones aglycones (Apigénine, Diosmétine, Chrysoériol, xanthomicrol, sideritoflavone, 5-desmethyl-sinensetin, Circimaritin, Cirsilineol et 8-méthoxy-cirsilineol), les flavones glycosidiques (Lutéolin-7-*O*-D-glucoside, Lutéolin-7-*O*-D-glucuronide, Apigénin-7-*O*-glucosyl(1→2)glucoside), les flavanones (Naringénine,

Dihydroquercetine et Eriodictyol), les flavonols (Quercetine et Rutine), les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (vanillique, gallique, syringique et gentsique) et acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique (*p*-coumarique, caféique, férulique, trans-2-hydroxycinnamique, chlorogénique, rosmarinique et caftarique) sont également répertoriées dans les espèces *T. capitatus*, *T. numidicus* Poiret, *T. vulgaris* L., *T. broussoneti* Boiss, *T. herba barona*, *T. membranaceus*, *T. glabrescens* Willd., *T. serpyllum* L., *T. hirtus*, *T. willdenowii* Boiss., *T. pulegioides* L., *T. praecox* Opiz et *T. comosus* Heuff. (Corticchiato *et al.*, 1995; Merghem *et al.*, 1995; Ismaili *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2002; Mariana *et al.*, 2007; Angela *et al.*, 2008; Benkiniouar *et al.*, 2010; Boros *et al.*, 2010; Jabri *et al.*, 2012; Roby *et al.*, 2013 ;Benayache *et al.*, 2014 ; Georgiou *et al.*, 2015).

1.2.3. Huiles essentielles

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces. Généralement ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques de l'huile essentielle (Bakkali *et al.*, 2008). La plupart des composants des HES sont inclus dans deux groupes: les terpénoïdes dont les mono et sesquiterpènes et les phénylpropanoïdes, les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées (Calsamiglia *et al.*, 2007). Les terpénoïdes sont tous formés par la réunion d'unités isopréniques (Figure 02).

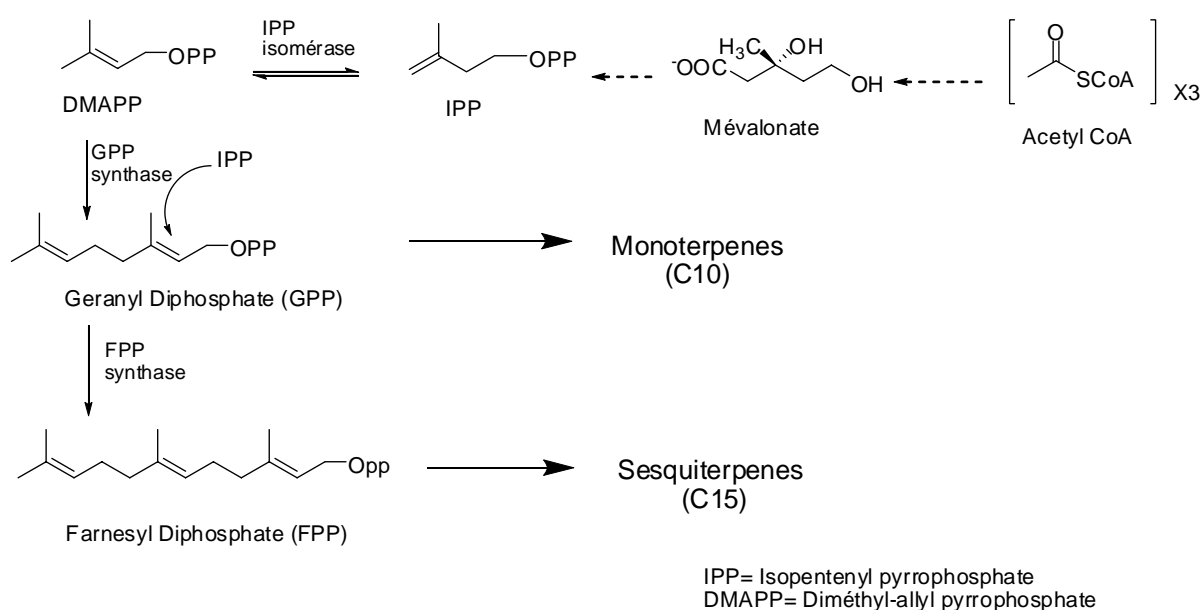


Figure 02 : Biosynthèse des principaux constituants métaboliques des huiles essentielles.

1.2.4. Huiles essentielles isolées de l'espèce *T.numidicus* Poiret.

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces. A titre d'exemple, le carvacrol et le thymol sont les composants majeurs de l'huile d'*Origanum sp*, le linalol pour l'huile de *Coriandrum sativum*, le menthol et le menthone pour l'huile de *Mentha piperita*. Généralement ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques de l'huile essentielle (Bakkali *et al.*, 2008). Le genre *Thymus* a fait l'objet d'un grand nombre d'études sur la composition chimique des huiles essentielles. Nous nous limiterons dans notre étude à la composition de l'espèce *T.numidicus* Poiret. Les composés majoritaires de chaque huile, leurs pourcentages, l'origine de l'espèce et la période de récolte sont représentés dans le **tableau 02**:

Tableau 02: Composition de l'huile essentielle de l'espèce *T.numidicus* Poiret. de différentes régions

Région (période de récolte)	Composition (%)	Référence
Constantine (Mai 2002)	Thymol (68,2), Carvacrol (16,9), Linalool (11,5)	Kabouche <i>et al.</i> , 2005
Annaba : Fin mars	Thymol (42,0), Carvacrol (3,4), Linalool (11), γ -terpinene, (15,5) <i>P</i> -cymene (8,9)	Hadeuf <i>et al.</i> , 2007
Fin d'avril	Thymol (49,9), Carvacrol (2,5), Linalool (10), γ -terpinene, (11,7) <i>P</i> -cymene (10,1)	
Début juin	Thymol (29,9), Carvacrol (2,5), Linalool (7,2), γ -terpinene, (14,9) <i>P</i> -cymene (15,4)	
Début juillet	Thymol (25,1), Carvacrol (4,3), Linalool (6,2), γ -terpinene, (5,1) <i>P</i> -cymene (33,1)	
Fin juillet	Thymol (18,2), Carvacrol (6,5), Linalool (5,4), γ -terpinene, (4,7) <i>P</i> -cymene (41,7)	
Tizi Ouzou (Avril 2004)	Thymol (51,0), Carvacrol (9,4), Linalool (3,3), TME (3,2)	Saidj <i>et al.</i> , 2008
Annaba (mars 2004)	Thymol (66,31), Linalool (8,61), <i>P</i> -cymene (6,20), γ -terpinene (6,12) Carvacrol (4,31)	Giordani <i>et al.</i> , 2008
Souk-aharas (mars 2004)	Thymol (57,20), Linalool (9,26), γ -terpinene (9,19), <i>P</i> -cymene (7,55)	Giordani <i>et al.</i> , 2008
Sétif (fleurs violets)	Thymol (68,0), γ -terpinene (4,2), <i>P</i> -cymene (4,5)	Laouer <i>et al.</i> , 2009
Sétif (fleurs blanches)	Carvacrol (4,2) Thymol (59,0), γ -terpinene (8,5), <i>P</i> -cymene (5,8), Carvacrol (3,7)	
Constantine (Mai 2012)	Thymol (23,92), γ -terpinene (10,84), <i>P</i> -cymene (11,41), Carvacrol (6,02), Linalool (17,20), TME (6,73)	Zeghib <i>et al.</i> , (2013)

Mila (Avril 2012)	Thymol (41,2), <i>P</i> -cymene (12,9), Carvacrol (2,8) Linalool (10,7), TME (3,3)	Zellagui <i>et al.</i> , (2014)
Annaba (Avril 2014)	Thymol (77,52), <i>P</i> -cymene (10,1), γ -terpinene (6,38)	Kouch <i>et al.</i> , (2014)
Tizi Ouzou (Avril 2012)	Thymol (40,40), Carvacrol (13,37), <i>P</i> -cymene (7,18), γ -terpinene (6,41), TME (8,30)	Messara <i>et al.</i> , 2018
Skikda (Juin 2013)	Thymol (22,48), Carvacrol (27,39), <i>P</i> -cymene (9,41)	Boughendjioua (2018)

1.3.Ethnopharmacologie

Le thym est l'une des herbes culinaires les plus populaires de nos jours, largement utilisé dans la cuisine méditerranéenne. Il a également une longue histoire d'utilisation en tant que guérisseur et protecteur médicinal. Les anciens Égyptiens l'utilisaient pour l'embaumement. Les Romains utilisaient le thym pour parfumer le fromage et les boissons alcoolisées. Donc, cette action a été un sauveur pour les gens quand il n'y avait pas de réfrigérateur ou d'autres moyens d'empêcher les aliments de se gâter. Les Grecs l'ont utilisé comme encens dans les temples et l'ont ajouté à l'eau du bain, le considérant comme une source de courage (**Salehi *et al.*, 2019**).

En Europe, l'utilisation du thym est très répandue, et de nombreuses études sont reportées. En particulier, les huiles essentielles de chemotype thymol sont conformes à la définition de la Pharmacopée européenne. En ce sens, les préparations à base de thym sont indiquées pour le traitement des maladies respiratoires à savoir des bronchites aiguës, de la toux sèche, des maux de gorge, comme mucolytique et expectorant dans la toux associée au rhume (**Salehi *et al.*, 2019**). En Italie, diverses utilisations médicinales de *T. pulegioides* L. sont rapportés, à la fois comme antiseptique gastro-intestinal et pour traiter la toux et les maux de gorge. De plus, les compresses de décoction sont également indiqués pour soigner les plaies par application cutanée (**Cornara *et al.*, 2009**). En Turquie, la décoction de parties aériennes de *T. longicaulis* C. (2 à 3 tasses) est utilisée quotidiennement pour traiter les douleurs abdominales et les frissons d'estomac (**Kargioğlu *et al.*, 2010**). En Iran, l'infusion des feuilles et inflorescences de *T. kotschyanus* est également utilisée comme agent hypotenseur et analgésique, ainsi que pour traiter les calculs rénaux, les douleurs utérines, l'inflammation et l'irritation des organes urinaires. En outre, il est utile comme anti-infectieux, expectorant et contre les rhumes et la toux (**Naeini *et al.*, 2009**). De même, en Irak, les espèces de *Thymus* sont largement utilisées pour leurs propriétés expectorantes,

antispasmodiques, antitussives, antibroncholiques, antispasmodiques, carminatives et diurétiques (**Al-Bayati, 2008**). Les parties aériennes de *T. origanum* sont utilisées dans la médecine traditionnelle palestinienne pour traiter la coqueluche, les maladies intestinales et les ulcères du duodénum (**Essawi et al., 2000**). Le thym est la plante médicinale la plus utilisée en médecine traditionnelle algérienne comme astringent, agent cicatrisant, expectorant, anti-tussif, antiseptique, stomachique, antispasmodique, carminatif et anthelminthique (**Kabouche et al., 2005 ; Dob et al., 2006 ; Ben El Hadj Ali et al., 2014**).

Ces dernières années, plusieurs rapports sont publiés concernant la composition et les propriétés biologiques des huiles essentielles et des extraits de ce genre. En fait, les espèces de *Thymus* sont largement utilisées dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et de la parfumerie, ainsi que pour aromatiser et conserver plusieurs produits alimentaires (**Hazzit et al., 2009**). D'autres découvertes suggèrent que les huiles essentielles de *Thymus* ont été largement utilisées principalement en raison de leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et anti-inflammatoires (**Giordani et al., 2008; Hazzit et al., 2009 ; Ghorab et al., 2013 ; Adrar et al., 2016 ; Messara et al., 2017**). Les activités antimalariale et antiproliférative des espèces *Thymus* sont également établies (**Hussain et al., 2013**).

2. *Crithmum maritimum* L.

2.1. Description botanique

Crithmum maritimum L. est une plante spontanée halophyte appartenant à la famille des Apiacées (ex-Ombellifères), résistante à la sécheresse, poussant à l'état sauvage sur les rochers et falaises de bord de mer et parfois sur des sables. Elle est distribuée principalement dans les écosystèmes côtiers marins des régions atlantiques européenne et nord-africaine, de la Mer Méditerranée jusqu'à la Mer noire (**Generalic Mekinic et al., 2016**).

En Algérie, *C.maritimum* L. est l'espèce unique du genre *Crithmum* (**Quezel et Santa 1962**). C'est une plante vivace très glabre vert-glaucue, à tiges peu élevées et ramifiées, de 20 à 50 cm de haut, à feuilles charnues (2 à 3) pennatiséquées, à divisions lancéolées aiguës. Ses fleurs blanc-verdâtre se présentent en ombelles d'ombellules. Ses fruits sont des diakènes à péricarpe épais spongieux et à côtes saillantes carénées. Sa floraison a lieu entre juillet et octobre. (**Quezel et Santa 1962 ; Renna et Gonnella, 2012**).

Sa désignation vernaculaire en français est Criste marine, Crithme, Fenouil marin ou Perce-pierre et appelée en arabe «Chemeret el beharya » ; en anglais « Sea fennel » ; en Allemand « Meerfenchel ou Seefenchel »; en Italien « Finocchio marino, Cretamo, Spaccassassi, Bacicci, Basiggia, Erba di San Pietro, Critama » et en Espagnol « hinojo marino ou perejil marino » ; en turc « kaya korugu » (**Quezel et Santa 1962 ; Renna et Gonnella, 2012**). Sa place à la systématique est représentée dans le **tableau 03**.

Tableau 03 : Classification botanique de l'espèce *Crithmum maritimum* L.

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytae (Magnoliophyta)
Classe	Dicotyledonae (Equisetopsida)
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Crithmum</i>
Espèce	<i>Crithmum maritimum</i> L.

2.2.Composition et phytochimie

Les études phytochimiques réalisés sur les différents organes de *C.maritimum* L. ont mis en évidence la présence d'une grande diversité de molécules : carbohydrates, acides gras (ω -3 et ω -6), β -carotène, protéines, vitamine C, oligo-éléments, iode, sels minéraux,

flavonoïdes, acides phénoliques et huiles essentielles (sabinène, γ -terpinène, *p*-cymène, thymol méthyl ether et dillapiole) (Atia *et al.*, 2011 ; Pavela *et al.*, 2017 ; Renna, 2018). Bien qu'il existe de nombreux rapports sur les HEs de cette plante, les informations sur les composés phénoliques tels que les acides phénoliques et flavonoïdes étaient rares (Renna, 2018).

Duros et Magné (2009), Jallali *et al.*, (2014) et Generalic Mekinic *et al.*, (2018) ont signalé la présence des concentrations relativement élevées de composés phénoliques dans différents extraits de *C.maritimum* L. Ces auteurs ont souligné que différents facteurs biotiques et abiotiques ont un impact sur la biosynthèse et l'accumulation de ces métabolites. Dans leurs études, l'acide chlorogénique était le composé phénolique dominant. D'autres acides phénoliques dérivés d'acide benzoïque et cinnamique sont également répertoriés en quantités variantes: acide vanillique, acide caféique et acide cinnamique (Generalic Mekinic *et al.*, 2018). Sept acides hydroxycinnamiques ont été identifiés dans des extraits aqueux de parties aériennes de *C. maritimum*, dont l'acide chlorogénique étant le composé majeur, tandis que la catéchine, epigallocatechine, quercetin-3-galactoside, rutine, acides *p*-coumarique, *trans*-2-hydroxycinnamique, vanillique et rosmarinique ont également été rapportés dans l'extrait acétonique (Nabet *et al.*, 2016). De même, Siracusa *et al.*, (2011) ont signalé que l'acide chlorogénique et ses dérivés étaient identifiés comme la quasi-seule classe des composés phénoliques dans les infusions de fenouil marin. La présence de Quercétine, Diosmine et Hesperidine a été rapportée par Cornara *et al.*, (2009), alors que d'autres auteurs (Jallali *et al.*, 2012) ont signalé de fortes quantités d'acides caféique, gallique, rosmarinique, vanillique et *p*-coumarique, ainsi qu'un faible contenu d'acides *trans*-cinnamique et *trans*-2-hydroxycinnamique. Une faible quantité d'apigénine, de rutine, de quercétine-3-galactoside, de catéchine, d'épicatéchine, d'épigallocatechine est également rapportée (Jallali *et al.*, 2012 ; Meot-Duros *et al.*, 2010). D'autre part, Certains auteurs ont signalé de petites quantités de coumarines dans les fruits et les parties aériennes (Burczyk *et al.*, 2002 ; Nabet *et al.*, 2016).

2.3.Ethnopharmacologie

La Criste marine est connue depuis très longtemps comme plante médicinale et condimentaire. Elle a été utilisée comme ingrédient alimentaire puisque les parties aériennes (feuilles et jeunes branches) de *Crithmum maritimum* confites dans le vinaigre stimulent les organes de la digestion (Houta *et al.*, 2012). Plusieurs utilisations de cette plante sont connues à des fins culinaires. En Turquie, les feuilles fraîches et les jeunes branches sont utilisées

comme condiment et cornichon et sont tellement utilisés comme salade avec du yaourt, en particulier dans les régions méditerranéennes (**Senatore et al., 2000**). Un nouveau colorant-épice est obtenu à partir de feuilles fraîches de fenouil marin par différents procédés de séchage (**Renna et Gonnella, 2012**). En tant que nutraceutique, le fenouil marin peut être une source de molécules pour le secteur agroalimentaire ayant des propriétés antioxydantes et des minéraux sous forme de boissons à base de plantes innovantes et favorables à la santé (**Pereira et al., 2017**).

Les parties aériennes de cette plante sont utilisées aussi en médecine traditionnelle comme anti-scorbutiques, toniques, carminatives, diurétiques et vermifuges et présentent un potentiel de traitement de l'obésité en raison de leurs richesses en molécules bioactives tels que la vitamine C, l'iode, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les minéraux (essentiellement le calcium), les acides organiques et les composés phénoliques (**Kulisic et al., 2009 ; Atia et al., 2011 ; Pereira et al., 2017**). De plus, l'huile essentielle est également utilisée pour la formulation de produits cosmétiques aux propriétés amincissantes (**Houta et al., 2012 ; Jallali et al., 2014**).

Actuellement, le fenouil marin jouit d'une bonne réputation en tant que remède traditionnel dans certaines régions méditerranéennes. Par exemple, en Espagne, les feuilles sont consommées comme digestif et pour ses propriétés antiscorbutiques et diurétiques. Dans les régions du nord, la décoction de cette plante est utilisée pour prendre soin de l'appareil urogénital, tandis qu'en Italie du Sud, la même décoction est considérée comme un remède utile contre la coqueluche et le rhume. Parallèlement, pour les habitants du centre de l'Italie, le jus de feuilles est traditionnellement utilisé pour ses effets dépuratif, diurétique et carminatif, alors que l'infusion de fruits est utilisée pour ses propriétés digestives et carminatives (**Renna, 2018**).

Les études récentes sur cette espèce ont surtout montrés leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (**Jallali et al., 2014 ; Houta et al., 2015 ; Nabet et al., 2016 ; Generalić Mekinić et al., 2018 ; Alemán et al., 2019 ; Meot-Duros et al., 2019**), inhibitrices de cholinestérase et vasodilatatrices (**Generalić Mekinić et al., 2016 ; Generalić Mekinić et al., 2018**).

3. *Satureja graeca* L.

3.1. Description botanique

Le genre *Satureja* appartient à la famille des Lamiaceae, sous-famille des Nepetoideae et de la tribu des Mentheae. Les espèces du genre *Satureja* sont des plantes herbacées, annuelles ou vivaces et aromatiques, à feuilles verdâtres verts ou gris foncé, et se développent dans des milieux arides, ensoleillé, pierreux et rocheux (Amiri *et al.*, 2011; Giweli, 2012). C'est une plante médicinale et condimentaire peut également être cultivée comme plante ornementale. Ce genre comprend environ 200 espèces d'herbes aromatiques et d'arbustes, largement distribués dans une zone qui s'étend de la région de la Méditerranée vers l'Europe, l'Asie occidentale, l'Afrique du Nord, les îles Canaries et l'Amérique du Sud (Amiri *et al.*, 2011).

En Algérie, 16 espèces sont comptées ; *S. Fontanesii* Briq., *S. Juliana* L., *S. Briquetii* Maire, *S. Hochreutineri* Briq., *S. Battandieri* Briq., *S. biflora*, *S. nervosa* Desf., *S. graeca* L., *S. rotundifolia* (Pers.) Briq., *S. granatensis* (Boiss. Et Reut.) R. Fernandes, *S. vulgaris* (L.) Fritsch, *S. baborensis* (Batt.) Briq., *S. candidissima* (Munby) Briq., *S. Pomelii* Briq., *S. hispidula* (Boiss. et Reut.) Maire et *S. Calamintha* Scheele (Quezel et Santa 1962).

L'espèce *Satureja graeca* L. est caractérisée par un Calice de 5 à 6 mm, à dents longues (1-2 mm) fortement ciliées sur les marges. Verticillastres distants au plus entre eux de 10-15 mm. Calice rougeâtre ou violacé. L'espèce *S. graeca* L. est endémique en Algérie (Quezel et Santa 1962). La classification botanique est montrée dans le **tableau 04**.

Tableau 04 : Classification botanique de l'espèce *Satureja graeca* L.

Règne	Plantae
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Labiales
Famille	Lamiaceae
Sous-famille	Nepetoideae
Genre	<i>Satureja</i>
Espèce	<i>Satureja graeca</i> L.

3.2.Composition et phytochimie

Les molécules rencontrées dans le genre *Satureja* peuvent se classer en quatre grands groupes: Les tanins, les stéroïdes, Les composés phénoliques et les huiles essentielles (Amiri *et al.*, 2011). Dans le présent travail, on s'intéresse aux composés phénoliques de ce genre.

Plusieurs travaux sont réalisés sur la caractérisation et l'isolement de ces molécules à partir de différents espèces *Satureja*. La distribution des flavonoïdes dans les espèces du genre *Satureja* est représentée dans le (tableau 05).

Tableau 05: Distribution des flavonoïdes dans les espèces du genre *Satureja*.

Flavonoïdes isolés	Espèce (origine)	Référence
A. Flavones		
Acacétine	<i>S. montana</i> (Serbie) <i>S. khuzistanica</i> (Iran)	López-Cobo <i>et al.</i> , 2015 Malmir <i>et al.</i> , 2015
Xanthomicrol	<i>S. khuzistanica</i> (Iran)	Malmir <i>et al.</i> , 2015
Diosmétique	<i>S. khuzistanica</i> (Iran)	Malmir <i>et al.</i> , 2015
Lutéoline	<i>S. thymbra</i> (Grèce) <i>S. montana</i> (Serbie) <i>S. parvifolia</i> Phil. (Argentine) <i>S. atropatana</i> Bonge (Iran) <i>S. sahendica</i> Bornm. (Iran)	Jancheva <i>et al.</i> , 2017 López-Cobo <i>et al.</i> , 2015 Malmir <i>et al.</i> , 2015 Cabana <i>et al.</i> , 2013 Gohari <i>et al.</i> , 2006 Saeidnia <i>et al.</i> , 2011
Luteolin 7-méthyl éther	<i>S. montana</i> (Serbie) <i>S. thymbra</i> L. (Grèce)	López-Cobo <i>et al.</i> , 2015 Skoula <i>et al.</i> , 2005
6-Hydroxyluteolin 7,3'-diméthyl éther	<i>S. khuzistanica</i> (Iran) <i>S. thymbra</i> L. (Grèce) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Malmir <i>et al.</i> , 2015 Skoula <i>et al.</i> , 2005
6-Hydroxyluteolin 7,3',4'-triméthyl éther	<i>S. thymbra</i> L. (Grèce)	Skoula <i>et al.</i> , 2005
Apigénine	<i>S. thymbra</i> (Grèce) <i>S. montana</i> (Serbie) <i>S. khuzistanica</i> (Iran) <i>S. sahendica</i> Bornm. (Iran) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Jancheva <i>et al.</i> , 2017 López-Cobo <i>et al.</i> , 2015 Malmir <i>et al.</i> , 2015 Hadjmohamadi, 2012 Skoula <i>et al.</i> , 2005
Hespéretine	<i>S. parvifolia</i> Phil. (Argentine)	Cabana <i>et al.</i> , 2013
Genkwanine	<i>S. thymbra</i> L. (Grèce) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Skoula <i>et al.</i> , 2005
Thymonine	<i>S. atropatana</i> Bonge (Iran) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Gohari <i>et al.</i> , 2006 Skoula <i>et al.</i> , 2005
Thymusine	<i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	López-Cobo <i>et al.</i> , 2015 Skoula <i>et al.</i> , 2005

Cirsimaritine	<i>S. khuzistanica</i> (Iran) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Malmir <i>et al.</i> , 2015 Skoula <i>et al.</i> , 2005
Xanthomicrol	<i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Skoula <i>et al.</i> , 2005
Cirsilineol	<i>S. khuzistanica</i> (Iran) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Malmir <i>et al.</i> , 2015 Skoula <i>et al.</i> , 2005
5-desméthoxynobiletine	<i>S. atropatana</i> Bonge (Iran)	Gohari <i>et al.</i> , 2006
B. Flavonols		
Kampferol	<i>S. montana</i> (Serbie)	López-Cobo <i>et al.</i> , 2015
Quercétine	<i>S. thymbra</i> (Grèce) <i>S. montana</i> (Serbie)	Jancheva <i>et al.</i> , 2017 López-Cobo <i>et al.</i> , 2015
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	<i>S. thymbra</i> (Grèce) <i>S. parvifolia</i> Phil. (Argentine)	Jancheva <i>et al.</i> , 2017 Cabana <i>et al.</i> , 2013
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	<i>S. hortensis</i> L. (Serbie) <i>S. thymbra</i> (Grèce) <i>S. parvifolia</i> Phil. (Argentine)	Boroja <i>et al.</i> , 2018 Jancheva <i>et al.</i> , 2017 Cabana <i>et al.</i> , 2013
C. Flavanones		
Naringénine	<i>S. hortensis</i> L. (Serbie) <i>S. khuzistanica</i> (Iran) <i>S. parvifolia</i> Phil. (Argentine) <i>S. thymbra</i> L. (Grèce) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Boroja <i>et al.</i> , 2018 Malmir <i>et al.</i> , 2015 Cabana <i>et al.</i> , 2013 Skoula <i>et al.</i> , 2005 Skoula <i>et al.</i> , 2005
Eriodictyol	<i>S. parvifolia</i> Phil. (Argentine) <i>S. thymbra</i> L. (Grèce) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Cabana <i>et al.</i> , 2013 Skoula <i>et al.</i> , 2005 Skoula <i>et al.</i> , 2005
Aromadendrine	<i>S. thymbra</i> L. (Grèce) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Skoula <i>et al.</i> , 2005 Skoula <i>et al.</i> , 2005
5,7,3,5-tetrahydroxy flavanone	<i>S. khuzistanica</i> (Iran) <i>S. spicigera</i> Boiss. (Iran)	Malmir <i>et al.</i> , 2015 Gohari <i>et al.</i> , 2012
5,4-dihydroxy-3-methoxyflavanone-7-(6- <i>O</i> - α -L rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside	<i>S. spicigera</i> Boiss. (Iran)	Gohari <i>et al.</i> , 2012
D. Flavanols		
Taxifoline	<i>S. khuzistanica</i> (Iran) <i>S. thymbra</i> L. (Grèce) <i>S. spinosa</i> L. (Grèce)	Malmir <i>et al.</i> , 2015 Skoula <i>et al.</i> , 2005
Aromadendrine	<i>S. khuzistanica</i> (Iran)	Malmir <i>et al.</i> , 2015
Epigallocatechine-3- <i>O</i> -gallate	<i>S. parvifolia</i> Phil. (Argentine)	Cabana <i>et al.</i> , 2013
Catéchine	<i>S. montana</i> L. (Serbie)	C'etkovic <i>et al.</i> , 2007
Epicatechine	<i>S. montana</i> L. (Serbie)	C'etkovic <i>et al.</i> , 2007

La distribution des acides phénoliques dans les espèces du genre *Satureja* est représentée dans le (tableau 06):

Tableau 06: Distribution des acides phénoliques dans les espèces du genre *Satureja*.

Acide phénolique isolé	Espèce (origine)	Référence
• Acides hydroxybenzoïques		
Acide vanillique	<i>S. hortensis</i> L. (Serbie) <i>S. montana</i> L.(Serbie)	Boroja <i>et al.</i> , 2018 López-Cobo <i>et al.</i> , 2015 C'etkovic <i>et al.</i> , 2007
Acide syringique		
Protocatechuique		
Ac quinique	<i>S. montana</i> (Serbie)	López-Cobo <i>et al.</i> , 2015
• Acides hydroxycinnamiques		
Acide chlorogénique	<i>S. montana</i> (Serbie)	López-Cobo <i>et al.</i> , 2015
Acide <i>p</i> -coumarique	<i>S. hortensis</i> L. (Serbie) <i>S. montana</i> L.(Serbie)	Boroja <i>et al.</i> , 2018 C'etkovic <i>et al.</i> , 2007
Acide caféique	<i>S. hortensis</i> L. <i>S. montana</i> (Serbie) <i>S. parvifolia</i> (Argentine) <i>S. montana</i> L.(Serbie)	Boroja <i>et al.</i> , 2018 López-Cobo <i>et al.</i> , 2015 Cabana <i>et al.</i> , 2013 C'etkovic <i>et al.</i> , 2007
Acide férulique	<i>S. montana</i> L.(Serbie)	C'etkovic <i>et al.</i> , 2007
Acide Isoférulique	<i>S. hortensis</i> L. (Serbie)	Boroja <i>et al.</i> , 2018
acide rosmarinique	<i>S. hortensis</i> L. (Serbie) <i>S. thymbra</i> (Grèce) <i>S. parvifolia</i> (Argentine) <i>S. montana</i>	Boroja <i>et al.</i> , 2018 Jancheva <i>et al.</i> , 2017 Cabana <i>et al.</i> ,2013 Mario, 2006

3.3. Ethnopharmacologie

Les parties aériennes de certaines espèces *Satureja* ont été largement utilisés dans la médecine traditionnelle comme agent cicatrisant, analgésiques musculaires, toniques, diurétique et carminatives dans le traitement de l'estomac et des troubles intestinaux tels que des crampes, nausées, indigestion, diarrhée et contre les maladies infectieuses (Giweli, 2012 ; Malmir *et al.*, 2015). En outre, il existe des preuves remarquables dans la littérature médicale antique Iranienne et Turc que *S. hortensis* a un effet thérapeutique sur les maladies respiratoires et a été utilisé par voie orale pour traiter l'asthme et la toux (Amiri *et al.*, 2011). La Sarriette jouit d'une grande popularité en Algérie et au Maroc comme remède contre la toux, l'indigestion et les infections respiratoires bénignes (Bougandoura *et al.*, 2012).

Récemment, les autres propriétés de *Satureja* comme activités antibactériennes, antifongiques, anti-oxydantes, antidiabétiques, anti-VIH, anti-hyperlipidémie, stimulation de la reproduction, expectorant et vasodilatatrices ont été mises en évidence (**Amiri et al., 2011**).

Chapitre II

Activités biologiques

1. Rappel sur l'activité antioxydante

1.1. Origine du stress oxydatif

Les radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

L'oxygène est une molécule indispensable aux processus de la vie en aérobie. En tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, l'O₂ se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction de réduction implique quatre électrons et est associée à la production de l'énergie sous forme de molécules d'ATP. Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5% de l'oxygène est transformé en espèces réactives oxygénées (ERO). Dans une première étape, le radical libre anion superoxyde (O₂^{•-}) est formé, ce qui conduit par la suite à la production d'autres ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂), le radical hydroxyle (•OH), l'acide hypochloreux (HOCl) et des dérivés nitrés (NO•, ONO²⁻) (**Pincemail et al., 2002 ; Geny et al., 2019**).

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) instable très réactive qui présente un électron non apparié, et cherche d'arracher un électron à la molécule voisine. À côté de certaines enzymes (xanthine oxydase, NADPH oxydase), la mitochondrie est la source principale des ERO. En faible quantité, ces radicaux libres ne sont pas délétères. Par contre, en quantité importante et/ou si l'exposition est prolongée, ces ERO entraînent des altérations majeures incluant peroxydation lipidique, carboxylation protéique et/ou fragmentation de l'ADN, voire mort cellulaire par apoptose (**Geny et al., 2019**).

Le stress oxydant est un état de déséquilibre profond entre la production d'ERO et le système anti oxydant endogène. Un stress oxydant peut donc être dû à un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), d'une activation de

systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...) d'une part, et une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuant à une diminution de l'activité antioxydante d'autre part (**Pincemail *et al.*, 2002 ; Geny *et al.*, 2019**).

1.2. Conséquences du stress oxydatif

Les conséquences du stress oxydatif seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane entraînant des lyses immédiates. D'autres perturbations biologiques sont observées suite au stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, anomalies de récepteurs, diminution de la sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides, affaiblissement musculaire, voire mort neuronale ou apparition de mutations (**Favier, 2006**). En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant serait la principale cause initiale de développer de nombreuses processus pathologiques comme l'athérosclérose, cancerogénèse, vieillissement, diabète et pathologies nerveuses (**Pincemail *et al.*, 2002 ; Favier, 2006**).

1. 3. Antioxydants et systèmes de défense

Un antioxydant est toute molécule, à concentration relativement faible par rapport au substrat oxydable, retarde, inhibe ou empêche l'oxydation de ce substrat. Il s'agit de composés qui ont la capacité de réagir avec les EOR et les rendent ainsi inoffensifs. De nombreux antioxydants naturels et synthétiques interviennent. Les antioxydants endogènes peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques (**Neha *et al.*, 2019**).

1.3.1. Antioxydants enzymatiques

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (**Favier, 2003**).

- **Superoxyde dismutase (SOD)**

La SOD est une métalloenzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme existe sous deux formes; l'une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (Cu/Zn-SOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse (Mn-SOD) comme cofacteur (**Favier, 2003**).



- **Catalase (CAT)**

La catalase est une enzyme présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque elle transforme deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composés stables (**Favier, 2003**).



- **Glutathion peroxydase et réductase**

La glutathion peroxydase (**GPx**) est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (**Favier, 2003**). La glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries, elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants: le glutathion réduit et le sélénium. La glutathion réductase (**GR**), quant à elle, a pour rôle de régénérer le glutathion (GSH) à partir du disulfure de glutathion (GSSG) tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Sorg, 2004**).

1.3.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe des antioxydants renferme les protéines de séquestration des métaux, qui agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme $\text{Fe}_2^+/\text{Fe}_3^+$ ou $\text{Cu}_2^+/\text{Cu}^+$ (ex : la transferrine, la ferritine, l'albumine, caeruloplasmine...etc.).

D'autre part, il y a des molécules de petite taille qui agissent soit comme cofacteurs des enzymes citées soit comme antioxydant propre. Les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, l'empêcher ainsi d'attaquer les structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents

réducteurs capables de passer leurs électrons aux ERO et les éliminer (**Pincemail et al., 2002**). Ces molécules proviennent soit de sources endogènes (glutathion, mélatonine, acide urique, la mélanine...), soit de sources exogènes apportés par l'alimentation, ex : les caroténoïdes, la vitamine E, la vitamine C, les composés phénoliques et surtout les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les coumarine et les huiles essentielles (**Bruneton, 1999 ; Pincemail et al., 2002 ; Yoo et al., 2008 ; Neha et al., 2019**). Les antioxydants synthétiques comprennent le butyle hydroxytoluène (BHT), le gallate d'octyle (OG), le butyle hydroxyanisole (BHA), le gallate de propyle (PG) et la tert-butylhydroquinone (TBHQ).

1.4. Activité antioxydante des composés phénoliques

Aujourd'hui, la recherche se concentre sur l'extraction d'antioxydants naturels qui seraient moins toxiques et plus efficaces que les antioxydants synthétiques généralement utilisés pour combattre le "stress oxydant", qui possède à priori un effet fortement pathologique. Des antioxydants synthétiques, comme le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA), sont bien connus pour la capacité qu'ils ont d'arrêter les réactions en chaîne de peroxydation d'un lipide (**Avlessi et al., 2004**). Malheureusement, il a été montré qu'ils sont capables d'augmenter le risque des maladies cancérogènes, provoquer un gonflement du foie et influencer les activités du système hépatique et les maladies cérébro-vasculaires (**Choi et al., 2007**). À cet égard, les flavonoïdes et d'autres polyphénols ont capté l'attention en raison de leur non toxicité et de leur potentialité pour la mise en œuvre dans les régimes alimentaires chez l'homme (**Belščak et al., 2018**).

Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation, sont considérés comme éliminateurs de radicaux libres (**Shahidi et al., 2003**). Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique. Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols. Ces derniers porteurs d'un groupement catéchol (noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyles adjacentes) ont un potentiel antioxydant élevé. Ainsi, tous les flavonoïdes portant une hydroxylation en 3' et 4' possèdent une activité antioxydante significative. De plus, une hydroxylation supplémentaire en 5' comme sur la myricétine augmentera cette activité comparativement à des composés comme la quercétine qui en sont dépourvus (**Shahidi et al., 2003**).

L'hydroxylation du noyau B joue aussi un rôle important dans l'activité antioxydante des flavonoïdes tandis que l'hydroxylation en 5 et 7 sur le cycle « A » a peu d'influence. La

glycosylation en 3 des flavonoïdes par des mono- ou disaccharides réduit leur activité antioxydante comparativement à leurs aglycones (ainsi le rutoside est moins actif que la quercétine). Il a été montré que les chalcones, et en particulier les 3,4- dihydroxychalcones étaient particulièrement efficaces, notamment en comparaison avec leurs flavanones respectives. Par ailleurs, pour les isoflavones, l'hydroxylation en 4' et en 5 est indispensable à une activité antioxydante significative comme dans le cas de la génistéine. De la même manière, l'activité antioxydante des acides phénoliques dépend de leur degré d'hydroxylation. De plus, il a été montré que les acides hydroxycinnamiques étaient plus antioxydants que les acides benzoïques correspondants (Shahidi *et al.*, 2003 ; Belščak *et al.*, 2018).

1.5. Activité antioxydante des HEs

De nombreuses sources d'antioxydants ont été explorées et les recherches se poursuivent. Les huiles essentielles et les extraits de plantes sont connus avoir divers degrés d'activités antioxydantes. Certaines publications récentes (Adrar *et al.*, 2016 ; Bendjabeur *et al.*, 2018) ont montré des activités antioxydantes des huiles essentielles. Il a été rapporté que certaines de ces huiles essentielles et extraits sont plus efficaces que certains antioxydants synthétiques (Hussain *et al.*, 2008).

La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol (Stefanovits-Banyai *et al.*, 2003). Le carvacrol est l'un des composants principaux des huiles essentielles de certains Lamiaceae, comme l'Origan, sarriette et Thym dont la teneur peut atteindre jusqu'à 86% (Sefidkon *et al.*, 2007). L'activité antioxydante de ces plantes est due au carvacrol, thymol et autre phénol (Schwammle *et al.*, 2001). Ceci est confirmé par un certains nombre de travaux; Jukic et Milos, (2005) ont montrés dans une étude portant sur l'huile essentiel de *Thymus vulgaris* L. que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capable de réduire le radical DPPH avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypes phénoliques. Ces observation l'on expliqué par la concentration élevé de thymol et carvacrol dans ces derniers.

L'activité antioxydante des huiles essentiels est également attribué à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes : γ -terpenène et α -terpinène (Edris, 2007).

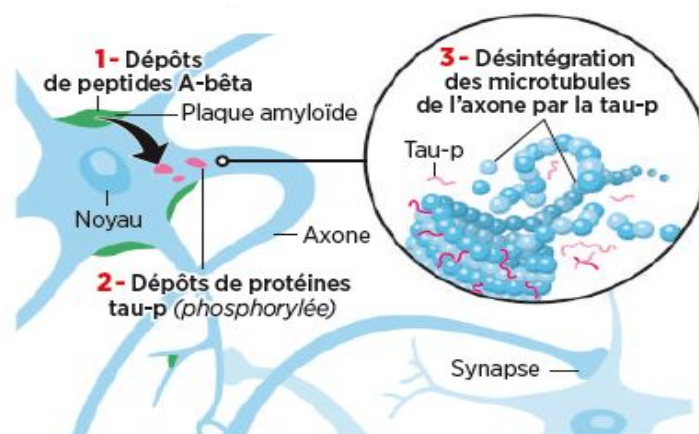
2. Alzheimer et activité anticholinestérase

2.1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA), la forme la plus courante de démence neurodégénérative, est caractérisée par une déficience progressive des fonctions cognitives, des troubles du comportement et une diminution de la capacité à effectuer les activités de base de la vie quotidienne (**Fang et al. 2016**). Généralement, les patients atteints de cette maladie présentent des difficultés à se souvenir des noms, des événements récents, à trouver ses mots et à mettre en place ses idées. Ainsi, rencontrent des problèmes de motricité et d'orientation dans l'espace et dans le temps. Au plus grave, ils présentent aussi des troubles psycho-comportementaux tels que l'agressivité, l'anxiété, la dépression et les hallucinations (**Lanari et al., 2006**). Sur le plan neuropathologique, la MA est associée à une perte progressive du réseau des neurones cholinergiques et à un dysfonctionnement synaptique dans les différentes régions du cerveau, mais plus profondément encore, dans les zones associées à la cognition (**Habtemariam, 2019**).

Des études physiopathologiques, moléculaires, cellulaires et d'expression génétique ont révélé que la MA était un syndrome multifactoriel dérivé d'un ensemble complexe de facteurs neurochimiques, impliquant le déficit en acétylcholine synaptique et d'autres neurotransmetteurs apparentés, l'accumulation progressive du fragment de protéine β -amyloïde ($A\beta$) neurotoxique (plaques séniles) à l'extérieur des neurones du cerveau et des brins tordus de la protéine *tau* (enchevêtrement) à l'intérieur des neurones (**figure 03**), le stress oxydatif, l'inflammation des neurones, etc. (**Houghton, 2006 ; Singh et al. 2010**). Les dommages oxydatifs aux substances neuronales et l'accumulation accrue de fer dans des zones spécifiques du cerveau sont considérés comme des aspects pathologiques majeurs de la MA. (**Weinreb et al. 2004**).

Figure 03 : Aspects des lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA (**Lesniewska, 2013**)



2.2. Relation entre le Stress Oxydatif et la MA

Pour un certain nombre de raisons, le cerveau humain apparaît particulièrement vulnérable au stress oxydatif, qui a nécessité l'élaboration de défenses antioxydantes complexes afin de maintenir l'équilibre oxydatif. Avec l'âge avancé, l'équilibre oxydatif s'estompe au profit du stress oxydatif, qui entraîne parfois des maladies, en particulier des maladies sporadiques ou induites par l'environnement, telles que la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Praticò et Mecocci, 2013**). La MA a divers facteurs étiologiques, y compris des facteurs génétiques et neurochimiques décrits auparavant. En outre, une caractéristique pathologique courante de la maladie d'Alzheimer est l'oxydation des acides nucléiques, des protéines et des lipides dans les neurones (**Praticò, 2008**). Les ERO interagissent avec les acides gras polyinsaturés dans les neurones, entraînant des niveaux élevés de peroxydation lipidique (**Chen et Zhong, 2014**). Des niveaux accrus de biomarqueurs du stress oxydatif (carbonyles, MDA et 3-nitrotyrosine) dans le sang et des modifications de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) reflètent le stress oxydatif dans le cerveau. Les mécanismes sous-jacents proposés pour l'initiation du stress oxydatif dans la MA incluent l'accumulation de la protéine A β , l'hyperphosphorylation de protéine *tau*, l'inflammation, le dysfonctionnement mitochondrial et l'accumulation des métaux lourds (**Enogieru et al., 2018**).

2.3. Activité anticholinestérase

Les cellules nerveuses du cerveau se communiquent en libérant des substances chimiques appelées neurotransmetteurs. L'acétylcholine est un neurotransmetteur synaptique qui, en se fixant au récepteur cholinergique membranaire, permet la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx au niveau des jonctions neuromusculaires. L'AChE présente dans le SNC catalyse l'hydrolyse de l'ACh en choline et en acide acétique, située principalement dans la fente synaptique, et de ce fait, joue un rôle primordial dans la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques, en vue de permettre aux neurones cholinergiques de revenir à l'état de repos après leur activation par des influx nerveux (**figure 04**) (**Dall'Acqua, 2013**).

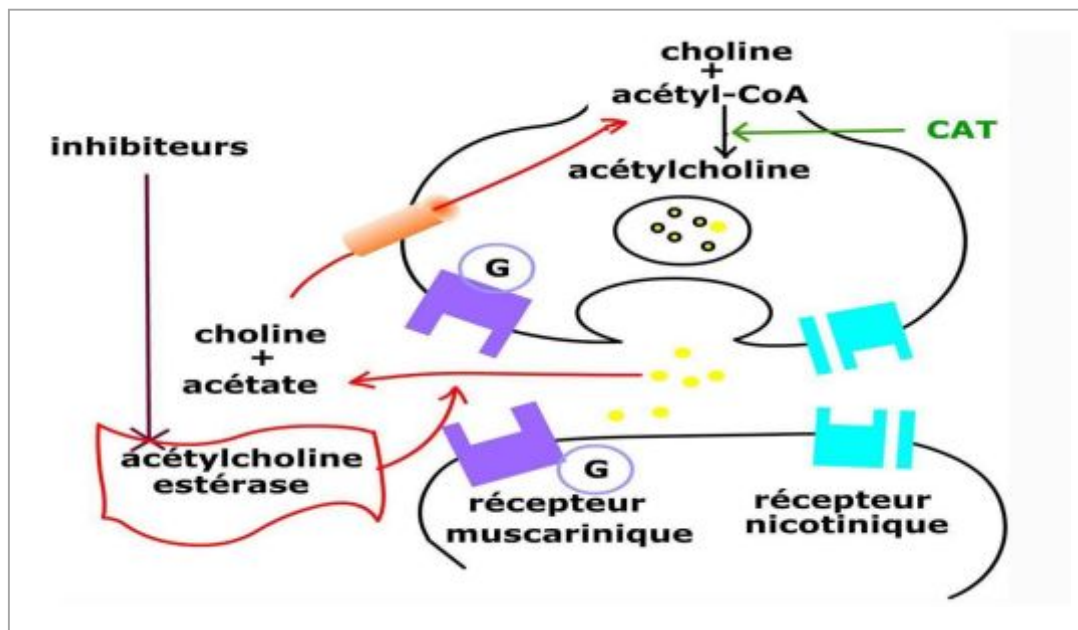


Figure 04 : Schéma de fonctionnement des inhibiteurs de la Cholinestérase

L'AChE appelée aussi cholinestérase vraie, car il est intracellulaire, est identifiée dans le plasma et dans les synapses. Cette enzyme est contenue dans les érythrocytes, les tissus nerveux et la jonction neuromusculaire. Même si l'AChE reste l'enzyme principalement responsable de la transmission des influx nerveux cholinergiques, on observera, au cours du développement de la MA, une implication de plus en plus significative de la butyrylcholinestérase (BChE), cholinestérase non spécifique ou pseudo- cholinestérase, dans la co-régulation des niveaux d'ACh cérébraux. De fait, il a été proposé, récemment, de traiter cette affection par des molécules inhibant à la fois l'AChE et la BChE (**Ballard, 2002**). Les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ont de faibles niveaux d'acétylcholine, ce qui explique les troubles cognitifs observés. La solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'AChE et/ou de la BChE (**Houghton et al., 2006 ; Dall'Acqua, 2013**).

L'utilisation des inhibiteurs réversibles et partielles de l'AChE et/ou de la BChE n'est qu'une des approches pharmaceutiques possibles pour traiter les symptômes de la maladie d'Alzheimer. D'autres neurotransmetteurs sont impliqués et peuvent également être importants.

2.4. Traitement actuel de la MA

Bien que la maladie soit identifiée depuis plus de 100 ans, elle reste incurable en raison de sa pathogenèse complexe (**Fang et al., 2016**). Les traitements spécifiques prescrits à ce

jour sont des traitements symptomatiques qui ciblent directement l'acétylcholinestérase et le récepteur de glutamate (NMDA). Il existe actuellement cinq médicaments approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis pour ses traitements symptomatiques susceptibles d'atténuer ou de stabiliser les symptômes cognitifs tels que la perte de mémoire et la confusion, pour une période limitée. Quatre de ces médicaments sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE), dont le donépézil (Aricept®), la galantamine (Razadyne®), la rivastigmine (Exelon®) et la tacrine (Cognex®), tandis que l'un module les récepteurs de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), la mémantine. Cependant, ces médicaments ont des effets secondaires indésirables tels que les nausées, vomissements, perte d'appétit, maux de tête, constipation et vertiges (Dall'Acqua, 2013 ; Brahmachari, 2011 ; Enogieru *et al.*, 2018), ce qui nécessite l'intérêt à trouver d'autres inhibiteurs de cholinestérase des ressources naturelles.

2.5. Traitement traditionnel de la MA

Essentiellement, tous les systèmes de médecine traditionnelle, y compris les Chinois, les Indiens, les Américains et les Européens médiévaux, ont eu divers toniques cérébraux et améliorateurs de la mémoire. Ceux-ci incluent Ashwagandha (*Withania somnifera*; Solanaceae) et Brahmi (*Bacopa monnieri* L. Pennell; Scrophulariaceae) mentionnés dans la médecine ayurvédique indienne comme stimulants de la mémoire. Les espèces communes de la sauge (*Salvia*; Lamiaceae) décrites dans les textes romains comme étant bonnes pour la mémoire, et le *Gingko biloba* (Ginkgoaceae) discuté dans la littérature chinoise un remède à la perte de mémoire depuis l'antiquité. Le curcuma indien (*Curcuma longa*; Zingiberaceae), qui contient la curcumine, se révèle très efficace dans le traitement de la MA. Les légumes comme la citrouille, la carotte et d'autres aliments et épices comme le gingembre, le sésame et les graines de tournesol, qui contiennent divers agents chimiques, sont très utiles pour améliorer les fonctions du cerveau. Les bleuets, raisins et grenade s'est récemment révélée avoir des effets bénéfiques dans la maladie d'Alzheimer. Les suppléments alimentaires en vitamine B6 et B12, en acide folique, en vitamine E, en vitamine C et en coenzyme Q10 ont également eu des effets bénéfiques chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Brahmachari, 2011).

2.6. Action des substances naturelles sur la MA

Il est de plus en plus évident que les substances naturelles ont un effet sur la mémoire, la cognition et la neurodégénérescence. À ce jour, les programmes de découverte d'inhibiteurs d'AChE à base de plantes, qui ont fourni deux des cinq médicaments actuellement approuvés pour le traitement de la MA, ont encore été les plus fructueux. Un grand nombre de composés naturels, autres que les alcaloïdes, ont été trouvés pour inhiber l'AChE, dont plusieurs études ont été réalisées sur les composés phénoliques les acides phénoliques, les flavonoïdes, les monoterpénoïdes et les diterpénoïdes (**Houghton et al., 2006 ; Habtemariam, 2019**).

Les flavonoïdes ont le potentiel de protéger les neurones contre les lésions induites par les neurotoxines et la neuroinflammation, le potentiel d'activation du signal synaptique et la capacité pour améliorer le flux sanguin cérébrovasculaire, mais le mécanisme d'action précis n'a pas été élucidé (**Spencer, 2010 ; Jäger et Saaby, 2011**). L'épicatéchine, la 3'-O-méthyl-épicatechine et l'héspéridine sont capables de protéger les neurones contre les dommages neuronaux oxydatifs. La naringénine, un flavanone capable d'inhiber les processus inflammatoires menant à une lésion des cellules neuronales. La quercétine flavanol, la catéchine et le gallate d'épigallocatechine flavan-3-ols affectaient également la neuroinflammation (**Jäger et Saaby, 2011**). La curcumine, l'hyperforine, la capsaïcine, la myricétine, la morine, le kaempférol, le resvératrol, l'acide nordihydroguaiarétique et l'acide tannique se sont avérés cibler les agrégations de la protéine A β , prévenir sa neurotoxicité et présentaient des effets inhibiteurs contre l'hyperphosphorylation de la protéine tau (**Habtemariam, 2019**). Il a également été démontré que de nombreux composés dérivés de l'acide shikimique, notamment la coumarine scopoletine isolée de l'espèce *Vaccinium oldhami* (Ericaceae), xanthotoxine et isopimpinelline isolées des racines de *Angelica acutiloba* (Apiaceae) présentaient des effets inhibiteurs contre AChE (**Houghton et al., 2006**).

De nombreuses études ont aussi montrés l'effet inhibiteur des terpénoïdes et constituants des huiles essentielles contre l'AChE. **Smail et al. (2011)** ont rapporté les potentiels inhibiteurs de l'AChE d'huiles essentielles commerciales de *Citrus aurantium* L., de *Cupressus sempervirens* L., d'*Eucalyptus globulus* Labill. *Foeniculum vulgare* Mill et *Thymus vulgaris* du Maroc. De même, **Politeo et al. (2011)** ont également signalé une forte activité d'inhibition de l'acétyl-cholinestérase de l'huile essentielle de *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) qui est majoritairement composée d' α -pinène, β -pinène, germacrene-D et β -carcinophyllène.

3. Activité antimicrobienne et résistance aux antimicrobiens

3.1. Généralités sur l'activité antimicrobienne

Les infections microbiennes sont causées par différents microorganismes et sont responsables des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues dans le monde. La thérapeutique anti-infectieuse se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent de manière sélective certaines voies métaboliques des microbes (bactéries, champignons, protozoaires) à très faibles doses, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieures. Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des microorganismes (moisissures: *Penicillium* et *Aspergillus* ou bactéries: des genres *Streptomyces* et *Bacillus*), mais en inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et entièrement synthétiques (Nauciel, 2000).

L'activité des antimicrobiens *in vitro* est déterminée en fonction de leur concentration, ils peuvent entraîner leur destruction (effet microbicide) ou empêcher leur multiplication (effet microbiostatique), par une action au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Chacun des antibiotiques a son spectre d'action propre: certains à spectre restreint ne sont efficaces que contre un groupe limité de microorganismes, certains n'attaquent que les bactéries gram négative, d'autres n'attaquent que les gram positive, d'autres enfin sont à large spectre. Ainsi les antibiotiques agissent sur: la synthèse du peptidoglycane (Bêtalactamines, Glycopeptides, Fosfomycines), les membranes (Polypeptides), la synthèse protéique (Macrolides, Aminosides, Phénicolés, Tétracyclines), la synthèse des acides nucléiques (Quinolones, Sulfamides) et le métabolisme intermédiaire (Sulfamides). L'action des antibiotiques est influencée par de nombreux facteurs: concentration microbienne, milieu, interaction avec un autre antibiotique,...etc. (Nauciel, 2000).

3.2. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un problème d'importance croissante en pratique médicale. C'est un phénomène aussi ancien que l'apparition des antibiotiques. Avec le temps, le nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques a augmenté et la résistance aux antibiotiques est devenue une menace mondiale pour la santé publique (Stefanović, 2018).

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise; la résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches d'une même espèce ou

d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique. C'est ainsi que, les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies. Aussi, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. *Klebsiella* spp. produit naturellement des bêta lactamases; cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne (Nauciel, 2000).

A côté de la résistance naturelle existe aussi une résistance acquise. Un antibiotique, en tant qu'agent sélectif, induit des modifications génétiques des bactéries, contribuant au développement, à la sélection et à la propagation de souches résistantes. Ce processus de résistance acquise est soutenu par une mutation rapide et un transfert des gènes de résistance. Ces derniers (via des plasmides, des transposons) peuvent être transférés entre des individus de la même espèce bactérienne ou d'espèces bactériennes apparentées, entre des membres du microbiote commensal ou pathogène et entre différents habitats environnementaux, propageant ainsi la résistance (Barbosa et Levy, 2000). L'utilisation indiscriminée d'antibiotiques à large spectre, d'agents immunosuppresseurs, de cathéters intraveineux, de transplantations d'organes et d'une épidémie persistante des infections au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peut également être à l'origine de souches microbiennes à sensibilité réduite aux antibiotiques et à un nombre accru de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (Selvamohan *et al.*, 2012).

3.3. Formation des biofilms

Outre la résistance susmentionnée causée par des mutations ou l'acquisition de gènes de résistance, le deuxième grand défi est représenté par le phénomène d'infections récalcitrantes chez les patients porteurs de bactéries ou de champignons se développant dans des biofilms sur des dispositifs médicaux implantés ou insérés, ou dans les tissus endommagés par divers processus pathologiques antérieurs (Hoiby *et al.*, 2015). Un biofilm est une forme sessile des bactéries existantes sur des surfaces solides ou des interfaces air-liquide, dans laquelle les bactéries se multiplient recouvertes d'une matrice composée de polysaccharides intercellulaires bactériens, de protéines et d'acides nucléiques extracellulaires libérés (Donlan et Costerton, 2002).

Le biofilm favorise la création d'une barrière protectrice entre les bactéries et l'environnement, agissant comme un facteur de virulence et de pouvoir pathogène important, rendant ces bactéries extrêmement résistantes aux antimicrobiens et à l'immunité de l'hôte (**Gabrilska et Rumbaugh, 2015**).

Actuellement, la croissance alarmante du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques et les difficultés de traitement des infections ont incité à rechercher de nouveaux composés antibactériens et à développer de nouvelles stratégies alternatives de lutte contre les infections bactériennes. Les plantes médicinales, utilisées depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter les maladies infectieuses, sont devenues une nouvelle source prometteuse d'agents antibactériens (**Stefanović, 2018**).

3.4. Activité antimicrobienne des HEs

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues principalement à la fraction des huiles essentielles contenue dans les plantes. Elles sont utilisées contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires ou la microflore vaginale, et d'origine fongique, comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes. Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (**Billerbek, 2007**). Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques, elles inhibent aussi la croissance des moisissures et de levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Dorman et al., 2000**). Ainsi, une activité antimicrobienne *in vitro* plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée. La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que la présence d'oxygène dans la molécule de terpène: la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminés vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes (**Dorman et al., 2000**). **Giordani et al., (2004)** ont montrés que la nature antimicrobienne des HES est apparemment en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol.

L'activité antimicrobienne des HEs a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Par contre, les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Etant donné la complexité de leur composition chimique, le

mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes et fongiques est assez complexe et n'est pas clairement élucidé, du point de vue moléculaire (**Burt, 2004**). Cependant, les modes d'action des HEs et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique en provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires. Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antimicrobienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**Burt, 2004**).

3.5. Activité antimicrobienne des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont doués d'activités antimicrobiennes importantes, probablement dû à leurs diversités structurales. Les propriétés antimicrobiennes de certaines classes de polyphénols ont été proposées, soit pour développer de nouveaux conservateurs alimentaires, ou de développer des thérapies innovantes pour le traitement de diverses infections microbiennes qui envisagent l'augmentation de la résistance microbienne contre l'antibiothérapie conventionnel (**Daglia, 2012**). En outre, l'activité antimicrobienne des polyphénols qui se produisent dans les plantes médicinales a été étudiée contre un large éventail de micro-organismes. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes (**Scalbert, 1991**). Parmi les polyphénols, flavan-3-ols, flavonols, et les tanins ont reçu plus d'attention en raison de leur large spectre et une activité antimicrobienne plus élevée en comparaison avec d'autres polyphénols, et au fait que la plupart d'entre eux sont capables de supprimer plusieurs facteurs de virulence microbienne (**Daglia, 2012**).

Les composés phénoliques, à l'origine, agissent sur la membrane cellulaire en fonction de leurs hydrophobicité, modifient la perméabilité et provoquent des fuites du contenu cellulaire ou interfèrent avec les protéines membranaires, ce qui entraîne une perturbation de la structure (**Radulović et al., 2013**). Les flavonoïdes inhibent également la synthèse des acides nucléiques par inhibition de la topoisomérase, le métabolisme énergétique et la synthèse de la paroi et membrane cellulaire (**Cushnie et Lamb, 2011**). Les quinones ont le potentiel de former un complexe irréversible avec les acides aminés nucléophiles dans les protéines. Les cibles probables dans la cellule microbienne sont des adhésines exposées en surface, des polypeptides de paroi cellulaire et des enzymes liées à la membrane (**Cowan, 1999**). Les proanthocyanidines possèdent plusieurs modes d'action tels que la déstabilisation de la membrane cellulaire, l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires, les actions

directes sur le métabolisme microbien ou la privation des substrats nécessaires à la croissance microbienne (**Daglia, 2012**). L'activité des gallotannins est attribuable à leur forte affinité pour le fer et à l'inactivation des protéines liées à la membrane. Les coumarines provoquent une réduction de la respiration cellulaire (**Cowan, 1999**).

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

1.1. *Thymus numidicus* Poiret.

La cueillette de cette espèce a été effectuée durant quatre stades de croissance ; en Avril 2015 (végétative), fin de mai (début de la floraison), juin (plein floraison) et début de juillet de la même année (fructification), dans la région de Grarem Gouga Wilaya de Mila Nord Est de l'Algérie (36°30'14,51" N Lat., 6°24'45,41" E Long. et 315 m d'altitude), zone subhumide. Les parties aériennes ont été utilisées ensembles.

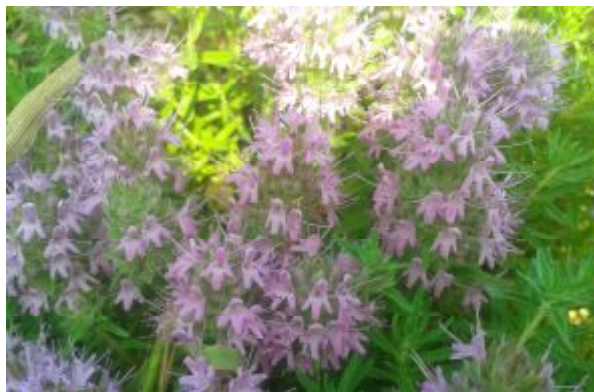


Figure 05: Représentation photographique de l'espèce *T.numidicus* Poiret. en floraison

1.2. *Crithmum maritimum* L.

La plante a été récoltée durant trois stades de croissance ; en juin 2015 (végétative), Aout (pleine floraison) et Octobre de la même année (fructification), dans les rochers de mer de la région d'EL Aouana Jijel Nord Est Algérien (36°47'16,33 " Nord, 5°38'53,45 " E Long. et 3 m d'altitude) qui est attribuée à l'étage bioclimatique humide. Les parties aériennes ont été utilisés ensembles.



Figure 06: Représentation photographique de l'espèce *C. maritimum* L. en floraison

1.3. *Satureja graeca* L.

Cette plante a été récoltée en Mars 2015 en plein floraison de la région de Grarem Gouga Wilaya de Mila (36°30'25,55 "N, Lat., 6°21'43,70" E Long et 240 m d'altitude), zone subhumide. Les différentes parties aériennes de la plante ont été utilisés ensembles.



Figure 07: Représentation photographique de l'espèce *S. graeca* L. en floraison

Les plantes fraîchement récoltées sont séchées à l'ombre dans un endroit sec et ventilé durant un mois, et elles sont broyées en poudre à l'aide d'un moulin électrique.

La détermination botanique des espèces a été validée par Dr Halis Yousef Docteur au Centre de Recherche CRSTRA- Biskra.



Figure 08: Image satellitaire de la localisation des trois stations d'étude (google earth, 2019).

2. Etude phytochimique

2.1. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) sont extraites à partir des parties aériennes ensembles de *T.numidicus* L. des quatre phases de croissance et de *C.maritimum* L. des trois stades de croissance. L'extraction est effectuée par l'appareil de Clevenger (**figure 09**), d'où 100g de la plante sèche est introduite dans un ballon à fond rond, et imprégné d'eau, l'ensemble est porté à ébullition pendant trois heures. Les vapeurs d'eau chargées d'HE, en traversant le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter. Les HEs ainsi obtenues sont conservées à 4°C dans des tubes bien fermés, en verre ombré. Le rendement en HE est exprimé en pourcentage par rapport à la poudre végétale sèche.

L'extraction est réalisée au niveau du laboratoire de biomolécules végétales et amélioration des plantes de l'Université Larbi Ben Mhidi , Oum Elbouaghi.



Figure 09 : Montage d'extraction des huiles essentielles (type Clevenger)

2.2. Analyse des HEs par GC/MS

Les analyses des HEs sont effectuées grâce à un chromatographe en phase gazeuse modèle Shimadzu GC 17 AAF, V3, 230V (Kyoto, Japan), équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne apolaire de silice fondue DB-1 [30m × 0,25mm de

diamètre interne, épaisseur du film 0,25 μm]; la température du four a été maintenue à 60 °C pendant 5 min, puis programmée à 240 °C avec une élévation de 4 °C/min et maintenue en mode isotherme pendant 10 min, la température de l'injecteur et du détecteur était de 250 °C et 270 °C respectivement; le gaz vecteur était l'Hélium (He) à un débit de 1,3 mL/min; 1 μL de l'échantillon à analyser est injecté en mode split avec un rapport de division de 1/50. La composition en pourcentage de chaque HE a été déterminée à l'aide d'un programme informatisé de classe GC10.

Les mêmes conditions ont été utilisées pour l'analyse GC/MS, dans lesquelles le modèle Varian Saturn 2100T (Old York Rd., Ringoes, NJ, USA) équipé d'une colonne DB-1 [30m \times 0,25mm (d.i), épaisseur du film 0,25 μm] est utilisé. La température de l'injecteur et de la ligne de transfert de masse est maintenue à 220 °C et 290 °C respectivement. La température de la source d'ions était de 200 °C. Le volume d'injection était de 0,2 μL avec un rapport de division de 1/30. Les mesures EI-MS sont acquises à une énergie d'ionisation de 70eV dans un intervalle de m/z allant de 28–650. Les constituants de chaque huile essentielle sont identifiés par comparaison de leurs profils spectrales et à leurs temps de rétention avec les données (Librairies NIST et WILEY) correspondantes ainsi qu'aux profils spectrales rapportés dans la littérature (Adams, 2007 ; Ozen et al., 2011).

2.3.Préparation des extraits à partir de *C.maritimum* L. et *S.graeca* L.

La méthode d'extraction successive à l'aide des solvants organiques de polarité croissante a été choisie pour l'obtention des extraits à partir des parties aériennes de *S.graeca* L. et *C.maritimum* L. en plein floraison (Cetkovic et al 2007). Dans une première étape, 50 g de la matière végétale sèche et broyée a été soumise à une extraction par macération hydroalcoolique avec de l'éthanol 80 % dans l'eau distillée sous agitation à la température ambiante du laboratoire. Cette opération est répétée 03 fois toutes les 24 heures. Les macéras sont par la suite réunis et filtrés deux fois à travers un papier filtre ordinaire, puis évaporés presque à sec avec un évaporateur rotatif sous pression réduite et à température de 40 °C afin d'éliminer de l'éthanol.

Ensuite, l'extrait brut résultant de cette étape est repris dans 200 ml d'eau distillée bouillante et laissé pendant une nuit de repos. La phase limpide obtenue a été filtrée et soumise directement aux épuisements successives par les solvants : *n*-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol respectivement. Chaque affrontement s'est répété trois fois afin

d'extraire le maximum de molécules contenues dans chaque phase organique. Les fractions obtenues sont évaporées à sec et ensuite stockées à température de 4°C jusqu'à l'analyse.

Le rendement d'extraction en pourcentage (R%) est calculé par rapport au poids de la plante sèche.

Le processus de l'extraction est résumé dans la (**Figure 10**).

Cette extraction est effectuée au niveau du laboratoire de biomolécules végétales et amélioration des plantes de l'Université Larbi Ben Mhidi , Oum Elbouaghi.

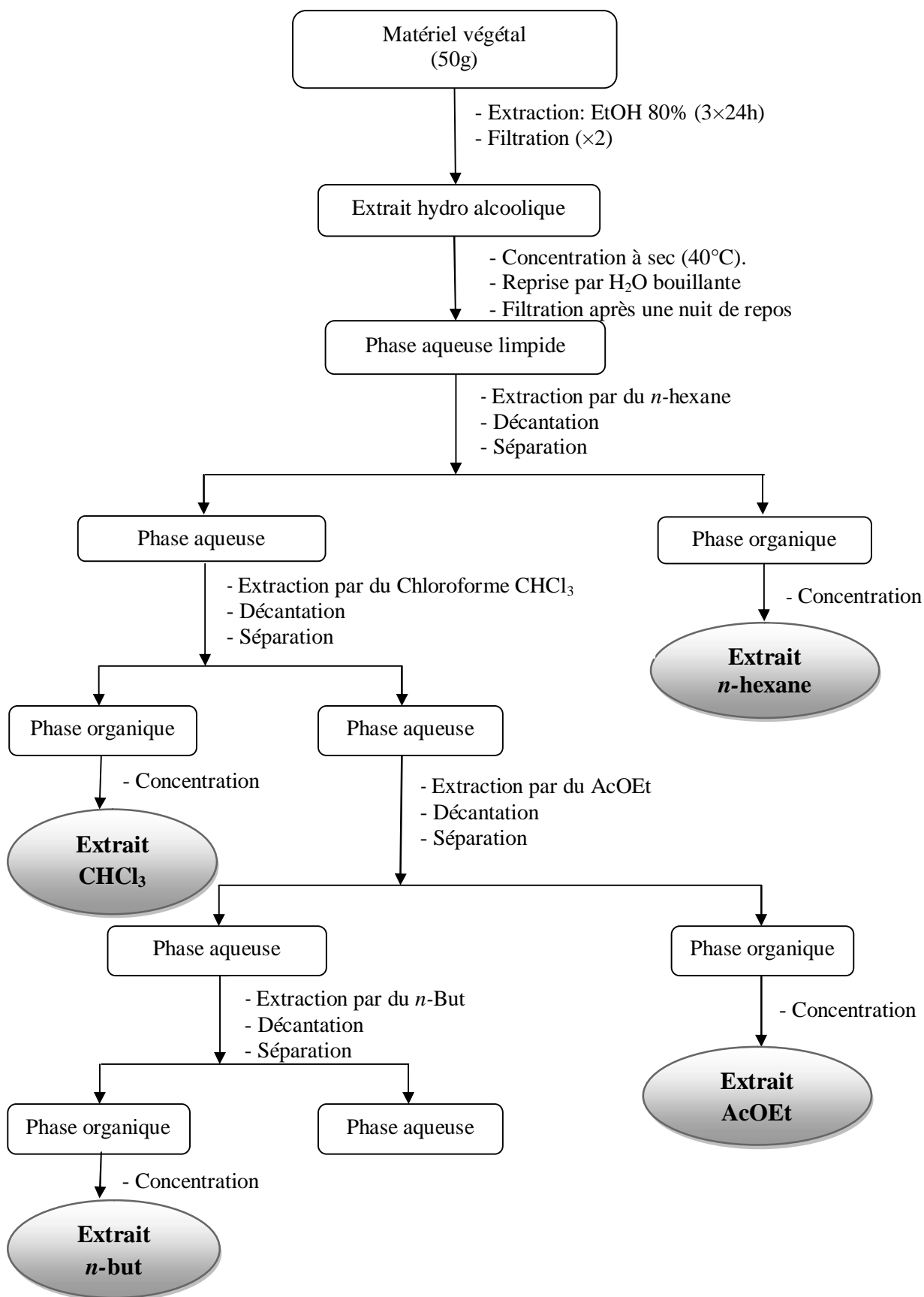


Figure 10: Protocole d'extraction des composés phénoliques (Cetkovic *et al* 2007).

2.4. Quantification des composés phénoliques totaux

La méthode utilisant Folin Ciocalteu (FC) comme réactif a été suivie pour déterminer la quantité des composés phénoliques totaux (CPT) dans les extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanoliques des deux plantes *C.maritimum* L. et *S.graeca* L., selon **Singleton *et al.*, (1965)**. En présence de carbonate de sodium (Na_2CO_3), le réactif FC constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) est réduit par les composés phénoliques en donnant un mélange de complexes d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleue. Cette solution absorbe à une longueur d'onde de 725 nm. Le mélange réactionnel est constitué de 500 μL de solution d'extrait à 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2500 μL de réactif F.C dilué 1/10 suivis de 2000 μL de carbonate de sodium à 20 g/L. Au bout de 90 minutes, l'absorbance a été mesurée à 760 nm. La concentration en CPT a été déterminée à l'aide de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage du standard acide gallique (2.5 - 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les résultats sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg Extrait).

2.5. Quantification des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium citée par **Miliauskas *et al.*, (2004)**. Un millilitre d'extrait à 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dissous dans du méthanol a été ajouté à un millilitre de solution méthanolique à 2% de AlCl_3 . L'absorbance a été lue à 430 nm après une incubation de dix minutes à la température ambiante. La concentration en flavonoïdes a été calculée à l'aide de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (2.5-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les résultats sont exprimés en μg équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg Extrait).

2.6. Analyse des composés phénoliques par CLHP-DAD

L'analyse des extraits d'acétate d'éthyle et *n*-butanolique et de 27 composés phénoliques standards a été réalisée à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse modèle Shimadzu (Coopération Shimadzu, Japon) constitué d'un système d'administration de solvant (Shimadzu LC-20AT) et d'un système de détection à barrette de diodes (DAD) modèle Shimadzu SPD-M20A. La température de la colonne a été réglée à 35°C. La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Inertsil ODS-3 (4 μm , 4,0 mm x 150 mm) et une colonne de garde Inertsil ODS-3. La phase mobile est

composée de l'acide acétique aqueux à 0,1% (A) et du méthanol (B). L'élution en mode gradient de 2% à 100% a été réalisée comme décrit par **Barros et al (2009)** et **Tel-Çayan et al., (2015)**. La solution mère de l'échantillon a été préparée dans du méthanol à raison de 8 mg.mL⁻¹ et filtrée à l'aide d'un filtre Agilent de 0,45 µm. 20 µL de chaque échantillon a été injecté. Les spectres d'absorption UV ont été enregistrés à 254 nm. Les composés phénoliques détectés ont été caractérisés en comparant leurs temps de rétention et les résultats ont été exprimés en microgrammes par gramme de poids sec d'extrait.

3. Etude des activités biologiques

3.1. Activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante de différents extraits des trois plantes ; *T. numidicus* Poiret., *S. graeca* L. et *C. maritimum* L. est évaluée selon six méthodes: piégeage du radical libre DPPH, Piégeage de l'ABTS, piégeage de l'anion superoxyde, blanchissement du β-carotène, réduction du fer et méthode CUPRAC. Tous ces tests ont été réalisés dans des microplaques de 96 puits à l'aide d'un lecteur microplaque (Perkin Elmer, Enspire).

3.1.1. Piégeage du radical libre DPPH

L'effet de différents extraits et HEs ainsi des antioxydants standards (BHA et BHT) sur le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH[•]) a été estimé selon la méthode de **Blois (1958)**. Lorsqu'un DPPH[•] de couleur violet réagit avec un composé antioxydant, qui peut donner de l'hydrogène, il est réduit en 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazine de couleur jaune (**figure 11**). Ce changement de couleur est mesuré spectrophotométriquement. Brièvement, 40µl de l'échantillon à concentrations variantes (6,25 – 200 µg.mL⁻¹) est ajouté à 160 µl de solution méthanolique du DPPH (10⁻⁴ M). Le mélange a été incubé pendant 30 min à la température ambiante, puis l'absorbance est mesurée par rapport à un blanc (méthanol) à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est calculé selon l'équation:

$$\% I = [(A1-A2) / A1] \times 100$$

Où; A1 et A2 sont respectivement les absorbances du contrôle négatif et de l'échantillon.

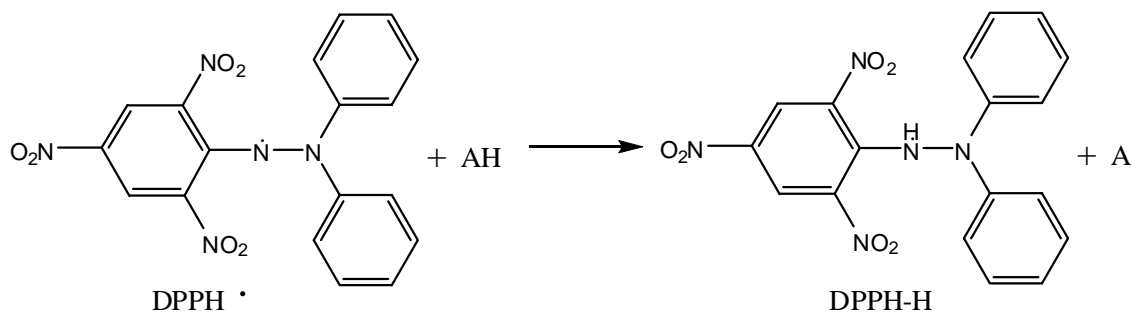


Figure 11 : Réduction radical libre du DPPH[•] (Blois 1958)

3.1.2. Piégeage de l'ABTS

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage du radical cation 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) a été déterminée selon la méthode de **Re et al (1999)**. D'abord, une solution ABTS dans l'eau à 7 mM a été préparée, puis du persulfate de potassium à 2,45 mM a été ajouté pour générer du radical cation (ABTS^{•+}) (**figure 12**), stocké dans l'obscurité à la température ambiante pendant 12h. L'absorbance de cette solution a été ajustée avec H₂O à 0,700 ± 0,020 à 734 nm. Dans chaque puits de la microplaque, 160 µL de cette solution est ajouté à 40 µL d'échantillon à différentes concentrations. Le méthanol a été utilisé comme contrôle négatif, tandis que le BHT et le BHA ont été utilisés comme antioxydants standard. L'absorbance a été lue à 734 nm après 10 min d'incubation à la température ambiante et le pourcentage d'inhibition a ensuite été calculé selon la formule de DPPH.

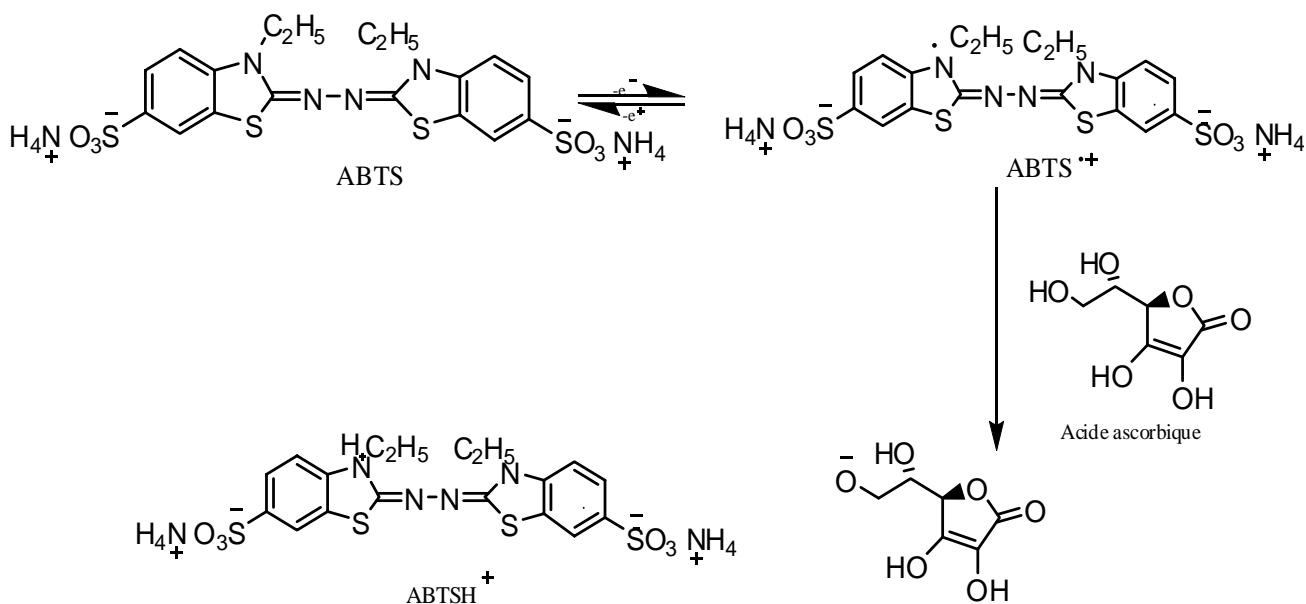


Figure 12: Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H⁺

3.1.3. Piégeage de l'anion superoxyde

L'activité de piégeage de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) a été mesurée suivant le procédé de DMSO alcalin citée par **Elizabeth et Rao (1990)** avec quelques modifications. Cette méthode est basée sur la réduction de Nitrobleu tetrazolium (couleur jaune) en formazan (couleur bleue) sous DMSO alcalin généré. 130 μ l de DMSO alcalin (préparé en dissolvant 20 mg de NaOH dans 100 ml de DMSO pour générer de l' $O_2^{\bullet-}$) est mélangé avec 40 μ L d'extrait à différentes concentrations (6,25 à 200) μ g/mL, puis additionnés de 30 μ L de NBT. (1 mg/mL dans de l'eau distillée). L' α -tocophérol a été utilisé comme standard et le méthanol a été utilisé comme contrôle négatif. L'absorbance a été lue à 560 nm après 10 min d'incubation à la température ambiante et le pourcentage d'inhibition de l' $O_2^{\bullet-}$ a été mesuré comme indiqué avec l'équation du DPPH.

3.1.4. Blanchissement du β -carotène

La méthode de **Marco (1969)** citée par **Ozturk et al., (2011)** a été utilisée pour évaluer l'activité de blanchissement du β -carotène. Dans ce test, les radicaux peroxydes générés à partir de l'acide linoléique oxydent le β -carotène (couleur orange) et entraîne leur décoloration (blanchissement). Toutefois, la présence d'un antioxydant participe à la neutralisation de ces radicaux et de ce fait prévient l'oxydation et la décoloration du β -carotène. En bref, 0,5 mg de β -carotène est dissout dans 1 mL de chloroforme, ensuite mélangé à 25 μ L d'acide linoléique et émulsionné par 200 μ L de Tween 40. Après évaporation du chloroforme sous vide à 40 ° C, le résidu a été récupéré avec 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène. L'absorbance est ajustée à (0,800 - 0,900) à 470 nm avec de l'eau oxygénée. À 160 μ l de cette solution, 40 μ L de chaque extrait à des concentrations (6,25 - 200) μ g/mL et des standards (BHA et BHT) ont été ajoutés. Après une incubation de deux heures à 50 °C, l'absorbance a été mesurée à 470 nm et le taux de blanchissement du β -carotène est calculé selon l'équation suivante:

$$R = (\ln a / b) / t$$

Où; a et b étaient respectivement les absorbances au début de la réaction (t_0) et après 120 min (t_{120}). Considérant que l'activité antioxydante (A%) est exprimée en pourcentage et calculée par l'équation ci-dessous:

$$A\% = [(R_{\text{contrôle}} - R_{\text{Ech}}) / R_{\text{contrôle}}] * 100$$

3.1.5. Pouvoir réducteur

La capacité réductrice des extraits a été évaluée par la réduction des $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6^-$ en $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6^-$ selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. 10 μL d'échantillon à différentes concentrations (1,562- 50 $\mu\text{g/mL}$) est mélangé à 40 μL de tampon phosphate (pH 6,6) et 50 μL de ferricyanure de potassium (1%) (1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100 mL H_2O), le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min. Ensuite, 50 μL d'acide trichloroacétique (10%), 40 μL de H_2O et 10 μL de chlorure ferrique FeCl_3 (0,1%) sont ajoutés respectivement. L'absorbance a été mesurée à 700 °C contre à un blanc (méthanol). Les résultats sont donnés en tant qu'absorbances et les valeurs $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$) correspondant à la concentration indiquant une intensité d'absorbance de 0,50 sont calculées et comparés à ceux du BHT et du BHA utilisés en tant que témoins positifs.

3.1.6. Test CUPRAC

La capacité réductrice du cuivre (cupric Reducing Antioxidant Capacity) a été déterminée suivant la méthode de **Apak *et al.*, (2008)** modifié par **Öztürk (2012)**. Cette méthode est basée sur la réduction du Cu^{2+} suivi par le traitement du Cu^+ avec un réactif chromogène Néocuproïne (NC) (2,9 -diméthyl- 1,10-phénanthroline) en présence des hydroxyles phénoliques conduisant à la formation d'un complexe stable entre la néocuproïne et les ions cuivre (Cu^+) qui absorbe à 450 nm. Un mélange constitué de 60 μL de tampon acétate d'ammonium NH_4Ac (1 M, pH=7,0), 50 μL de néocuproïne 7.5 mM et 50 μL du Chlorure de cuivre ($\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) 10 mM a été préparé, puis 40 μL de solution d'échantillon à des concentrations (6.25- 200) $\mu\text{g/mL}$ est ajoutés au mélange initial. Après une heure d'incubation à la température ambiante, l'absorbance est lue à 450 nm. Les antioxydants standards utilisés dans ce test étaient le BHT et le BHA. Les résultats sont exprimés en absorbances et des valeurs $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/mL}$) sont calculées.

3.2. Activité anti-Alzheimer :

3.2.1. Activité anti-(acétyl/butyryl) cholinestérase

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase ont été déterminées suivant la méthode spectrophotométrique d'Ellman (**Ellman *et al.*, 1961**). Il s'agit d'un protocole standard pour la détermination des thiols libres. Le test d'Ellman est basé sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE et butyrylthiocholine par le BChE pour générer de la thiocholine. Cette dernière se réagit avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB)

3.3. Activité antimicrobienne

3.3.1. Microorganismes et conditions de culture

Les souches utilisées dans cette étude proviennent de la Collection des Cultures de l'Université Muğla - Turquie. Des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC19433 et *Listeria monocytogenes* ATCC7644), bactérie à Gram négatif (*Pseudomonas fluorescens* RSKK240) et deux levures (*Candida albicans* ATCC 10239 et *Candida tropicalis* RSKK 665) ont été choisis. Toutes les souches bactériennes mentionnées ont été mises à croître dans un bouillon nutritif et incubées à 37° C pendant 24 h à l'exception de *L. monocytogenes* ATCC7644, *P. fluorescens* RSKK240 et levures (30° C pendant 24-48 h). Les souches sont maintenues dans des géloses inclinées appropriés à 4°C pendant toute la durée de l'étude et utilisées comme cultures mères.

3.3.2. Détermination des CMI

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des extraits et huiles essentielles étudiées sur les cellules planctoniques sont déterminées en utilisant le bouillon Mueller Hinton suivant la méthode de micro-dilution recommandée par (CLSI, 2006) et décrite par (Rota *et al.*, 2004). Des inocula sont préparés dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir de cultures jeunes et pures en ajustant la densité de la suspension à 0,5 Mac Farland qui correspond à 5×10^5 unités formants des colonies (UFC)/ml. Le bouillon Mueller Hinton (MHB) de (Biolife, Milan, Italie) a été utilisé comme support d'essai.

Cinq concentrations finales (0,625-10) mg/mL de chaque extrait et (0,062-1) mg/mL de chaque huile essentielle ont été préparées dans une solution de DMSO. Dans chaque puits de microplaque stérile à 96 puits contenant 170 µl de MHB stérile, 10 µl de suspension de cellules ont été inoculés. Ensuite, 20 µL d'extrait ou d'HE à différentes concentrations ont été ajoutés en deux répétitions. Trois puits sont réservés aux témoins (milieu, milieu + inoculum et milieu + inoculum + DMSO). Les microplaques inoculées ont été incubées à 37 °C en exceptant celle concernant *L. monocytogenes* ATCC7644, *P. fluorescens* RSKK240 et levures qui sont incubés à 30°C pendant 24h. La concentration la plus faible des échantillons testés, qui ne présentaient aucune croissance visible à l'œil nu (traduit par la présence d'un trouble au fond du puits) des microorganismes après évaluation macroscopique, a été déterminée en tant que CMI, exprimée en mg/mL.

3.3.3. Activité antibiofilm

L'effet de différentes concentrations d'extraits et HEs (allant du CMI au 1/4 CMI) sur la capacité des bactéries et levures à former un biofilm a été testé sur des microplaques en polystyrène, comme décrit par (Meritt *et al.* 2005, Ceylan *et al.*, 2014). Des cultures de microorganismes hautement producteurs de biofilm (*S.aureus* ATCC25923, *Listeria monocytogenes* ATCC7644, *Pseudomonas fluorescens* RSKK240 et *Candida albicans* ATCC 10239) sont mises à croître pendant une nuit dans 5 ml de bouillon Tryptone-Soja (TSB) supplémenté du glucose (1%). La suspension microbienne a ensuite été diluée (5×10^5 UFC ml⁻¹) et 100 µL ont été distribués dans chaque puits de microplaques en présence de 100 µL de chaque extrait ou HEs à différentes concentrations (1 ; 0,5 et 0,25 CMI) ou 100 µL du contrôle (milieu de culture). Après incubation pendant 48 h à 37°C, chaque puits a été lavé à l'eau pour éliminer les bactéries planctoniques. Les bactéries restantes ont ensuite été colorées avec une solution de cristal violet (0,1%) pendant 10 min à température ambiante. Les puits ont été lavés encore une fois pour éliminer la solution de cristal violet qui n'avait pas spécifiquement coloré les bactéries adhérentes. Les microplaques ont été retournées et tapotées vigoureusement sur du papier absorbant pour éliminer tout excès de liquide, puis séchées à l'air. 200 µL d'éthanol à 95% et d'acide acétique glacial à 33% ont été versés dans les puits contenant les bactéries à Gram négatif et Gram positif respectivement, et les plaques sont agitées automatiquement. Les taches de biofilm se sont solubilisées à la température ambiante. Enfin, la densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 550 nm à l'aide d'un lecteur microplaque (Thermo Scientific Multiskan FC, Vantaa, Finlande). Les pourcentages d'inhibition de la formation du biofilm sont calculés suivant l'équation :

$$I\% = [(Ab_{\text{contrôle}} - Ab_{\text{Echantillon}}) / Ab_{\text{contrôle}}] * 100$$

4. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes \pm SD d'analyses en trois essais. Les corrélations entre la teneur en composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante sont obtenues par le coefficient de corrélation de Pearson (r) à un niveau de signification de 99% (P <0,05). Les données ont été traitées par le logiciel (Graph Pad Prism 5.03). Les valeurs de CI₅₀ (Concentration d'inhibition à 50%) pour les activités antioxydante et anticholinestérase sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

Chapitre II

Résultats et Discussion

1. Etude phytochimique

1.1. Huiles essentielles de *T. numidicus* Poiret.

1.1.1. Aspects et rendements des HEs de *T. numidicus* Poiret

Les HEs obtenus par hydrodistillation à partir des parties aériennes de *T. numidicus* Poiret. des quatre phases phénologiques : phase végétative (Tn1), début floraison (Tn2), en pleine floraison (Tn3) et en fructification (Tn4) sont de caractères hydrophobes, visqueux, solubles dans les solvants organiques notamment l'éthanol et le DMSO, très odorantes, de couleurs jaune pale (Tn1), jaune foncé (Tn2), jaune orangé (Tn3) et rougeâtre (Tn4). Les rendements en HEs sont exprimés en pourcentage par rapport au poids initial de la matière végétale sèche (**figure 14**).

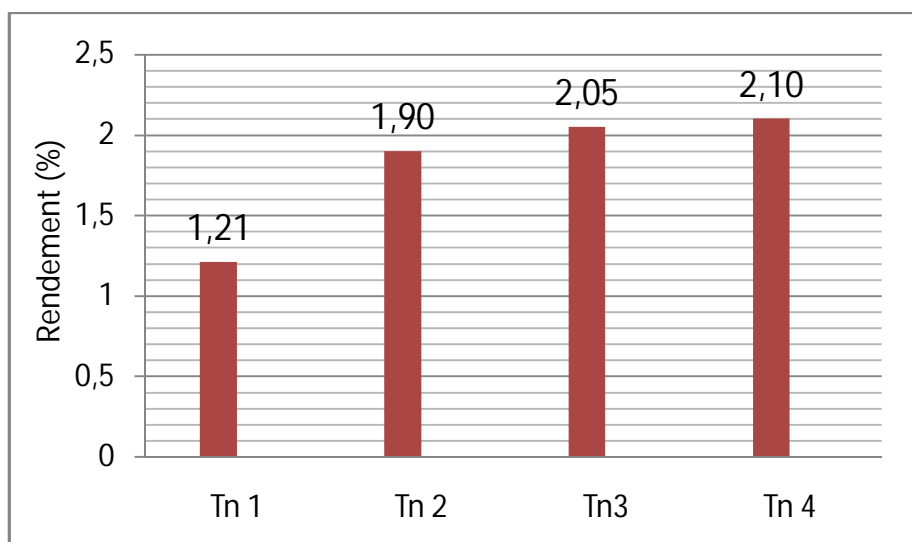


Figure 14 : Rendements en HEs de l'espèce *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

Les résultats représentés en **figure 14** montrent que les rendements en HEs de *T. numidicus* Poiret. obtenus varient de 1,21 % jusqu'à 2,10 % en fonction de la phase croissance. Il est intéressant de remarquer que l'HE en phase de fructification (Tn4) présente le rendement le plus élevé suivi par celles des trois autres phases en ordre décroissant. Les récoltes pendant la phase végétative (Tn1) sont caractérisées par de faibles rendements en HEs (1,21 %) par rapport aux autres phases. Globalement, ces rendements sont comparables avec ceux obtenus (1,1–2,06 %) par de nombreux auteurs sur la même espèce dans les différentes régions en Algérie (**Kabouche et al. 2005 ; Hadeff et al. 2007 ; Saidj et al. 2008 ; Zeghib et al. 2013 ; Kouch et al. 2014 ; Adrar et al. 2015 ; Messara et al. 2018**). Plusieurs

facteurs peuvent être à l'origine de la divergence des rendements en HEs de la même espèce, notant les techniques d'extraction, les facteurs bioclimatiques et environnementaux comme le type de climat, l'altitude, le taux d'exposition au soleil, type de sol, la phase de croissance (Hudaib *et al.*, 2002). Cette dernière fait l'objet du présent travail, dont une variation importante des rendements en HEs de *T. numidicus* Poiret. en fonction de la phase de croissance a été remarquée.

1.1.2. Composition chimique des huiles essentielles de *T.numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

Les analyses GC-MS des HEs de *T.numidicus* Poiret. ont révélé la présence de vingt composés représentés dans le **tableau 07**.

Tableau 07 : Composition chimique des HEs de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

Pic	Composé	tr (min)	Concentration relative (%)			
			Tn1	Tn2	Tn3	Tn4
1	α -Pinene	12,719	0,98	-	-	-
2	1-octen-3-ol	13,955	0,65	-	-	-
3	Myrcene	14,343	0,70	-	-	-
4	<i>p</i> -Cymene	15,657	5,43	2,09	0,73	1,43
5	γ -Terpinene	16,898	2,14	-	-	-
6	β -Pinene	18,134	-	-	-	1,91
7	Linalol	18,207	10,87	3,43	2,70	-
8	thymol Methyl ether	23,233	16,16	3,44	0,58	-
9	Carvacrol methyl ether	23,390	0,20	-	-	-
10	Thymoquinone	23,609	-	-	1,74	1,52
11	Thymol	25,150	52,17	86,27	84,69	89,69
12	Carvacrol	25,183	4,61	4,76	6,52	5,44
13	Caryophyllene	29,586	1,18	-	0,66	-
14	γ -Muuroolene	31,180	0,37	-	-	-
15	β -Bisabolene	32,025	2,40	-	-	-
16	Δ -Cadinene	32,572	0,71	-	-	-
17	α -Bisabolene	32,918	0,64	-	-	-
18	Phenol, 4-methoxy-2,3,6-trimethyl-	33,185	-	-	0,65	-
19	Caryophyllene oxide	34,617	0,37	-	0,89	-
20	α -Cadinol	36,481	0,41	-	-	-
Total			99,99	99,99	99,16	99,99

Les principales classes chimiques regroupant les constituants des quatre huiles essentielles de *T.numidicus* Poiret. sont représentés en **figure 15** :

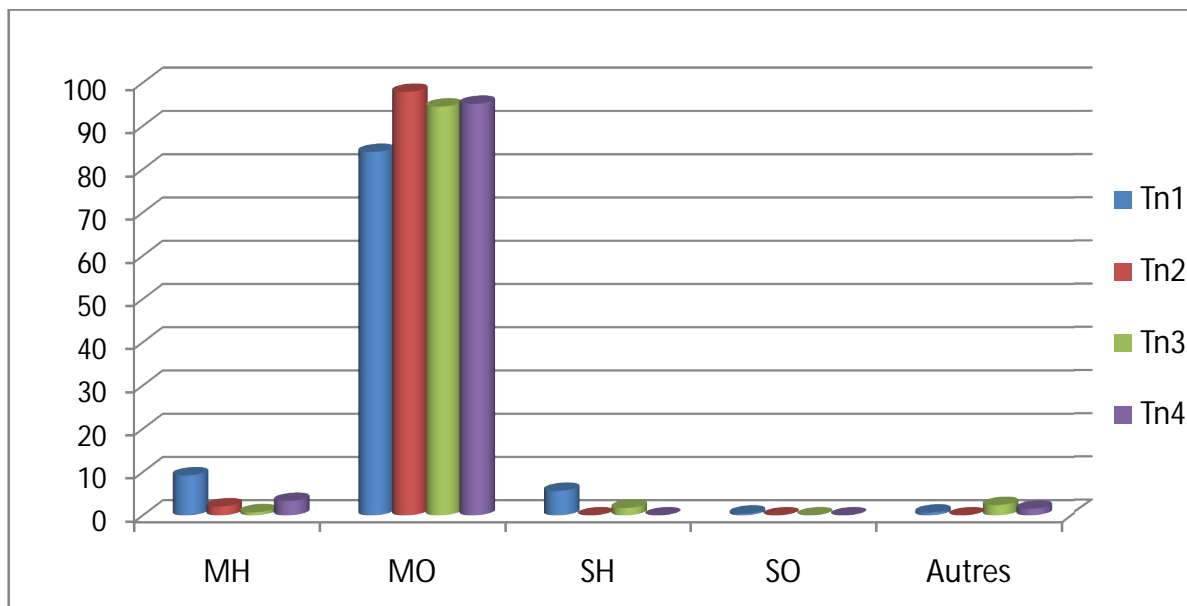


Figure 15 : Classes chimiques des HEs de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique (MH=Monoterpenes hydrocarbonés ; MO= Monoterpenes oxygénés; SH= Sesquiterpenes hydrocarbonés; SO= Sesquiterpenes oxygénés)

Les concentrations relatives des composés majoritaires de toutes ces huiles essentielles, ainsi que leurs structures chimiques sont consignées dans les **figures 16** et **17** :

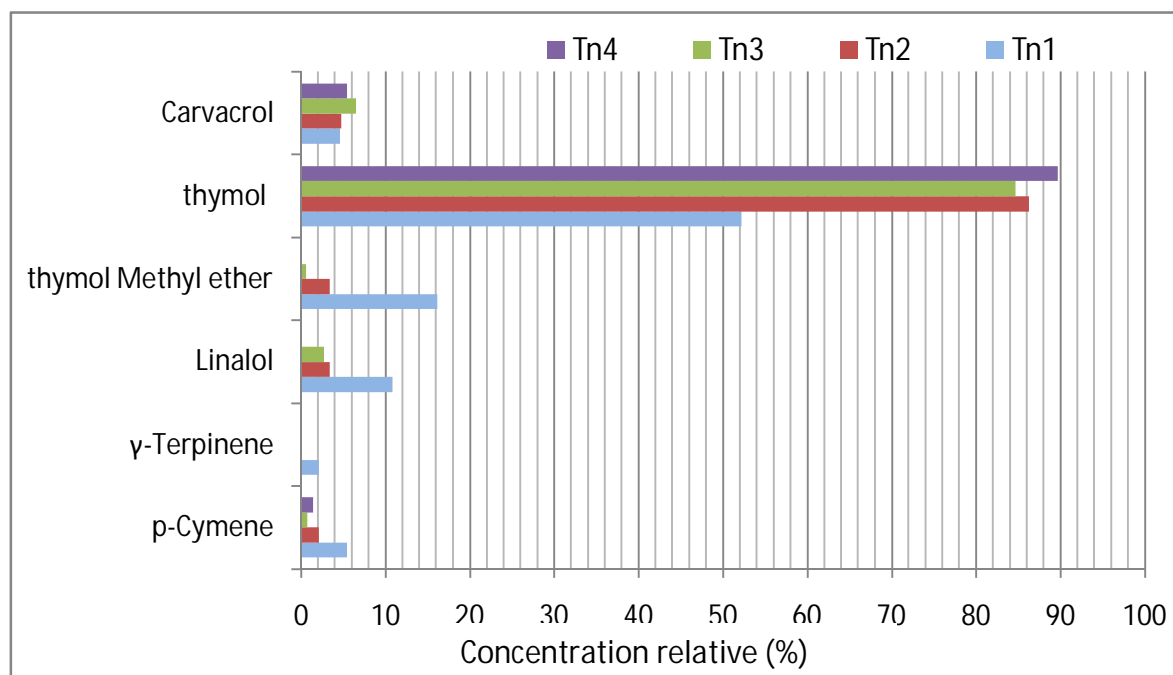


Figure 16 : Répartition des composés majoritaires des HEs de *T.numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

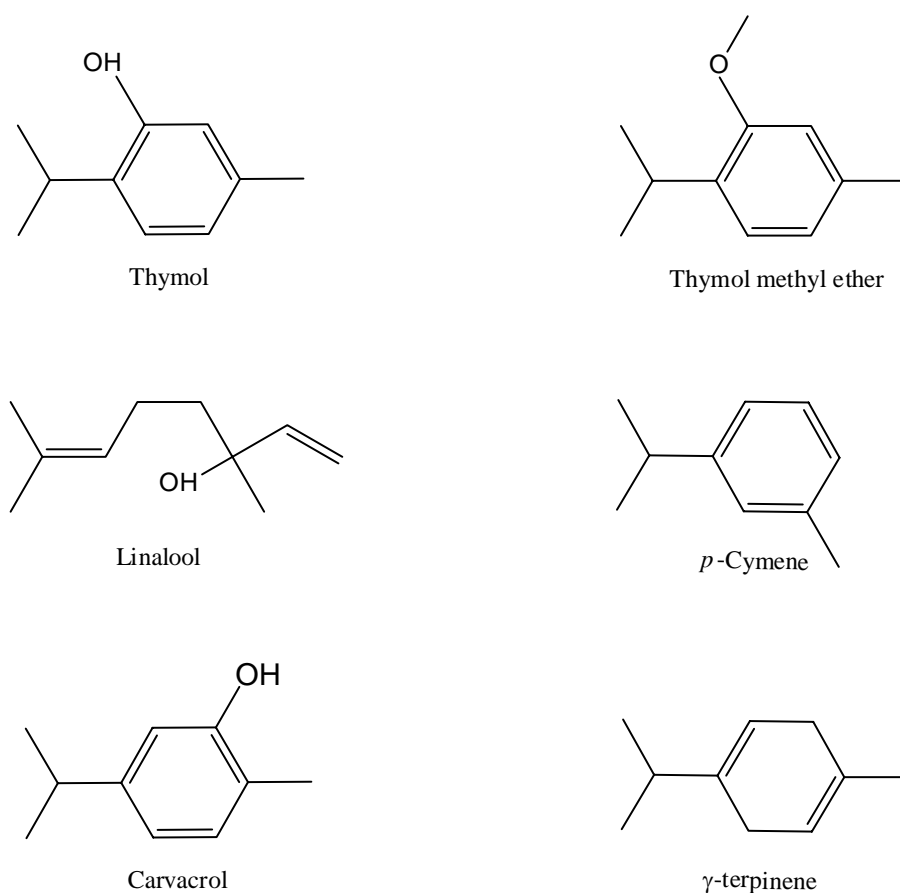


Figure 17 : Structures des composés majoritaires des HEs de *T.numidicus* Poiret.

Ces résultats montrent une variation de la composition chimique des huiles essentielles extraites de *T. numidicus* Poiret. au cours de différentes phases de croissance. Au total, dix-sept, quatre, dix et cinq constituants ont été identifiés et quantifiés dans les huiles : Tn1, Tn2, Tn3 et Tn4 respectivement et appartenant à quatre classes chimiques principales : les monoterpènes oxygénés (84,01 - 97,9%) étaient les plus abondants suivis par les monoterpènes hydrocarbonés (0,73 - 9,25%), les sesquiterpènes hydrocarbonés (1,73- 5,67%) et en dernier les sesquiterpènes oxygénés qui sont détectés en traces (0,41%) uniquement dans l'HE de la phase végétative (**figure 15**). Les composés: thymol, carvacrol, linalol, thymol methyl ether, *p*-cymene et γ -terpinene représentent la majorité des constituants de ces HEs (**figure 16**).

D'abord, la phase végétative est caractérisée par les taux les plus élevés en composés : thymol (52,17%), thymol methyl ether (16,16%), linalol (10,87%), *p*-cymene (5,43%) et γ -terpinene (2,14%) comparativement avec les autres phases. A cette stade, le thymol était au

maximum de 52,17% et carvacrol de 4,61%. Au cours du développement de la floraison, on observe clairement une augmentation des taux de thymol et carvacrol en correspondance avec une diminution des taux de *p*-cymene, thymol methyl ether, linalol et γ -terpinene. Ces trois derniers n'ont pas été détectés définitivement en phase de fructification. Le *p*-cymene et γ -terpinene sont des précurseurs biosynthétiques de thymol et carvacrol respectivement (Ozturk, 2012). La teneur la plus élevée en thymol a été observée en phase de fructification (89,69%) et celle de carvacrol en pleine floraison (6,52%). Cette dernière a été diminuée de nouveau en phase de fructification (5,44%). D'autre part, le β -bisabolène un sesquiterpène hydrocarboné a été détecté uniquement en phase végétative (2,40%).

L'étude de la composition chimique des HEs de *T.numidicus* Poiret a fait l'objet de nombreux travaux précédents. D'après plusieurs auteurs (Kabouche *et al.*, 2005 ; Giordani *et al.*, 2008 ; Laouer *et al.*, 2009 ; Zeghib *et al.*, 2013 ; Zellagui *et al.*, 2014 ; Benayache *et al.*, 2014 ; Kouch *et al.*, 2014 ; Messara *et al.*, 2018 et Boughendjioua et Djeddi 2018), une prédominance du chémotype phénolique « Thymol » dans l'HE de cette espèce provenant de différentes régions en Algérie, ainsi la présence des constituants majeurs (*p*-Cymene, thymol méthyle éther, γ -Terpinene, Linalol et carvacrol) a été remarquée (tableau 08).

Tableau 08 : Composition chimique de l'HE de *T. numidicus* provenant de différentes régions en Algérie

Partie de plante (Région)	Période de cueillette	Constituants majeurs (%)						référence
		thymol	carvacrol	linalool	TME	γ -terpinene	<i>p</i> - <i>o</i> -cymene	
PA (Djebel El-Ouahch, Constantine)	Mai 2002	68,2	16,9	11,5	-	-	-	Kabouche <i>et al.</i> , (2005)
PA (Khedara, Souk aharas)	Floraison (mars 2004)	57,20	2,2	9,26	-	9,19	7,55	Giordani <i>et al.</i> , (2008)
PA (Berrahal, Annaba)		66,31	4,31	8,62	-	6,12	6,20	
PA (Megress, Sétif) variété blanche	Floraison (juin 2005)	59,0	3,7	-	-	8,5	5,8	Laouer <i>et al.</i> , (2009)
PA (Megress, Sétif) variété violette		68,0	4,2	-	-	4,2	4,5	
PA (Constantine)	Mai 2012	23,92	6,02	17,20	6,73	10,84	11,41	Zeghib <i>et al.</i> , (2013)
Feuilles (Mila)	Floraison (Avril)	41,2	2,8	10,7	3,3	-	12,9	Zellagui <i>et al.</i> , (2014)

	2012)							
PA (Constantine)	Mars 2012	54,1	3,8	5,4	-	-	15,3	Benayache <i>et al.</i> , (2014)
Feuilles (Berrahal, Annaba)	Végétative (Avril 2012)	77,52	-	-	-	6,38	10,1	Kouch <i>et al.</i> , (2014)
PA (Tifrit, Tizi Ouzou)	Avril 2012	40,40	13,37	-	8,30	6,41	7,18	Messara <i>et al.</i> , 2018
PA (Azzaba, Skikda)	Juin 2013	22,48	27,39	-	-	-	9,41	Boughendji oua, (2018)
Feuilles+ fleurs (Berahal, Annaba)	Fin mars	42,0	3,4	11	-	15,5	8,9	Hadeuf <i>et al.</i> , 2007
	Fin d'avril	49,9	2,5	10	-	11,7	10,1	
	Début juin	29,9	11,4	7,2	-	14,9	15,4	
	Début juillet	25,1	4,3	6,2	-	5,1	33,1	
	Fin juillet	18,2	6,5	5,4	-	4,7	41,7	

PA : parties aériennes ; TME : Thymol Méthyle Ether

L'étude de la composition chimique des HEs de *T.numidicus* Poiret en fonction de la phase de croissance a été menée antérieurement par **Hadeuf *et al* (2007)**. Leurs résultats ne sont pas totalement en accord avec celle présentés dans notre étude d'où ils ont observés une augmentation régulière de *p*-cymène et d' α -pinène, et une diminution des phénols (thymol et carvacrol) et du linalol durant la période de floraison et la fin du cycle biologique. De même, **Kaloustian *et al.*, 2005** ont déclaré des variations similaires pour *Thymus vulgaris* L. Quant à, les conclusions de **Hudaib *et al.*, 2002** sont en accord avec les notre, qu'ils ont trouvés un meilleur rendement en huile de *T. vulgaris* L. et une teneur plus élevée en composants phénoliques (thymol et carvacrol) pendant les périodes de floraison. Les mêmes constatations sont enregistrées aussi pour l'espèce *Thymus caramanicus* (**Nejad Ebrahimi *et al.*, 2008**).

Globalement, les variations en composition chimique des HEs d'une même espèce pourraient être dues aux conditions environnementales et climatologiques d'une part, et la période de cueillette de la plante d'autre part (**Hudaib *et al.*, 2002 ; Kaloustian *et al.*, 2005 ; Nejad Ebrahimi *et al.*, 2008**).

1.2. Huiles essentielles de *C.maritimum* L.

1.2.1. Aspects et rendements des HEs de *C.maritimum* L.

Les HEs obtenus par hydrodistillation à partir des parties aériennes de *C. maritimum* L. des trois stades phénologiques : stade végétative (Crt1), en floraison (Crt2) et en fructification (Crt3) sont de caractères hydrophobes, solubles dans les solvants organiques éthanol et diméthyle sulfoxyde, très odorantes, de couleurs jaune pale (Crt1) à jaune foncé (Crt3). Leurs rendements sont exprimés en pourcentage par rapport au poids initial de la matière végétale sèche (**figure 18**).

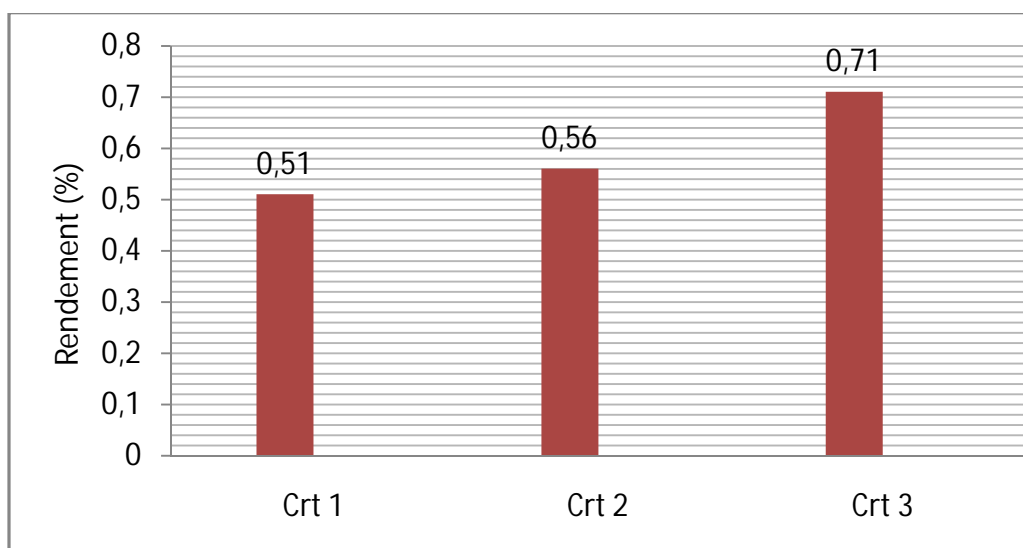


Figure 18: Rendements en HEs de l'espèce *C.maritimum* L. en fonction du stade phénologique

Les résultats représentés en **figure 18** montrent que les rendements en HEs de *C.maritimum* L. obtenus varient de 0,51 % jusqu'à 0,71 % en fonction du stade de croissance. Ainsi, l'HE en phase de fructification (Crt3) présente le rendement le plus élevé suivi par celles du stade 2 et 1 respectivement. Les récoltes pendant la phase végétative (Crt1) sont caractérisées par de faibles rendements en HEs (0,51 %) par rapport aux autres stades.

Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus antérieurement. A titre d'exemple, des rendements varient de 0,2 à 0,5 % sont obtenus pour la même espèce collectée du Portugal en fonction du stade de croissance, dont les rendement les plus élevés sont trouvés durant les stades de floraison et de fructification (**Pateira et al., 1999**). Plus récemment, **Generalic et al., (2016)** ont enregistré des rendements de l'ordre de 0,19 %, 0,55% et 2,44 % pour les tiges, feuilles et fleurs respectivement de la variété Croate (**Generalic et al., 2016**).

1.2.2. Composition chimique des huiles essentielles de *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique

Les analyses GC-MS des HEs de *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique ont révélé la présence de 79 composés représentés dans le **tableau 09**.

Tableau 09 : Composition chimique des HEs de *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique

Pic	Composé	tr (min)	Concentration relative (%)		
			Crt1	Crt2	Crt3
1	α -Pinene	3,467	-	-	1,04
2	Heptanal	4,219	-	-	0,12
3	β -Phellandrene	4,571	-	-	1,14
4	β -Myrcene	4,972	-	-	0,13
5	P-Cymene	6,477	-	-	6,22
6	γ -terpinene	6,963	-	-	0,09
7	Octanal	7,028	-	-	0,25
8	Methoxyacetic acid, 3-pentadecyl ester	7,812	-	0,69	-
9	trans-Sabinene hydrate	9,594	-	-	0,12
10	2-Undecanone	10,016	25,6	21,2	5,45
11	2-Nonanone	10,523	-	-	2,25
12	Nonanal	10,697	-	-	0,15
13	Linalool	10,936	-	-	0,59
14	2-Tetradecanol	11,025	0,57	-	-
15	2,5-Dimethylcyclohexanol	11,215	-	0,53	-
16	Methyl geranate	11,425	0,19	-	-
17	Linalool	13,156	-	-	0,36
18	2-Butyltetrahydrofuran	13,406	0,19	-	-
19	terpinen-4-ol	13,607	-	-	1,87
20	Non identifié	14,463	-	1,81	-
21	<i>m</i> -Cresol, 2-tert-butyl	14,923	-	-	2,51
22	thymyl methyl ether	15,275	-	-	19,2
23	Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-3-methyl-	15,782	-	-	1,46
24	α -Bergamotene	15,983	2,68	-	0,37
25	1,4-Dimethyl-3-tetrahydroacetophenone	16,555	2,14	1,72	0,21
26	Chrysanthenyl acetate	16,593	-	-	0,13
27	Pseudoionone	16,908	0,59	-	-
28	Non identifié	17,28	-	1	-
29	Bornyl acetate	17,643	-	-	0,23
30	Non identifié	17,917	-	1,58	-
31	Acide nonanoïque	18,011	-	-	-
32	Non identifié	18,206	-	4,36	-

33	Non identifié	19,029	-	1,4	-
34	Thymol	19,148	12,94	-	1,69
35	Carvacrol	19,886	6,41	-	-
36	Non identifié	20,612	-	2,67	-
37	Isogeraniol	20,791	0,73	-	-
38	Non identifié	21,098	-	2,56	-
39	α -Zingiberene	21,162	0,75	-	0,25
40	α -Curcumene	21,308	2,02	-	0,18
41	Non identifié	21,539	-	1,09	-
42	α-Bisabolene	21,717	4,08	-	0,53
43	2,5,8-Trimethyltetralin	22,128	0,44	-	0,12
44	α -Farnesene	22,454	0,58	-	-
45	β -Damascenone	22,983	-	-	0,15
46	α-phellandrene	23,161	6,98	-	0,88
47	<i>n</i> -Decanoic acid	0,023	-	0,39	-
48	Methyl 4,7-octadecadiynoate	23,491	0,27	-	-
49	Non identifié	24,712	-	1,63	-
50	Nonane, 3,7-dimethyl-	25,543	0,09	-	-
51	α -Ionene	25,983	0,14	-	-
52	Nerolidol	29,745	0,17	-	-
53	9-Methyl-Z-10-tetradecen-1-ol acetate	29,951	0,62	0,49	-
54	Methyl 4-tert-butyl-thiobenzoate	30,386	1,03	-	-
55	4-Decalactone	30,825	0,16	-	-
56	(-)-Globulol	31,082	5,37	-	0,41
57	(-)-Spathulenol	31,288	0,92	-	-
58	Heptane, 1,1-dicyclohexyl-	31,494	-	-	-
59	Asarone	32,027	0,37	-	-
60	α -Longipinene	33,111	0,37	-	-
61	Farnesene epoxide, E-	33,346	0,21	-	-
62	Cedrenol	33,461	0,17	-	-
63	Apiol	33,814	4,16	6,14	35,32
64	p-Menthane 1,2,3-triol	34,197	1,45	-	-
65	Aristolene epoxide	34,818	0,12	-	-
66	α -Bisabolol	35,083	0,15	-	-
67	Non identifié	35,138	-	2,74	-
68	Non identifié	37,445	-	1,38	-
69	Hexahydrofarnesyl acetone	39,468	0,49	-	-
70	Tetradecanoic acid	39,685	-	0,34	-
71	Nonadecane	40,71	0,1	-	-
72	Longipinocarveol, trans-	40,899	0,23	-	-
73	<i>n</i> -Hexadecanoic acid	43,809	0,4	-	-
74	Heptadecane	44,719	0,15	-	-

75	Falcarinol	45,265	0,73	3,59	0,23
76	Nonacosane	48,216	0,09	-	-
77	Tetracosane	48,246	-	0,68	2,83
78	exo-Norbornanol	50,281	0,21	-	-
79	Tetratriacontane	51,57	-	0,82	-
Total			92,6	94,4	95,5

Les principales classes chimiques regroupant les constituants des trois huiles essentielles de *C. maritimum* L. sont représentés en **figure 19**

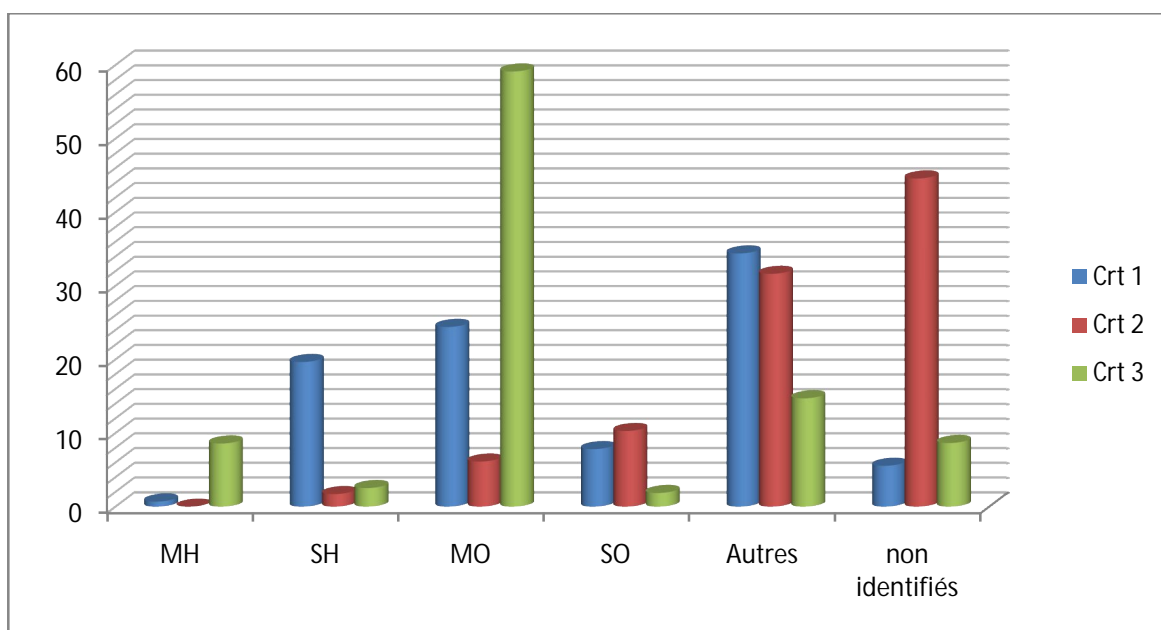


Figure 19 : Classes chimiques des HEs de *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique. (MH=Monoterpenes hydrocarbonés ; MO= Monoterpenes oxygénés; SH= Sesquiterpenes hydrocarbonés; SO= Sesquiterpenes oxygénés ; Autres = aldéhydes, cétones, alcools, esters et alcanes).

Les concentrations relatives des composés majoritaires de toutes ces huiles essentielles, ainsi que leurs structures chimiques sont consignés dans les **figures 20, 21, 22 et 23**:

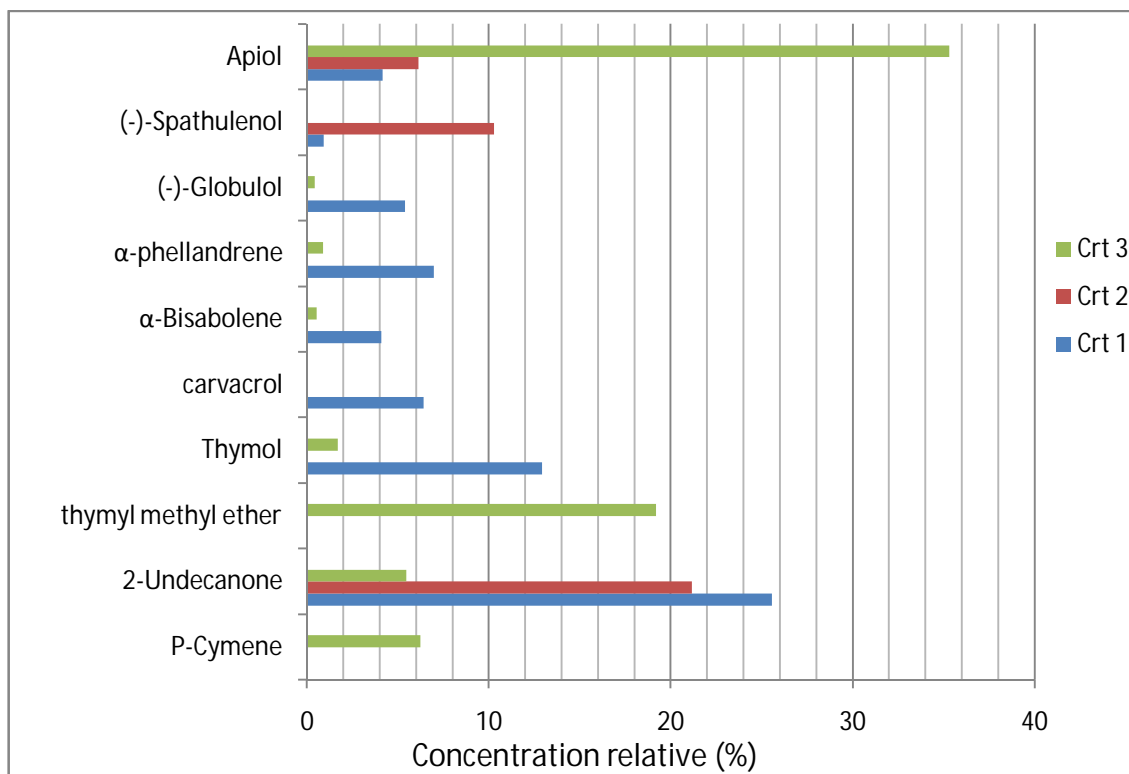


Figure 20 : Répartition des composés majoritaires des HEs de *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique

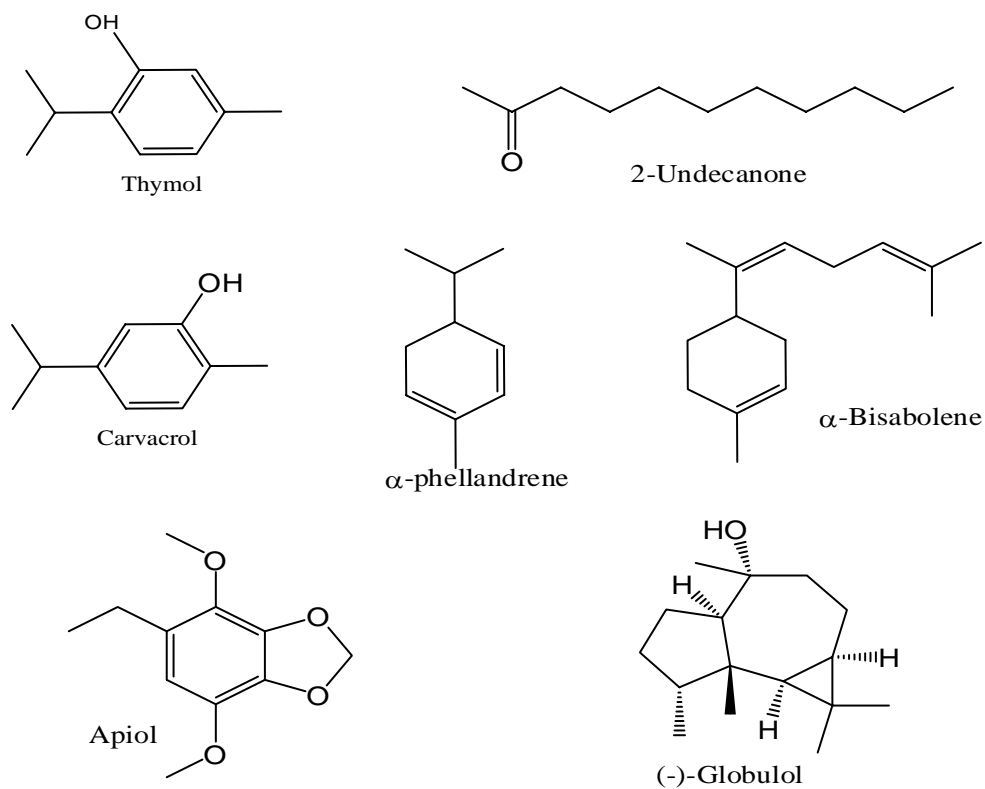


Figure 21 : Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile de *C. maritimum* L. en stade végétatif

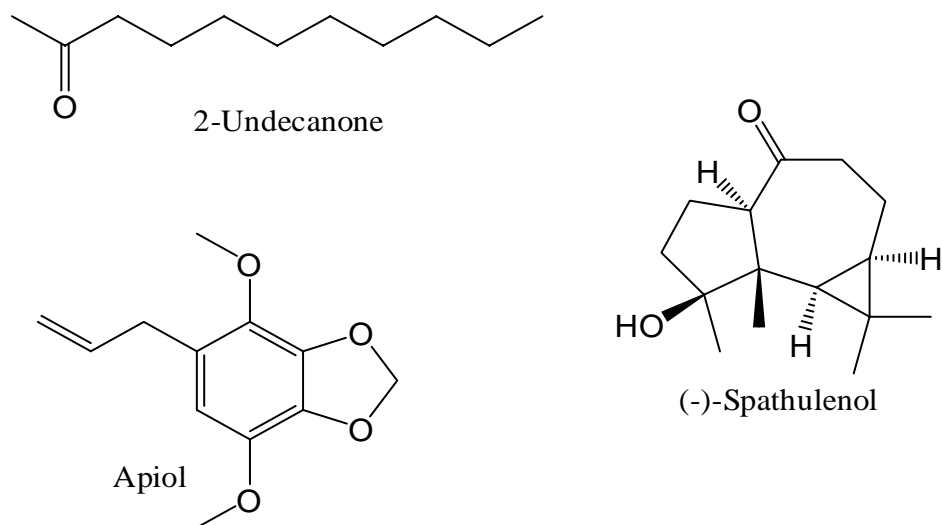


Figure 22 : Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile de *C. maritimum* L. en stade de floraison.

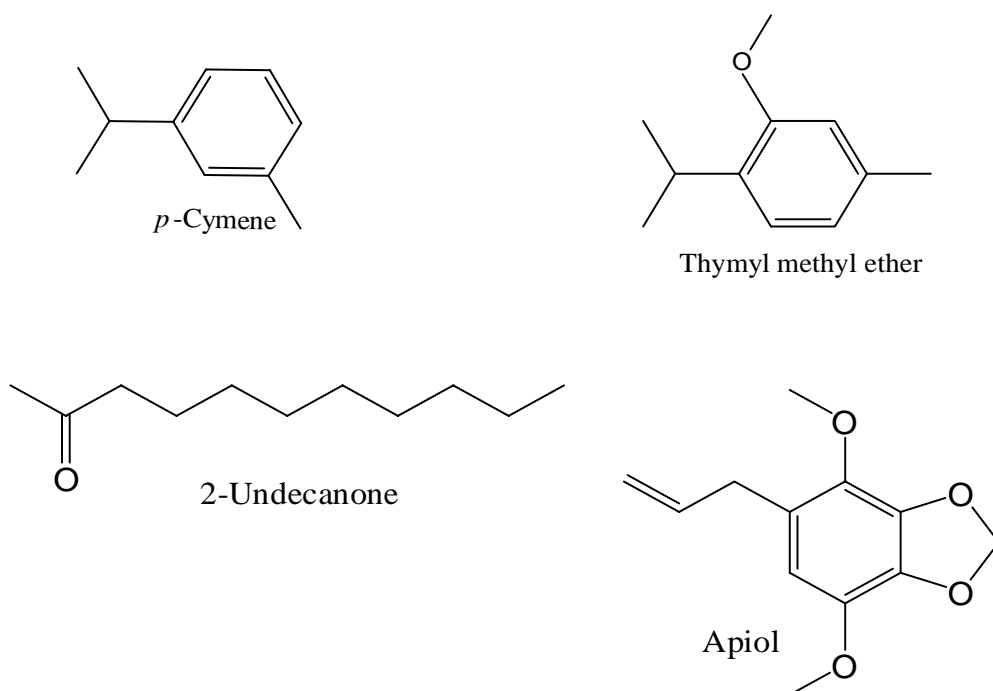


Figure 23 : Structures chimiques des composés majoritaires de l'huile de *C. maritimum* L. en stade de fructification

Les analyses chimiques des huiles essentielles de *C. maritimum* L. montre une variation en composition chimique en fonction du stade phénologique. Elles ont conduit à l'identification de 41, 22 et 32 composés, représentant 92,6%, 94,4% et 95,5% des constituants total des huiles Crt 1, Crt 2 et Crt 3 respectivement. La composition de Crt 1 est dominée par la présence des monoterpènes oxygénés (24,43%), hydrocarbures sesquiterpéniques (19,67%) et autres composés incluent les aldéhydes, cétones, alcools, esters et alcanes (34,42%). Les principaux constituants de cette huile sont : 2-Undécanone (25,57%), thymol (12,94%), carvacrol (6,41), α -Bisabolène (4,08), α -phellandrene (6,98), Globulol (5,37), Apiol (4,16).

En ce qui concerne l'huile en stade de floraison (Crt 2), presque la moitié (44,6 %) de ces constituants n'était pas identifiée. Les autres composés sont repartis entre sesquiterpènes oxygénés (10,29%), monoterpènes oxygénés (6,14) et autres (31,65%). Les composés majoritaires sont : 2-Undécanone (21,17%), Spathulenol (10,29%), Apiol (6,14%).

La composition de l'huile en stade de fructification (Crt 3) est totalement différente des deux autres stades surtout par la présence des monoterpènes oxygénés et monoterpènes hydrocarbonés en quantités proportionnellement élevées (59,14%) et (8,59%) respectivement. Contrairement, les sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés de cette huile sont trouvés avec des faibles quantités (1,87%) et (2,54%) en comparaison avec l'huile du stade végétatif. Cette huile est majoritairement constituée de l'Apiol (35,32%), thymyl méthyl éther (19,19%), *p*-Cymène (6,22%) et 2-Undécanone (5,45%). Il est intéressant de noter que les composés Apiol et 2-Undécanone sont présents en commun dans les trois essences, mais avec des proportions différentes.

Les travaux réalisés sur les HEs de *C. maritimum* L. concernait beaucoup plus l'étude de la variation de la composition chimique en fonction de différentes parties de la plante et aussi en fonction du site géographique, révélant être caractérisée par différents chemotypes, à savoir de type monoterpènes aromatiques (thymol méthyl éther / carvacrol méthyl éther), type hydrocarbures monoterpéniques (α -pinène / limonène, γ -terpinène / sabinène, sabinène / γ -terpinène / limonène, γ -terpinène / limonène, β -phellandrène / (Z)- β -ocimène / *p*-cymène, γ -terpinène / sabinène / β -phellandrène), de type phénylpropanoïdes (dillapiolène, dillapiolène / méthylchavicolène) et leurs formes intermédiaires (Pavela *et al.*, 2017).

D'après notre consultation bibliographique, une seule étude a été menée en fonction du stade phénologique (**Pateira et al., 1999**). Dans cette étude, les HEs de cinq échantillons de *C. maritimum* L., collectés de différents sites en Portugal en trois stades de développement, ont été investigués. Les principaux composants de ces huiles étaient le *p*-cymène, dillapiol, thymyl méthyl éther, sabinène et γ -terpinène. Les variations phénologiques les plus élevées observées concernaient les composants des huiles essentielles des inflorescences. Les travaux de **Jallali et al., (2014)** ont montré également la présence du γ -terpinène, thymyl méthyl éther et le dillapiol comme des principaux composants des HEs de la variété Tunisienne récoltée des deux sites : Kélibia et Monastir.

Dans une autre étude réalisée par **Houta et al., (2015)** sur les HEs de différentes parties de *C. maritimum* L. Tunisienne (tiges, feuilles, fleurs et grains), quatre composés sont majeurs: le dillapiol (2,39 à 41,35%), le thymyl méthyl éther (20,13 à 34,75%), le *p*-cymène (4,83 à 22,08%) et le γ -terpinène (22,54 à 43,29 %). Le limonène suivi par le γ -terpinène et le sabinène, étaient les principaux composés des HEs des tiges, feuilles et fleurs de la variété Croate (**Generalic et al., 2016**). Aussi, les huiles essentielles de parties aériennes et de graines de la variété de France étaient plus riches en dillapiol (55,7 et 39,9% respectivement), γ -terpinène (14,0 et 21,2% respectivement), thymol méthyl éther (11,8 et 11,1% respectivement) et en myristicine (4,4 et 12,8% respectivement). En revanche, l'HE de l'Italie était presque entièrement composée d'hydrocarbures monoterpéniques (83,3%), qui étaient principalement représentés par le limonène (38,4%), le γ -terpinène (19,9%) et le sabinène (**Pavela et al., 2017**).

Ces résultats sont plus au moins comparables avec les nôtres en ce qui concerne la présence du dillapiol qui est un énantiomère de l'apiol, le *p*-cymène et le thymyl méthyl éther. Cependant, le γ -terpinène, retrouvé en quantités importantes dans tous ces échantillons, n'a pas été figuré dans nos essences exceptant dans l'huile en stade de fructification à l'état de trace (0,09 %). En contre part, le 2-Undécanone présent dans nos trois huiles en tant que composé majoritaire n'a pas été détecté définitivement dans la composition des huiles des travaux mentionnés. Il est donc remarquable que la composition chimique des huiles essentielles de *C. maritimum* L. dépend non seulement du stade phénologique, mais aussi de l'origine de la plante.

1.3. Fractions phénoliques de *C. maritimum* L. et *S. graeca* L.

1.3.1. Rendements

La préparation des extraits à partir des parties aériennes de *C. maritimum* L. et *S. graeca* L. par la méthode d'extraction successive nous a permis d'obtenir quatre différentes fractions selon la polarité croissante et donc selon la solubilité des composés phénoliques dans les solvants organiques: extrait *n*-hexane (*n*-hex), extrait Chloroforme (CHCl₃), extrait acétate d'éthyle (AcOEt) et en dernier l'extrait *n*-butanol (*n*-but). Les rendements de chaque extrait par rapport au poids initial de la matière végétale sèche sont représentés dans les **figures 24 et 25**.

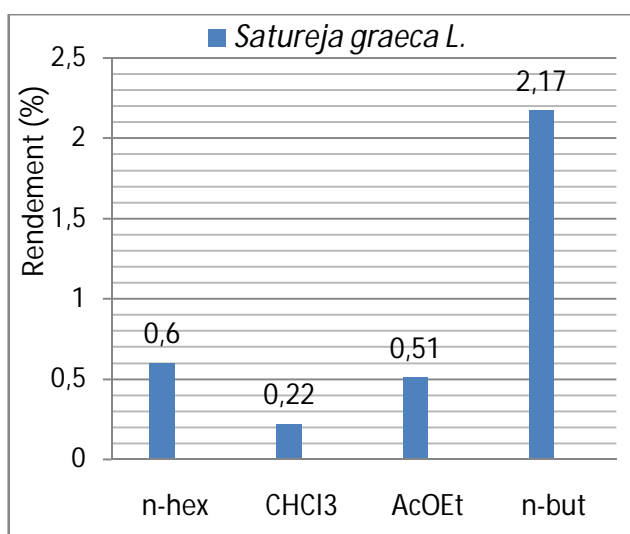


Figure 24 : Rendements des fractions de l'espèce *S. graeca* L.

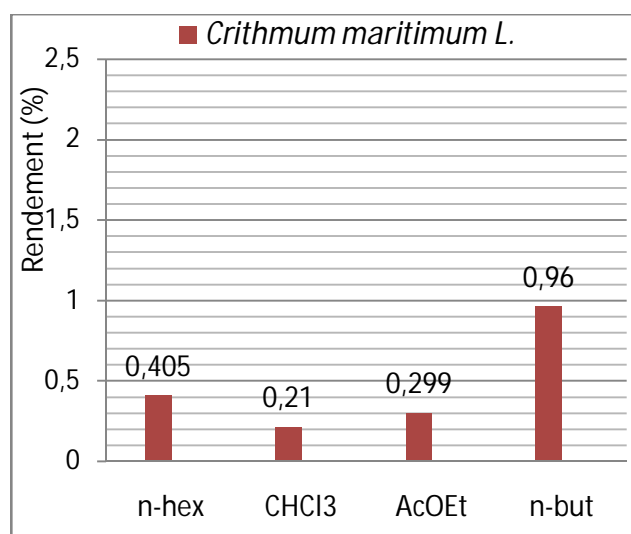


Figure 25 : Rendements des fractions de l'espèce *C. maritimum* L.

D'après les histogrammes illustrés en **figures 24 et 25**, il paraît clairement que l'extrait *n*-but a présenté le rendement le plus élevé par rapport aux autres extraits pour les deux plantes et surtout pour celui de *S. graeca* L. qui a donné le meilleur rendement de 2,17%. Le *n*-but est un solvant très polaire qui permet l'obtention des flavonoïdes hétérosidiques. L'extrait *n*-hex qui a pour but de délipidation des extraits phénoliques vient en deuxième position avec des taux de 0.6% et 0.405% pour *S. graeca* L. et *C. maritimum* L. respectivement, ceci peut être expliqué par leur contenu important en produits lipophiles, caroténoïdes et flavonoïdes aglycones méthoxylés (Markham, 1982). Les solvants moyennement polaires (AcOEt et CHCl₃) ; connus par leurs capacités à extraire les flavonoïdes mono, di et tri-glycosylés et les aglycones respectivement, ont donné les proportions les moins importantes.

1.3.2. Teneurs en Phénols Totaux et flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits AcOEt et *n*-but préparés à partir des deux plantes *S. graeca* L. et *C.maritimum* L. par des méthodes colorimétriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des phénols totaux (PT) et des flavonoïdes. La quantification de ces substances a été ciblée vue les diverses propriétés pharmacologiques qui leurs sont attribués. De ce fait, deux droites d'étalonnages ont été tracées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations. Les quantités des PT et des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en microgramme d'équivalents de l'étalon utilisé par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EE/mg d'extrait}$) et déterminés par l'équation de type : $y = a x + b$.

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de la courbe d'étalonnage des PT est l'acide gallique (AG). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,996$ (**annexe 01**).

La courbe d'étalonnage des flavonoïdes a été établie en se référant à la quercétine avec un coefficient de régression linéaire : $R^2 = 0,998$ (**annexe 02**). Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent de la quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$).

Les résultats des teneurs en PT et flavonoïdes sont représentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Teneurs en PT et flavonoïdes des fractions de *C.maritimum* L. et *S. graeca* L.

Plante	<i>C. maritimum</i> L.		<i>S. graeca</i> L.	
	AcOEt	<i>n</i> -but	AcOEt	<i>n</i> -but
Extrait				
PT ^(a)	246,96 \pm 6,527	161,57 \pm 0,479	268,38 \pm 1,907	261,59 \pm 2,845
Flavonoïdes ^(b)	48,13 \pm 0,612	31,56 \pm 0,291	20,95 \pm 0,190	37,59 \pm 0,220

(a) μg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

(b) μg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm écart type.

Une grande richesse de tous les extraits étudiés en phénols totaux a été remarquée (**tableau 10**). Pour la plante *C. maritimum* L., l'extrait AcOEt a présenté la teneur la plus élevée de l'ordre de 246,96 \pm 6,527 $\mu\text{g EAG/mg E}$ par rapport à celle de l'extrait *n*-but. Au même titre que les flavonoïdes avec un taux de 48,13 \pm 0,612 $\mu\text{g EQ/mg E}$. Des observations

pareilles sont notées pour la plante *S. graeca* L., dont une teneur élevée de l'extrait AcOEt a été enregistré de l'ordre de $268,38 \pm 1,907 \mu\text{g EAG/mg E}$ malgré qu'elle n'était pas loin à celle de l'extrait *n*-but ($261,59 \pm 2,845 \mu\text{g EAG/mg E}$). Au contraire, ce dernier était plus riche en flavonoïdes ($37,59 \pm 0,220 \text{ EQ/mg E}$) par rapport à l'extrait AcOEt ($20,95 \pm 0,190 \text{ EQ/mg d'Extrait}$).

Plusieurs études sont rapportées sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques à partir de *C. maritimum* L. de la méditerranée en se procédant aux extractions aqueuses, alcooliques ou hydro-alcooliques soit des parties aériennes ensemble ou organes séparés, aussi durant les différentes phases de croissance (Meot-Duros *et al.*, 2009; Houta *et al.*, 2011 ; Jallali *et al.*, 2014 ; Generalic Mekinic *et al.*, 2016 Nabet *et al.* 2017 ; Generalic Mekinic *et al.* 2018 et Alemán *et al.*, 2019). Leurs résultats sont regroupés dans le **tableau 11**, sachant qu'ils ont procédé aux mêmes méthodes de dosage des PT et flavonoïdes (Folin Ciocalteu et Chlorure d'aluminium respectivement).

Tableau 11: Travaux antérieurs sur les composés phénoliques de l'espèce *C. maritimum* L.

Partie de la plante (Origine)	Solvant d'extraction	R (%)	Phénols totaux (mg EAG/g E)	flavonoïdes (mg EQ/g E)	Référence	
Feuilles+ tiges (Espagne)	EtOH 70%	31	$109,00 \pm 1,48$	nd	Alemán <i>et al.</i> , 2019	
	Eau distillée	35,5	$75,95 \pm 3,97$	nd		
Parties aériennes (Croatia)	EtOH 80%	nd	20,92	1,23	Generalic Mekinić <i>et al.</i> , 2018	
Parties aériennes (Béjaia, Algérie)	MeOH 80%	nd	$47,1 \pm 0,1$	$17,00 \pm 0,7$	Nabet <i>et al.</i> , 2016	
feuilles	(Croatia)	EtOH 80%	nd	$35,1 \pm 0,2$	nd	Generalic Mekinić <i>et al.</i> , 2016
fleurs			nd	$32,6 \pm 1,0$	nd	
tiges			nd	$7,6 \pm 0,2$	nd	
Parties aériennes	(Kélibia, Tunisie)	Acetone 80%	nd	7,9	4,1	Jallali <i>et al.</i> , 2014
	(Monastir, Tunisie)		nd	6,1		
feuilles	(Tunisie)	MeOH	nd	$11,52 \pm 0,06$	$3,93 \pm 0,1$	Houta <i>et al.</i> , 2011
fleurs			nd	$9,426 \pm 0,42$	$3,71 \pm 0,10$	
tiges			nd	$13,73 \pm 0,41$	$4,92 \pm 0,3$	
grains			nd	$17,11 \pm 0,77$	$7,06 \pm 0,18$	
Parties aériennes (France)	MeOH 50%	45	33	nd	Meot-Duros and Magne, 2009	

nd : non déterminée ; R (%) : rendement en pourcentage

Toutes ces études sont réalisées sur des extraits bruts hydroalcooliques, alcooliques ou aqueux. Ils ont trouvés des rendements d'extraction trop élevés, par contre des teneurs très basses en PT et flavonoïdes sont enregistrés. De manière générale, les résultats obtenus par ces auteurs que se soit des rendements ou des teneurs en PT et flavonoïdes sont loin d'être comparés avec celles de la présente étude car nos extraits sont déjà des fractions obtenus à partir des extraits bruts hydroalcooliques.

De même, pour le genre *Satureja*, dont les résultats des teneurs se varient d'une espèce à l'autre, selon la nature du solvant, la méthode et les conditions de l'extraction (Cetkovic *et al.*, 2007 ; Bougandoura et Bendimerad 2013 ; Ghotbabadi *et al.*, 2012 ; Hajimehdipoor *et al.*, 2014 ; Abd ElTawab *et al.*, 2014 ; Zeljković *et al.*, 2015 ; López-Cobo *et al.*, 2015 ; Alizadeh, 2015 ; Alizadeh, 2017 ; Veličković *et al.*, 2018), d'où aucune étude n'a été réalisée sur l'espèce *S. graeca* L. selon la bibliographie consultée actuellement. Le **tableau 12** montre les résultats de quelques travaux les plus récents sur les espèces du genre *Satureja*.

Tableau 12 : Travaux antérieurs sur les composés phénoliques du genre *Satureja*

Espèce (origine)	Solvant d'extraction	R (%)	Phénols totaux (mg EAG/g E)	flavonoïdes (mg EQ/g E)	Référence
<i>S. montana</i> (Serbie)	MeOH	nd	98,07 ± 0,48	20,80 ± 0,40	Veličković <i>et al.</i> , 2018
<i>S. bachtiarica</i> (Iran)	MeOH	nd	44,45 ± 1,25	nd	Alizadeh, 2017
<i>S. khuzistanica</i> (Iran)		nd	48,44 ± 1,23	nd	
<i>S. rechingeri</i> (Iran)	MeOH 90%	nd	37,48±0,58	nd	Alizadeh, 2015
<i>S. montana subsp. Kitaibelii</i> (Serbie)	MeOH 80%	nd	25,82 ± 3,14	nd	López-Cobo <i>et al.</i> , 2015
<i>S. Montana</i> L. (Croatie)	CHCl ₃	nd	212,706±6,928	15,00 ± 0,00	Zeljkočić <i>et al.</i> , 2015
	MeOH	nd	614,777±3,297	75,618±3,519	
<i>S. montana</i> L. (Egypt)	EtOH 80%	nd	10,30	3,40	Abd ElTawab <i>et al.</i> , 2014
<i>S. sahendica</i> (Azerbaïdjan)	MeOH 50%	nd	33,2±0,6	nd	Hajimehdipoor <i>et al.</i> , 2014
<i>S. calamintha</i> (Tlemcen, Algérie)	MeOH	8,58	2,968±0,809	1,280±0,077	Bougandoura et Bendimerad 2013
	Eau	22,19	12,6±0,775	3,131±0,154	
<i>S. sahendica</i> Bornm. (Iran)	MeOH 90%	nd	24,78±0,19	nd	Ghotbabadi <i>et al.</i> , 2012

nd : non déterminée

1.3.3. Identification des composés phénoliques

1.3.3.1. Fractions de *C.maritimum* L.

Les résultats d'analyse HPLC-DAD des extraits AcOEt et *n*-but de l'espèce *C. maritimum* L. sont présentés dans les **tableaux 13**. Les taux inférieurs à 0,01 µg/g ne sont pas figurés.

Tableau 13 : Analyse HPLC-DAD des fractions AcOEt et *n*-but de *C.maritimum* L.

N°	Composé	tr (min)	Concentration (µg/g)	
			Crt AcOEt	Crt <i>n</i> -but
1	Acide protocatechuique	6,87	1,47	nd
2	Acide 4-hydroxybenzoïque	8,01	0,86	nd
3	Methyl 1,4 benzoquinone,	9,65	nd	0,68
4	6,7 dihydroxy coumarine	11,62	nd	0,23
5	Acide vanillique	12,30	1,50	nd
6	Acide caffeique	13,13	4,13	nd
7	Vanilline	14,89	0,36	6,04
8	Acide 2,4-dihydroxybenzoïque	15,54	nd	nd
9	Acide chlorogénique	17,05	27,06	120,69
10	Acide <i>p</i> -coumarique	18,74	7,10	nd
11	Acide ferulique	19,76	0,42	2,58
12	Coumarine	20,96	nd	nd
13	ac <i>trans</i> -2-hydroxycinnamique	21,98	1,67	5,76
14	Rutine	22,01	40,32	30,44
15	Acide ellagique	22,54	nd	3,01
16	Acide <i>trans</i> -cinnamique	24,52	nd	0,01
17	Quercétine	26,35	5,23	nd

nd : non déterminé

Les profils chromatographiques obtenus par ces fractions sont montrés dans les **figures 26 et 27**.

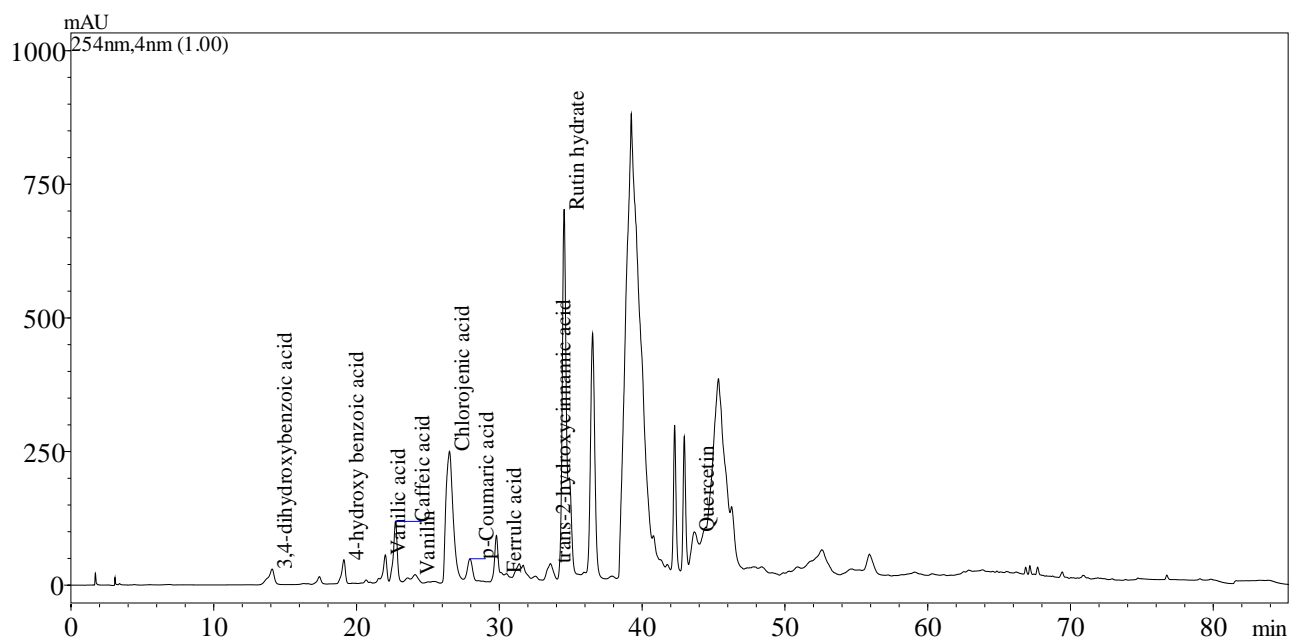


Figure 26: Chromatogramme de la fraction AcOEt de *C. maritimum* L. à 254 nm.

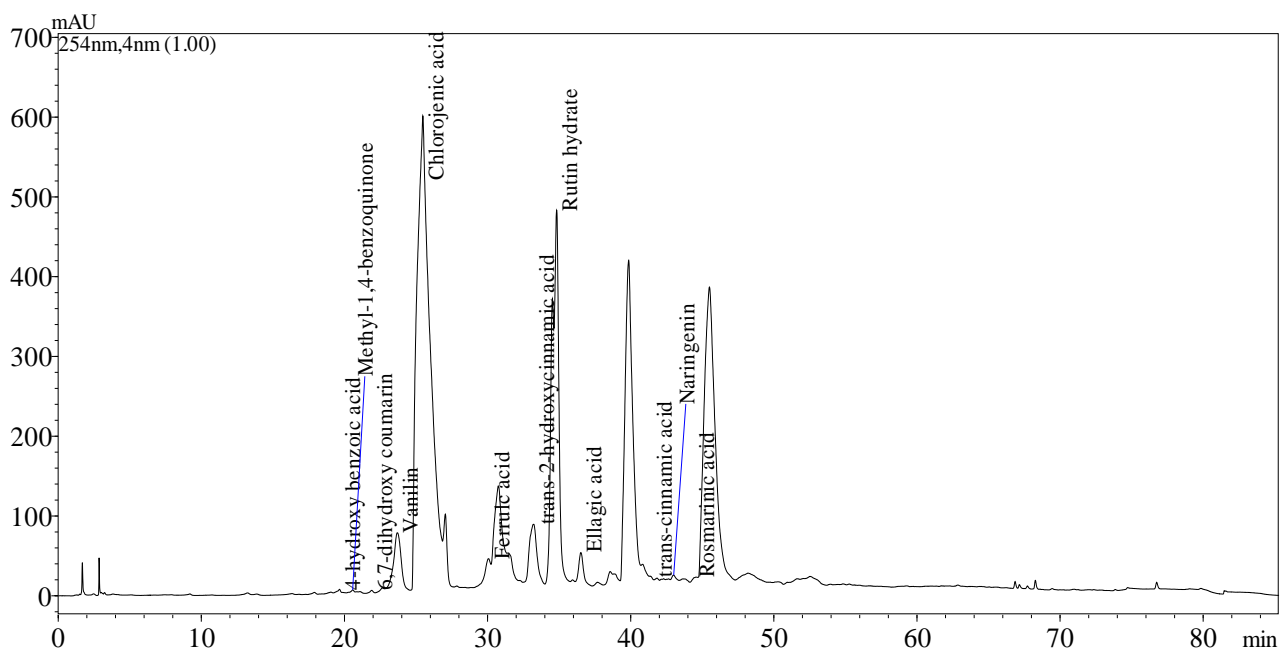


Figure 27: Chromatogramme de la fraction *n*-but de *C. maritimum* L. à 254 nm.

Les structures chimiques des composés dominants dans ces deux fractions sont représentées dans les **figures 28 et 29**.

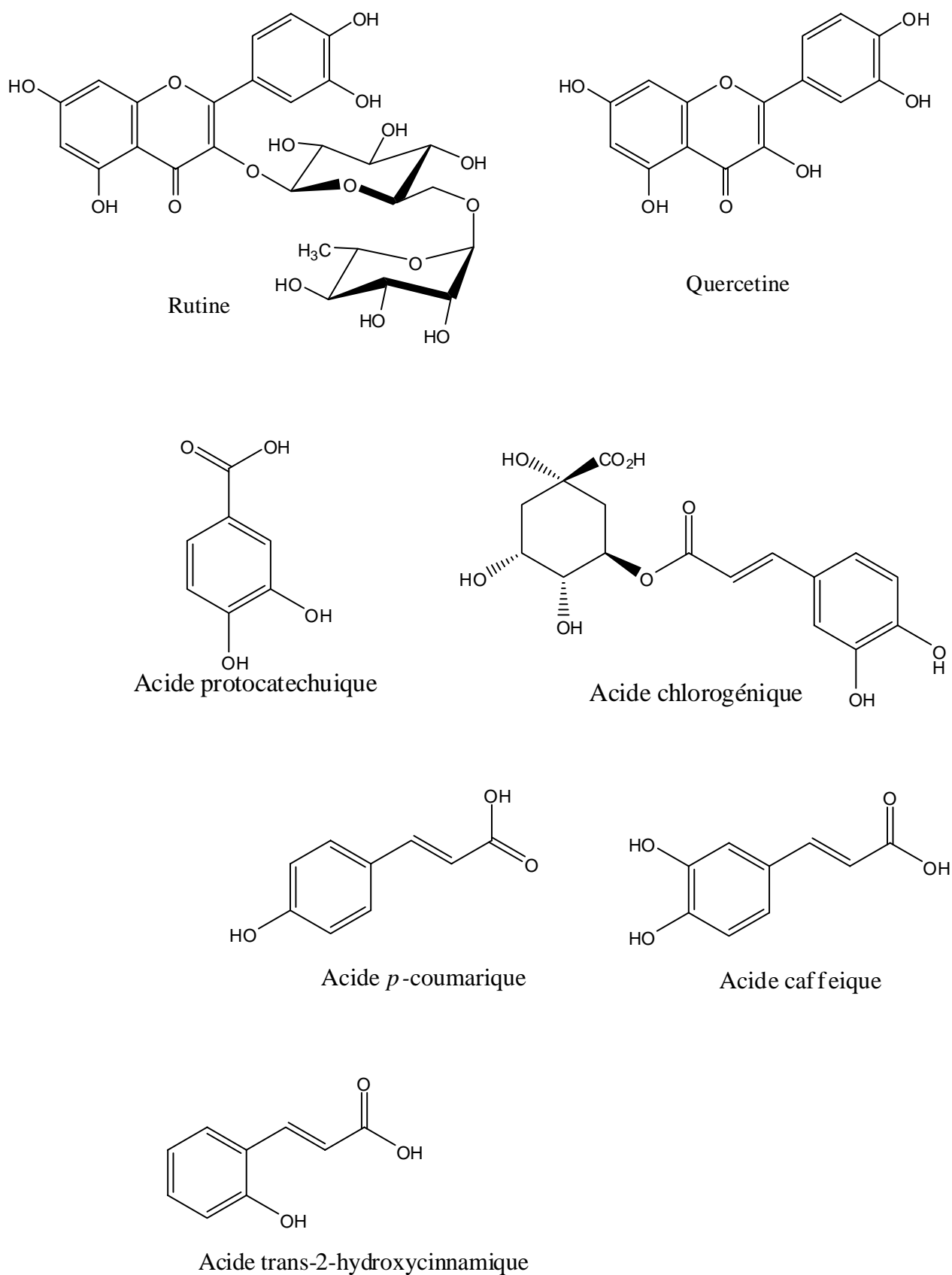


Figure 28 : Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction AcOEt de *C.maritimum* L.

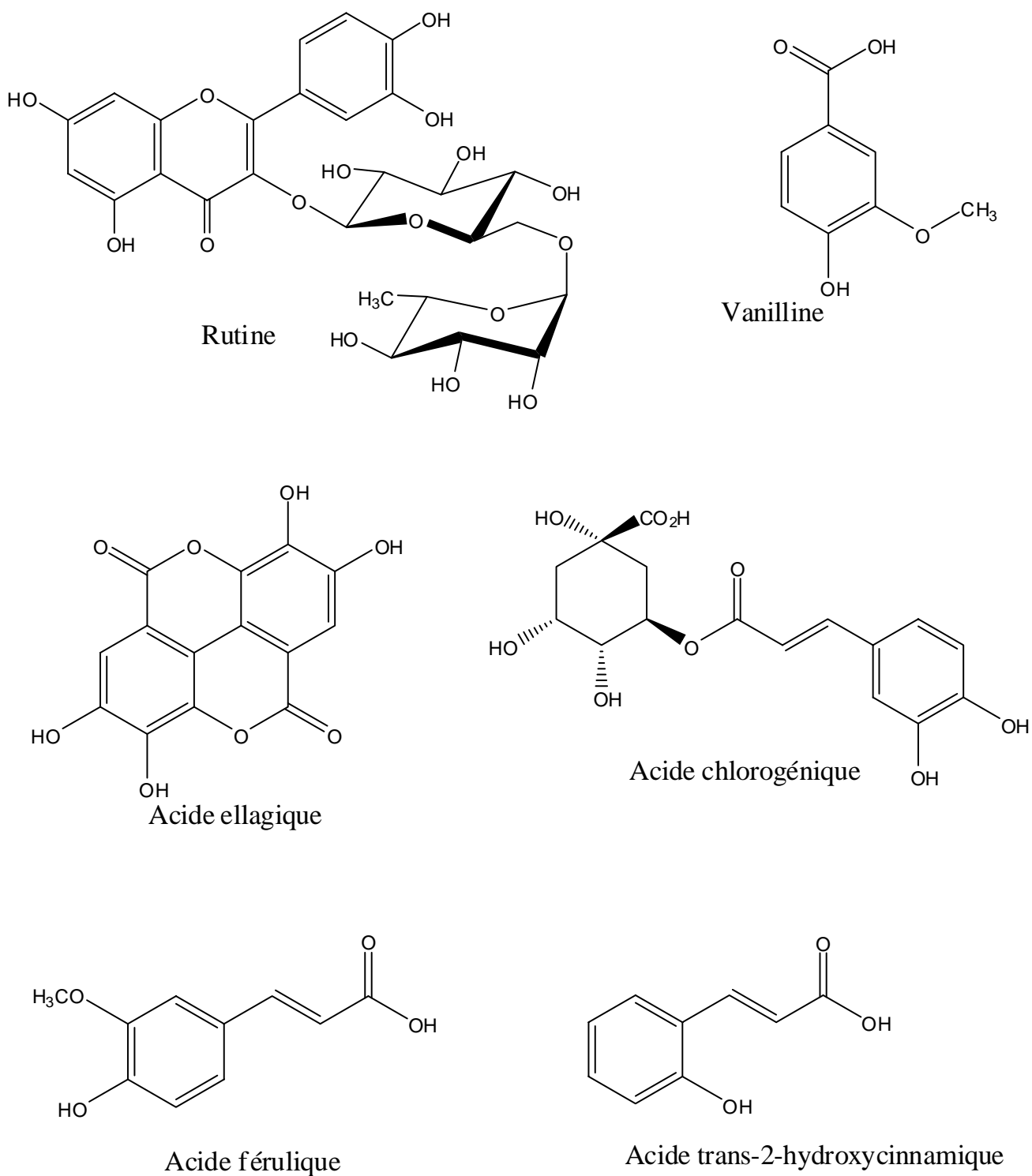


Figure 29 : Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction *n*-but de *C.maritimum* L.

L'analyse des chromatogrammes obtenus par *C. maritimum* L. (**figures 26 et 27**) montre la richesse des fractions AcOEt et *n*-but de cette plante en composés phénoliques. Parmi plus de 20 pics enregistrés sur le profil chromatographique de la fraction AcOEt, onze composés sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des différents standards. Il s'agit de deux flavonoïdes de type flavonols : la rutine (40,32 µg/g) qui représente le composé majoritaire parmi ceux identifiés et la quercétine (5,23 µg/g) et neuf acides phénoliques repartis en dérivés de l'acide cinnamique : ac chlorogénique (27,06 µg/g), ac *p*-coumarique (7,10 µg/g), ac caffeique (4,13 µg/g), ac *trans*-2-hydroxycinnamique (1,67 µg/g) et ac ferrulique (0,42 µg/g) et dérivés de l'acide hydroxybenzoïque : ac vanillique (1,50 µg/g), ac protocatechique (1,47 µg/g), ac 4-hydroxybenzoïque (0,86 µg/g) et Vanilline (0,36 µg/g). D'autre part, le chromatogramme de la fraction *n*-but de cette plante a permis d'identifier neuf composés sur vingt deux pics détectés incluant les acides phénoliques, flavonoïdes et coumarines. Le composé majeur détecté dans cet extrait était l'acide chlorogénique (120,69 µg/g), suivi par la rutine (30,44 µg/g), vanilline (6,04 µg/g), ac *trans*-2- hydroxycinnamique (5,76 µg/g), ac éllagique (3,01µg/g) et ac ferulique (2,58 µg/g). En outre, certains composés tels que le 6,7 dihydroxycoumarine, méthyl-1,4 benzoquinone et l'acide *trans*-cinnamique sont également détectés sous forme de traces.

Les résultats présentés étaient conformes à ceux décrits précédemment par plusieurs auteurs. Ils ont tous constatés que l'acide chlorogénique était prédominant dans tous les extraits testés de la plante *C. maritimum* L. A titre d'exemple, **Nabet *et al.*, (2016)** ont trouvés une concentration de 6366 µg/g d'extrait hydromethanolique des parties aériennes de cette plante récoltée de la région de Bejaia. Dans une étude réalisée par **Generalic Mekinic *et al.*, (2016)** sur des organes séparés de la variété Croate, la concentration de l'ac chlorogénique dans les fleurs, tiges et feuilles a été estimée à 7700 ; 700 et 8100 µg/g d'extrait respectivement. **Pereira *et al.* (2017)** ont également signalé la prédominance de l'ac chlorogénique dans les infusions et les décoctions des feuilles et tiges de *C. maritimum* L. du Portugal. Plus récemment, **Generalic Mekinic *et al.*, (2018)**, ont signalé une quantité de $5646,5 \pm 110,2$ µg / g d'extrait éthanolique des parties aériennes de la variété Croate.

L'acide chlorogénique, bien qu'il ne soit pas officiellement désigné comme marqueur chimiotaxonomique de la famille des Apiacées, sa présence en quantité relativement élevée dans les espèces appartenant à cette famille botanique a été largement décrite dans la littérature (**Pandey *et al.*, 2012; Upadhyay et Mohan Rao, 2013**).

1.3.3.2. Fractions de *S. graeca* L.

Les résultats d'analyse HPLC-DAD des fractions AcOEt et *n*-but de *S. graeca* L. sont présentés dans le **tableau 14**. Les taux inférieurs à 0,01µg/g ne sont pas figurés.

Tableau 14 : Analyse HPLC-DAD des fractions AcOEt et *n*-but de *S. graeca* L.

N°	Composé	tr (min)	Concentration (µg/g)	
			Sat AcOEt	Sat <i>n</i> -but
1	Acide protocatechuique	6,87	0,83	nd
2	Acide 4-hydroxybenzoïque	8,01	0,19	nd
3	Methyl 1,4 benzoquinone,	9,65	nd	nd
4	6,7 dihydroxy coumarine	11,62	nd	nd
5	Acide vanillique	12,30	nd	nd
6	Acide caffeique	13,13	1,36	nd
7	Vanilline	14,89	1,30	nd
8	Acide 2,4-dihydroxybenzoïque	15,54	nd	0,32
9	Acide chlorogénique	17,05	4,77	41,11
10	Acide <i>p</i> -coumarique	18,74	nd	0,21
11	Acide ferulique	19,76	nd	0,12
12	Coumarine	20,96	nd	0,27
13	<i>ac trans</i> -2-hydroxycinnamique	21,98	nd	nd
14	Rutine	22,01	nd	41,63
15	Acide ellagique	22,54	nd	3,27
16	Acide <i>trans</i> -cinnamique	24,52	nd	0,16
17	Quercétine	26,35	nd	0,16

nd : non déterminé

Les profils chromatographiques obtenus par ces fractions sont montrés dans les **figures 30 et 31**.

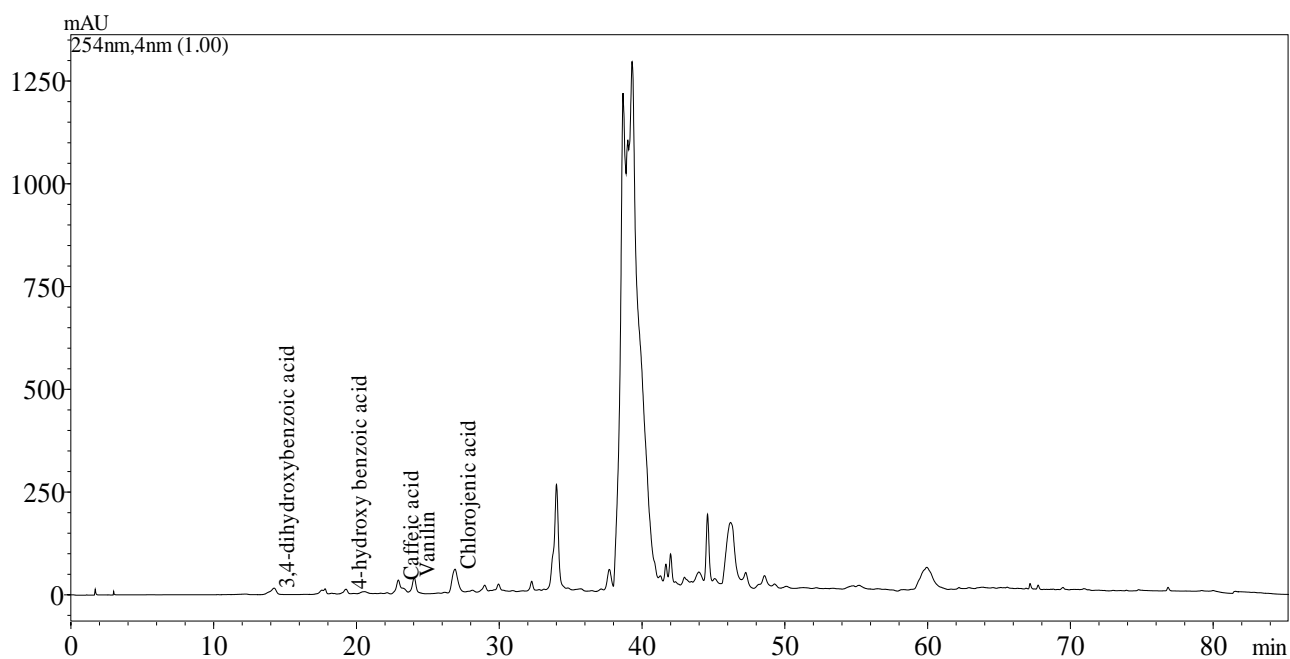


Figure 30: Chromatogramme de la fraction AcOEt de *S. graeca* L. à 254 nm.

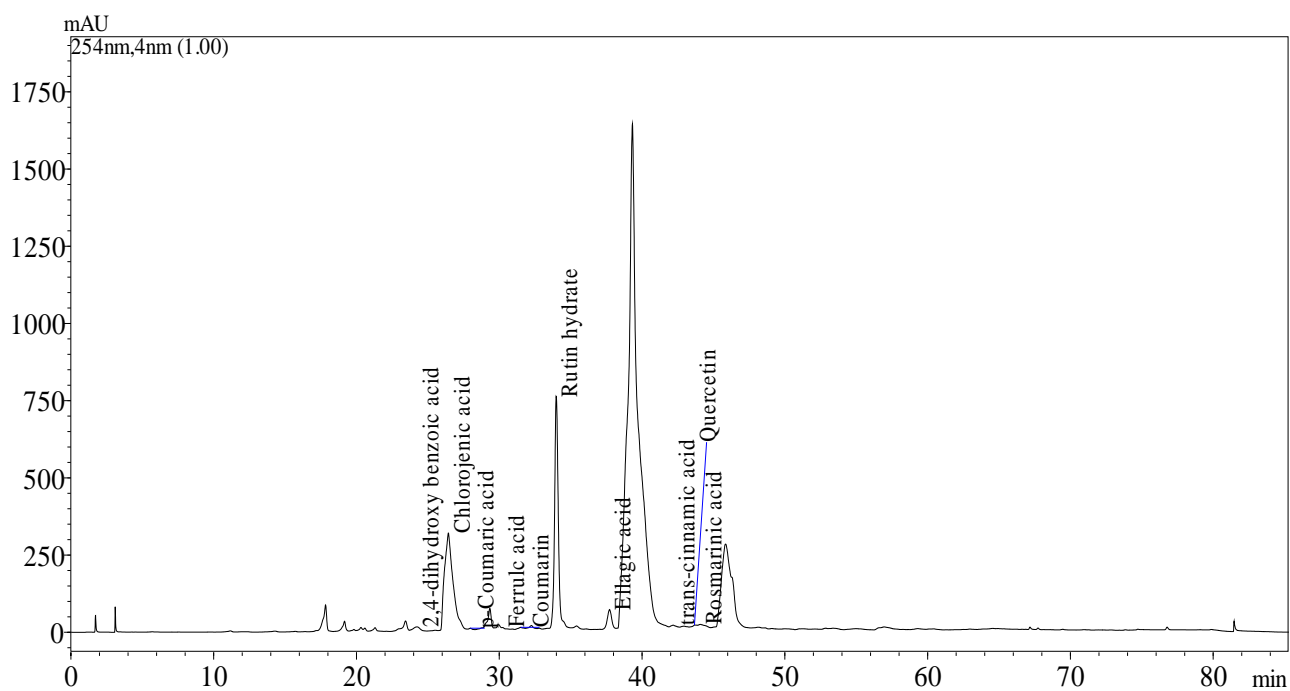


Figure 31: Chromatogramme de la fraction *n*-but de *S. graeca* L. à 254 nm.

Les structures chimiques des principaux composés dominants dans ces fractions sont représentés dans les **figures 32 et 33**.

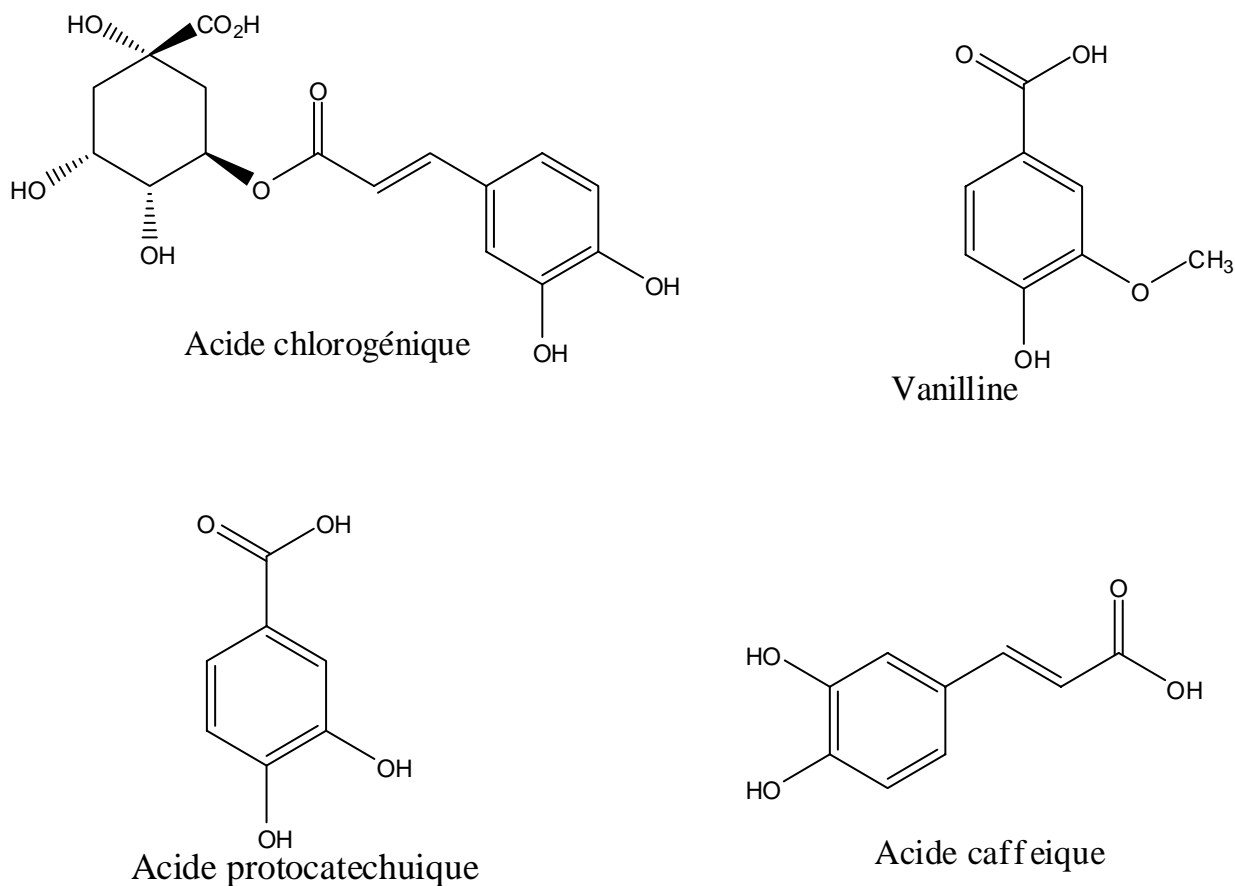


Figure 32 : Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction AcOEt de *S. graeca* L.

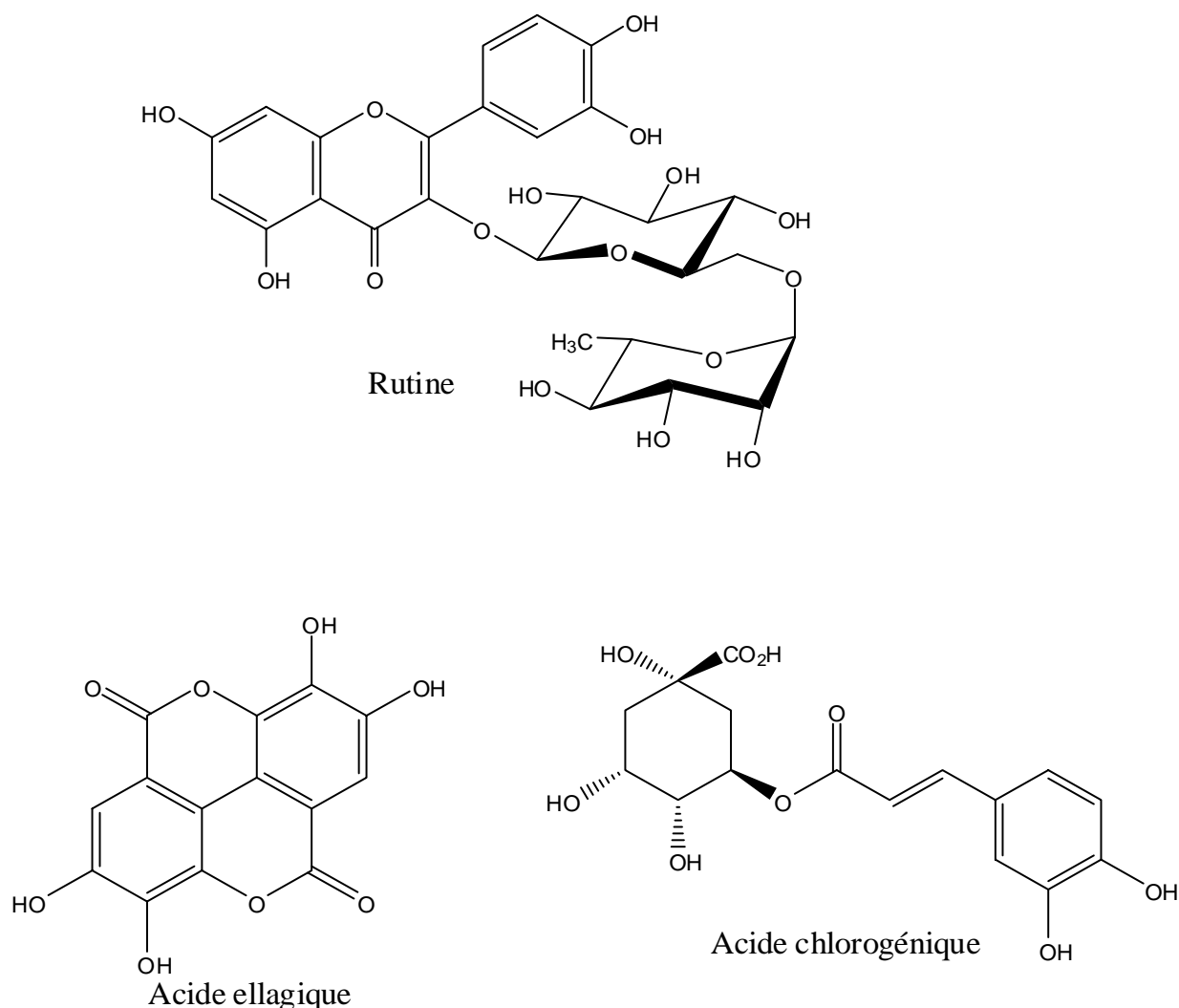


Figure 33 : Structures des principaux composés phénoliques détectés dans la fraction *n*-but de *S. graeca* L.

En ce qui concerne la plante *S. graeca* L., le chromatogramme de la fraction AcOEt (**figure 30**) n'a permis d'identifier que cinq composés minoritaires : ac chlorogénique (4,77 $\mu\text{g/g}$), ac caffeique (1,36 $\mu\text{g/g}$), vanilline (1,30 $\mu\text{g/g}$), ac protocatechique (0,83 $\mu\text{g/g}$) et ac 4-hydroxybenzoïque (0,19 $\mu\text{g/g}$). La majorité des pics détectés ne sont pas identifiés en raison d'absence des standards qui leurs conviennent. Pour la fraction *n*-but (**figure 31**), neuf composés sont identifiés : Rutine (41,63 $\mu\text{g/g}$), ac chlorogénique (41,11 $\mu\text{g/g}$), ac ellagique (3,27 $\mu\text{g/g}$), ac 2,4-dihydroxybenzoïque (0,32 $\mu\text{g/g}$), Coumarine (0,27 $\mu\text{g/g}$), ac *p*-coumarique (0,21 $\mu\text{g/g}$), ac ferrulique (0,12 $\mu\text{g/g}$), ac *trans*-cinnamique (0,16 $\mu\text{g/g}$) et Quercetine (0,16 $\mu\text{g/g}$).

De nombreuses études ont démontrés que les composés phénoliques ont été couramment rapportés chez des espèces de *Satureja*. Par exemple, l'ac protocatechique, ac *p*-coumarique, ac ferrulique et ac caffeique ont été détectés dans les extraits AcOEt et *n*-but de *S. montana* L. qui sont analysés qualitativement par HPLC-DAD (Cetkovic *et al.*, 2007), ainsi que dans l'extrait méthanolique de *S. montana subsp. Kitaibelii* (Serbie) (López-Cobo *et al.*, 2015). De même, Abd ElTawab *et al.*, (2014) ont également signalés la présence de ces acides phénoliques dans la variété de l'Egypte, en plus d'un flavonoïde majoritaire ; la rutine ($1136,24 \pm 27,00 \mu\text{g/g}$). L'analyse HPLC de l'extrait éthanolique de *S. hortensis* (Géorgie) a confirmé la présence de plusieurs acides phénoliques (ac caféique et *p*-coumarique), de flavonoïdes aglycones (catéchine, épicatechine, lutéoline et apigénine) et glycosidiques (rutine, hespéridine, 7-glucoside) (Chkhikvishvili *et al.*, 2013). De plus, les principaux composés présents dans l'extrait méthanolique de *S. hortensis* (Serbie) ont été identifiés comme étant des acides phénoliques tels que l'ac caféique ($1285,42 \pm 11,52 \mu\text{g/g}$), ac rosmarinique ($24900,67 \pm 127,35 \mu\text{g/g}$) et flavonoïdes tels que le naringénine ($1061,75 \pm 6,85 \mu\text{g/g}$). D'autres composés phénoliques, tels que l'acide chlorogénique, ac *p*-coumarique et ac isoférrulique, ont été identifiés en moindre quantité (Boroja *et al.*, 2018).

Les acides phénoliques : caféique, *p*-coumarique, vanillique, férulique et protocatechique sont des composés présents dans presque toutes les plantes (Stalikas, 2007).

2. Activités biologiques

2.1. Activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante. La complexité chimique des extraits, souvent un mélange de dizaines de composés de groupes fonctionnels, de polarité et de comportement chimique différents, pourrait conduire à des résultats dispersés en fonction du test utilisé. Par conséquent, une approche avec plusieurs tests pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus utile et même nécessaire (**Ozturk, 2012**). Dans cette étude, six méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des huiles essentielles (HEs) de *T. numidicus* Poiret. et de *C. maritimum* L. ainsi que les fractions acétate d'éthyle (AcOEt) et *n*-butanol (*n*-but) de *C. maritimum* L. et *S. graeca* L. en basant sur différents mécanismes d'action à savoir les propriétés de piégeage des radicaux libres (DPPH[•], ABTS^{•+} and O₂^{•-}), capacité de prévention de la peroxydation lipidique (β -carotène) et capacité à réduire les ions cuivriques et ferriques (CUPRAC et PR).

Les résultats sont représentés en pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que des valeurs de la concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres (CI₅₀) pour les tests : DPPH, ABTS, O₂^{•-} et β -Carotene, et valeurs d'A_{0,5} qui correspondent aux concentrations indiquant 0,500 d'absorbance pour les tests : CUPRAC et pouvoir réducteur (**Figures 34, 35 et 36 ; tableaux 15, 16, 17 et 18**). Sachant que les valeurs CI₅₀ et A_{0,5} sont calculés graphiquement à partir des droites de régression et sont exprimés en $\mu\text{g/mL}$. Des valeurs CI₅₀ et A_{0,5} basses indiquent une activité plus élevée.

2.1.1. HEs de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

La variation de l'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations des HEs par rapport aux antioxydants standards est illustrée en **figure 34** et **tableau 15**.

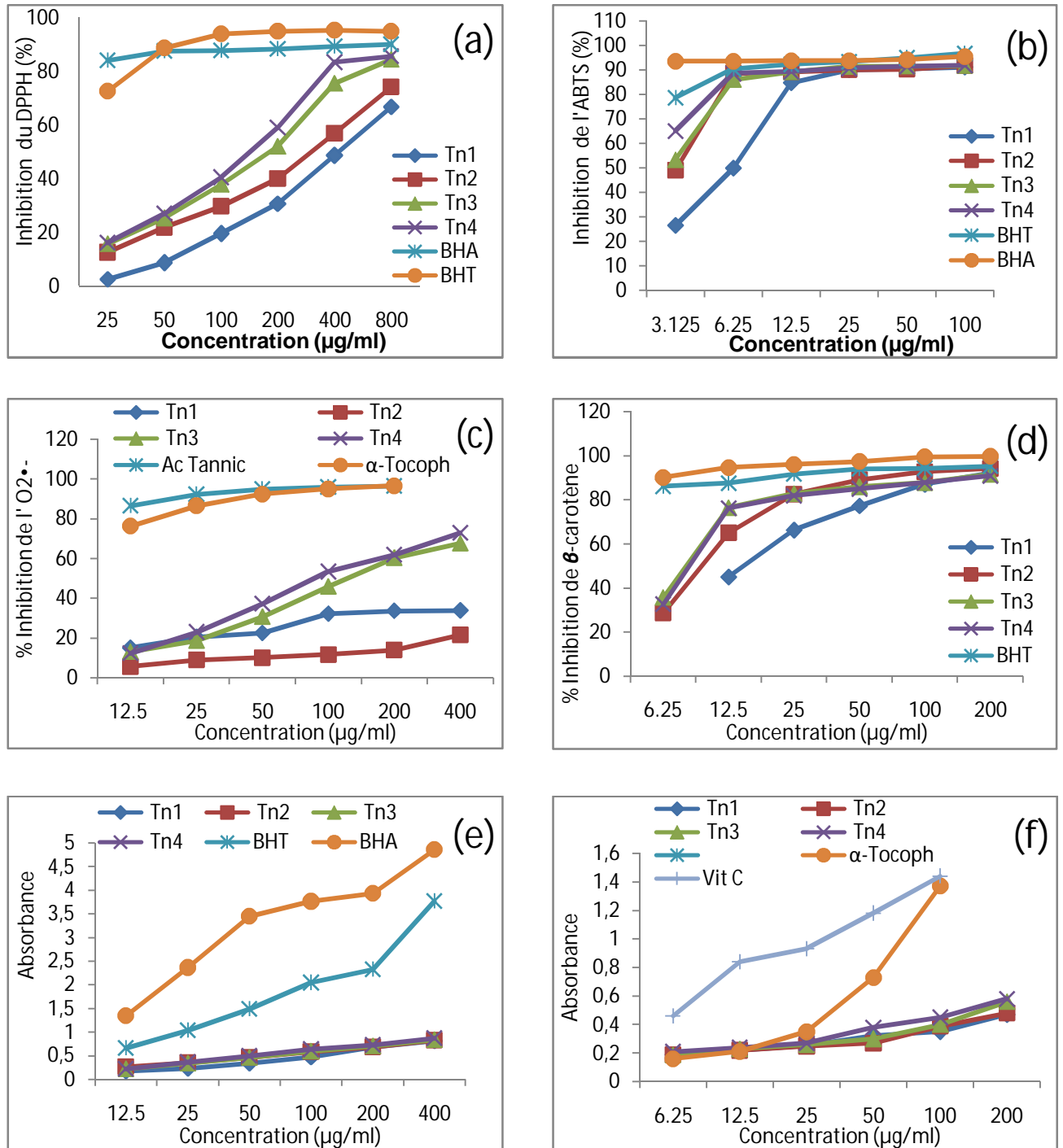


Figure 34 : Activité antioxydante; piégeage du DPPH[•] (a), piégeage de l'ABTS^{•+} (b), piégeage de l'O₂•⁻ (c), blanchissement du β-carotène (d), CUPRAC (e) et pouvoir réducteur (f) des HEs de *T. numidicus* Poiret.

Tableau 15 : Valeurs de CI_{50} et $A_{0,50}$ obtenus par les HEs de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				$A_{0,50}$ ($\mu\text{g/mL}$)	
	DPPH	ABTS	β -carotène	$O_2^{\cdot-}$	CUPRAC	PR
Tn 1	430,04 \pm 3,03	6,54 \pm 0,16	15,39 \pm 1,41	> 800	118,17 \pm 2,97	> 200
Tn 2	314,20 \pm 4,48	3,30 \pm 0,03	10,84 \pm 0,80	> 800	82,67 \pm 1,14	> 200
Tn 3	182,54 \pm 2,64	2,92 \pm 0,07	8,23 \pm 0,32	127,94 \pm 8,04	73,67 \pm 1,53	192,84 \pm 2,01
Tn 4	150,89 \pm 2,37	2,30 \pm 0,11	8,63 \pm 0,23	91,73 \pm 1,84	47,33 \pm 2,08	184,33 \pm 3,06
BHA^a	5,73 \pm 0,41	1,81 \pm 0,10	0,90 \pm 0,02	nt	3,64 \pm 0,19	nt
BHT^b	12,99 \pm 0,41	1,29 \pm 0,30	1,05 \pm 0,01	nt	9,62 \pm 0,87	nt
Ac tan^c	nt	nt	nt	1,68 \pm 0,06	nt	5,39 \pm 0,91
α-Toco^d	nt	nt	nt	3,19 \pm 0,40	nt	34,93 \pm 2,38
Vit C^e	nt	nt	nt	nt	nt	6,77 \pm 1,15

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm écart type.
- nt = non testée ; Ac tan= acide tannique ; α -toco= α -tocophérol
- (a,b,c,d,e) : Antioxydants standards

Les profils de l'activité antioxydante obtenus révèlent que toutes les HEs testées possèdent une activité dose-dépendante. Basant sur les valeurs de CI_{50} et $A_{0,5}$, la meilleure activité a été enregistrée par l'huile Tn4 suivi par Tn3, Tn2 et en dernier le Tn1 avec tous les tests. L'HE de la phase Tn4, malgré qu'elle soit la plus puissante par rapport aux autres phases, elle restait moins importante et loin d'être comparée avec les antioxydants standards pour les tests DPPH (150,89 \pm 2,37 $\mu\text{g/mL}$), $O_2^{\cdot-}$ (91,73 \pm 1,84 $\mu\text{g/mL}$), CUPRAC (47,33 \pm 2,08 $\mu\text{g/mL}$) et PR (184,33 \pm 3,06 $\mu\text{g/mL}$). Ceci peut être expliqué par le fait que les potentiels réducteurs des HEs sont strictement liés aux polarités de leurs constituants (terpénoïdes) (Tepe *et al.*, 2011).

Cependant, une activité intéressante a été remarquée par toutes ces HEs avec les tests ABTS et β -carotène, en enregistrant des valeurs de CI_{50} proches de celle des standards surtout par Tn4, de l'ordre de 2,30 \pm 0,11 $\mu\text{g/mL}$ et 8,63 \pm 0,23 $\mu\text{g/mL}$ respectivement (tableau 15). Comme clairement indiqué par Lucarini *et al.*, (1999) et Tepe *et al.*, (2011), la capacité de piégeage des radicaux libres est directement liée à la capacité d'un composé à donner un atome d'hydrogène et n'est pas corrélée seulement aux potentiels rédox

Très peu d'études sont rapportées sur l'activité antioxydante des HEs de *T.numidicus* Poiret. (Zeghib *et al.*, 2013 ; Zellagui *et al.*, 2014 ; Adrar *et al.*, 2016). Cependant, d'autres espèces appartenant au genre *Thymus* ont fait l'objet de nombreuses études (Jukic et Milos,

2005 ; Kulisic *et al.*, 2005; Chizzola *et al.*, 2008; Hazzit *et al.*, 2009 ; Ozen *et al.*, 2011; Tepe *et al.*, 2011 ; Amiri, 2012 ; Bendjabeur *et al.*, 2018). Ces auteurs et plusieurs d'autres ont tous montrés que l'activité antiradicalaire des extraits de *Thymus*, était essentiellement due à la présence des monoterpènes phénoliques (thymol et carvacrol). Dans une étude précédente sur les feuilles de la même espèce récoltée de la même région en phase de floraison (Avril 2012), l'HE majoritairement constituée de Thymol (41,2%) a été capable de réduire le radical libre DPPH avec un pourcentage d'inhibition de 17,4% à la concentration de 10^{-1} M (Zellagui *et al.*, 2014). Aussi, l'HE de *T.numidicus* Poiret. récoltée de la région de Constantine (Algérie) en phase de floraison riche en Thymol (23,92%) a donnée un pourcentage d'inhibition de blanchiment du β -carotène de 52% à la concentration de 4mg/mL (Zeghib *et al.*, 2013). De plus, Adrar *et al.*, 2016 ont montrés dans leur étude sur l'HE de la variété de Bejaia (Est Algérien) récolté en juin 2013 pendant la floraison, qu'elle présentait un effet antioxydant modéré (CI_{50} : $156,53 \pm 20,23$ ug/mL) par le test DPPH, et que c'était attribué à leur forte teneur en phénols comme le thymol, qui constitue le composant principal (57,20 à 66,31%). D'autre part, Jukic et Milos, (2005) ont prouvés que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (thymohydroquinone) de l'HE de *Thymus vulgaris* L. sont capables de réduire le radical DPPH avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypes phénoliques. Par ailleurs, les activités anti-radicalaires d'HE de *Thymus vulgaris* L. ont été testées par Bouhdid *et al.* (2006), par la technique de décoloration de la β carotène et le test du DPPH, le pouvoir antioxydant manifesté a été interprété par une action combinée des différents constituants de l'huile. En outre, Hazzit *et al.*, (2009), ont confirmés l'activité antioxydante des HEs de *T. algeriensis*, *T. pallescens* et *T. dreatensis*, dont leurs composés majoritaires sont Carvacrol, Thymol et Linalool. Bendjabeur *et al.*, (2018) de leurs part ont prouvés différentes tendances du potentiel antioxydant des HEs de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. dominée par le carvacrol (43.2%) en fonction du test utilisé (DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{\bullet+}$, Anion superoxyde, β -carotene CUPRAC et pouvoir réducteur).

La variation de l'activité antioxydante des HEs de la même plante collectée à différentes phases de croissance pourrait être attribuée aux variations des composants actifs présents dans l'huile de chaque phase (Ahmad *et al.*, 2011). Le thymol et carvacrol sont de puissants agents réducteurs du radical DPPH et inhibent la peroxydation lipidique (Bruneton, 1999). Nos résultats d'analyse GC/MS sur les huiles essentielles de *T.numidicus* Poiret. montrent une variation de teneur en composé majoritaire le Thymol en fonction des phases de croissance, dont l'HE de la phase de fructification (Tn4) est caractérisée par la teneur la plus élevée, ce

qui confirme leur potentiel antioxydant remarqué par rapport aux autres phases. Ceci est confirmé par un certains nombre de travaux sur des espèces de Lamiaceae. Par exemple, **Amiri et al., (2011)** ont prouvés que l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Satureja macrosiphonia* Bornm. pendant la floraison était supérieur à celle de la phase végétative en utilisant la méthode de blanchissement de β -carotène.

Cependant, nous ne pouvons attribuer l'effet antioxydant d'une HE qu'aux composés majeurs. Certains alcools, éthers, cétones, aldéhydes et monoterpènes hydrocarbonés (γ -terpinène et α -pinène) présents à minorité peuvent contribuer de manière significative à l'activité de l'huile (**Chizzola et al., 2008**).

2.1.2. Huiles essentielles de *C.maritimum* L. en fonction du stade phénologique

Les résultats de l'activité antioxydante des HEs de *C.maritimum* L. par rapport aux antioxydants standards sont montré en dans le **tableau 16**.

Tableau 16 : Pourcentages d'inhibition à la concentration maximale obtenus par les HEs de *C.maritimum* L. en fonction du stade phénologique

	Pourcentage d'inhibition à 200 $\mu\text{g/mL}$ (%)		
	DPPH	ABTS	β -carotène
Crt1	na	na	na
Crt2	na	6,35 \pm 312	na
Crt 3	na	9,32 \pm 2,05	na
BHA^a	88,43 \pm 0,23	95,39 \pm 2,62	99,76 \pm 0,00
BHT^b	94,97 \pm 0,08	96,68 \pm 0,39	95,28 \pm 3,25

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm écart type.
- nt = non testée
- (a, b): Antioxydants standards
- na : non active

D'après les résultats consignés dans le **tableau 16**, toutes les huiles essentielles de *C. maritimum* L. ne montrent aucune activité antiradicalaire par le DPPH et β -carotène à la concentration maximale (200 $\mu\text{g/mL}$). Cependant, une très faible activité a été enregistrée par les huiles des stades 2 et 3 avec des pourcentages d'inhibition allant de 6,35% à 9,32% par le test ABTS. Les antioxydants standards ont exercé de très forte activité antioxydante en enregistrant des pourcentages d'inhibition allant de 88,43 à 99,76 %.

L'activité antioxydante des HEs de cette espèce a été rapportée dans de nombreux travaux antérieurs et semble être liée à l'activité de certains types de composés enfermés tels que les monoterpènes oxygénés, en particulier les alcools et les phénols (**Bourgou et al., 2008**). Dans notre cas, la légère efficacité de l'huile en stade de fructification est probablement due à sa richesse en apiol (35,32%) et thymyl methyl ether (19,19%).

Nos résultats sont en accord avec de nombreux travaux antérieurs. **Jallali et al., 2014** ont trouvé que les HEs de la variété Tunisienne riches en dillapiole avait une faible activité antiradicalaire sur le DPPH ($CI_{50} = 470$ et $3300 \mu\text{g/mL}$) par les huiles de Kélibia et Monastir respectivement). Dans la même optique, **Generalic et al., (2016)** ont rapporté de très faible activité antiradicalaire avec des pourcentages d'inhibition du DPPH entre 2,6 et 2,8 % par les huiles des tiges, feuilles et fleurs de *C. maritimum* (Croatie). Ces huiles sont dominées par le limonène, γ -terpinène et sabinène.

De nombreuses études ont démontré les propriétés antioxydantes des huiles essentielles. Le potentiel antioxydant d'une huile essentielle dépend de sa composition. Il est bien établi que les composés phénoliques et métabolites secondaires à double liaison conjuguée présentent généralement des propriétés antioxydantes importantes (**Koh et al., 2002**). Par ailleurs, très peu d'études sont menées sur les activités antioxydantes des cétones et esters aliphatiques en tant que composants majeurs de l'huile essentielle de plante. Nos trois huiles essentielles notamment Crt1, malgré qu'elles contiennent d'avantages de monoterpènes oxygénés, la présence du 2-undecanone, des hydrocarbures monoterpéniques et autre composés pourrait peut être expliquer leur faible activité antioxydante.

2.1.3. Fractions de *C.maritimum* L.

La variation de l'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations des extraits AcOEt et *n*-but de *C.maritimum* L. par rapport aux antioxydants standards est présenté en **figure 35** et **tableau 17**.

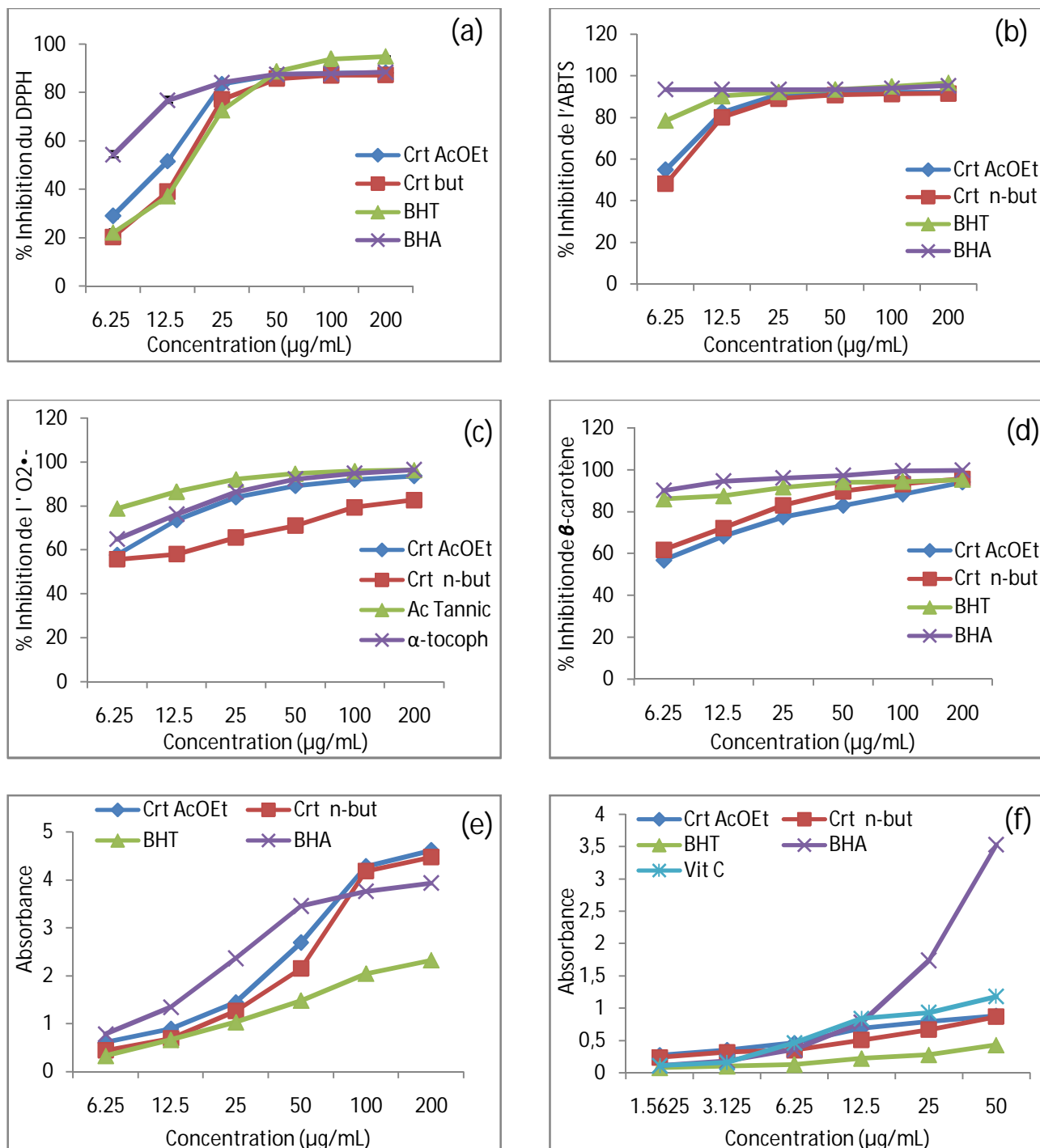


Figure 35 : Activité antioxydante; piégeage du DPPH[•] (a), piégeage de l'ABTS^{•+} (b), piégeage de l'O₂⁻ (c), blanchissement du β-carotène (d), CUPRAC (e) et pouvoir réducteur (f) des fractions de *C.maritimum* L.

Tableau 17 : Valeurs de CI_{50} et $A_{0,50}$ des fractions de *C.maritimum* L.

	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				$A_{0,50}$ ($\mu\text{g/mL}$)	
	DPPH	ABTS	β -carotène	$O_2^{\cdot-}$	CUPRAC	PR
Crt AcOEt	12,07 \pm 0,82	5,56 \pm 0,11	3,87 \pm 0,33	4,76 \pm 0,12	5,22 \pm 1,04	7,64 \pm 0,33
Crt but	16,07 \pm 0,39	6,94 \pm 0,40	1,87 \pm 0,03	3,46 \pm 0,28	8,13 \pm 0,39	11,94 \pm 0,47
BHA^a	5,73 \pm 0,41	1,81 \pm 0,10	0,90 \pm 0,02	nt	3,64 \pm 0,19	nt
BHT^b	12,99 \pm 0,41	1,29 \pm 0,30	1,05 \pm 0,01	nt	9,62 \pm 0,87	nt
Ac tan^c	nt	nt	nt	1,68 \pm 0,06	nt	5,39 \pm 0,91
α-Toco^d	nt	nt	nt	3,19 \pm 0,40	nt	34,93 \pm 2,38
Vit C^e	nt	nt	nt	nt	nt	6,77 \pm 1,15

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm écart type.
- nt = non testée ; Ac tan= acide tannique ; α -toco= α -tocophérol.
- (a,b,c,d,e) : Antioxydants standards

D'après les graphes représentés dans la **figure 35**, on peut déduire que l'activité antioxydante des deux extraits ainsi que les antioxydants standards s'augmente en correspondance avec l'augmentation de leurs concentrations. Une réduction presque totale des radicaux libres en ses formes non radicalaires est traduite par la présence d'une phase stationnaire (graphes : a, b, c et d). Les deux extraits (AcOEt et *n*-but) ont manifesté une activité considérable et proche de celle des standards. Une meilleure activité a été remarqué par l'extrait AcOEt dans les tests DPPH (CI_{50} : 12,07/16,07 $\mu\text{g/mL}$), ABTS (CI_{50} : 5,56/6,94 $\mu\text{g/mL}$), CUPRAC ($A_{0,5}$: 5,22/8,13 $\mu\text{g/mL}$) et PR ($A_{0,5}$: 7,64/11,94 $\mu\text{g/mL}$) (**tableau 17**).

Pour les tests DPPH et CUPRAC, l'extrait AcOEt a exercé une activité mieux que celle de l'antioxydant standard BHT en enregistrant des valeurs de CI_{50} et $A_{0,5}$ de l'ordre de 12,07 \pm 0,82 $\mu\text{g/mL}$ et 5,22 \pm 1,04 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. De plus, les deux extraits ont exercés une activité supérieure à celle de l' α -tocopherol dans le test PR, avec des valeurs $A_{0,5}$ de 7,64 \pm 0,33 $\mu\text{g/mL}$ et 11,94 \pm 0,47 $\mu\text{g/mL}$ pour l'AcOEt et *n*-but respectivement.

L'activité antioxydante de *C.maritimum* L. a fait l'objet de quelques études antérieures en occurrence à celle de **Meot-Duros et al., (2008)**. Cette étude a mis en évidence le pouvoir antioxydant de l'extrait hydromethanolique (50%) des feuilles de la variété Française par le test ABTS d'un CI_{50} de 0,11 \pm 0,004 mg/mL. Cette activité a été confirmée par le même auteur principal **Meot-Duros** et son collaborateur **Magné (2009)** dans leur étude sur la même

variété poussant dans deux différents habitats et en fonction de la saison de récolte. L'échantillon poussant sur les collines de sable étaient caractérisée par une forte activité de piégeage de l'ABTS et DPPH à l'automne avec des CI_{50} de $0,095 \pm 0,006$ mg/ml et $0,146 \pm 0,02$ mg/mL respectivement. De plus, ils ont trouvés que ces activités avaient présentés une bonne corrélation avec le taux des composés phénoliques ($r = 0,84$ et $0,79$ respectivement) et en particulier avec l'acide chlorogénique ($r = 0,72$ et $0,56$ respectivement). Les extraits de *C. maritimum* (Tunisie) en phase de floraison riches en composés phénoliques présentaient les plus faibles valeurs de CI_{50} (DPPH) et de CE_{50} (pouvoir réducteur) par rapport à ceux de la phase végétative, reflétant les potentialités antioxydantes les plus élevées (Jallali *et al.*, 2012). Les mêmes constatations sont enregistrés par les auteurs (Nabet *et al.*, 2016 et Generalić Mekinić *et al.*, 2018) sur les variétés de Bejaïa (Algérie) et Croatie respectivement .

La présence d'un taux élevé de phénols totaux et de flavonoïdes dans les extraits AcOEt et *n*-but des parties aériennes de *C.maritimum* L. est probablement l'un des raisons expliquant leurs potentiels antioxydants. Ceci peut être renforcé par les résultats de la caractérisation chromatographique à l'aide de CLHP-DAD qu'elles ont révélées la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes avec l'acide chlorogénique et rutine comme composants majeurs. L'acide chlorogénique et ses dérivés possèdent de nombreuses propriétés, notamment antioxydante, anti-inflammatoire, Anti-hypertension et antimicrobienne (Naveed *et al.*, 2018). D'autre part, la rutine a été largement décrite pour ces applications pharmacologiques diverses en raison de ses nombreuses propriétés, notamment ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques, cardiovasculaires, neuroprotectrices, antidiabétiques et anticancéreuses (Perk *et al.*, 2014; Al-Dhabi *et al.*, 2015 ; Enogieru *et al.*, 2018). Cependant, d'autres auteurs ont démontré que l'activité antioxydante des composés phénoliques ne dépend pas seulement de leur quantité, mais essentiellement de leur qualité, de leur structure et de leurs interactions (Jallali *et al.*, 2012 ; Jallali *et al.*, 2014). En fait, les flavonols contenant plus de groupes hydroxyle (un à six groupes OH), tels que la rutine et la quercétine, ont une très grande capacité à piéger les radicaux libres et sont des antioxydants puissants bien connus (Cai *et al.*, 2006). L'acide caféique et certains de ses dérivés, à savoir l'ester phénéthylique de l'acide caféique, l'acide rosmarinique, l'acide chlorogénique et l'acide caftarique ont démontré de puissantes propriétés antioxydantes et sont capables de piéger plusieurs espèces réactives, telles que le DPPH, le peroxyde, l'hydroxyle, l'anion radical superoxyde, le peroxyde nitrite et l'oxygène singulet (Gulcin, 2006). En effet, la présence exclusive des composés : Quercétine, ac *p*-coumarique, ac caféique, ac protocatechique, ac

vanillique et ac 4-hydroxybenzoïque dans l'extrait AcOEt, en plus de la rutine en quantité relativement élevé pourrait justifier leur potentiel antioxydant le plus élevé par rapport à l'extrait *n*-but.

2.1.4. Fractions de *S. graeca* L.

La variation de l'activité antioxydante en fonction de différentes concentrations des extraits AcOEt et *n*-but de *S. graeca* L. par rapport aux antioxydants standards est illustré en **figure 36** et **tableau 18**.

Tableau 18 : Valeurs de CI_{50} et $A_{0,50}$ obtenus par les fractions de *S. graeca* L.

	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				$A_{0,50}$ ($\mu\text{g/mL}$)	
	DPPH	ABTS	β -carotène	$O_2^{\cdot-}$	CUPRAC	PR
Sat AcOEt	10,60±0,42	3,36±0,11	2,45±0,07	1,26±0,04	4,43±0,48	6,94±0,60
Sat but	11,42±0,50	4,68±0,37	2,64±0,03	7,36±0,27	6,16±0,33	11,47±0,74
BHA^a	5,73±0,41	1,81±0,10	0,90±0,02	nt	3,64±0,19	nt
BHT^b	12,99±0,41	1,29±0,30	1,05±0,01	nt	9,62±0,87	nt
Ac tan^c	nt	nt	nt	1,68±0,06	nt	5,39±0,91
α-Toco^d	nt	nt	nt	3,19±0,40	nt	34,93±2,38
Vit C^e	nt	nt	nt	nt	nt	6,77±1,15

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm écart type.
- nt = non testée ; Ac tan= acide tannique ; α -toco= α -tocophérol.
- (a,b,c,d,e) : Antioxydants standards

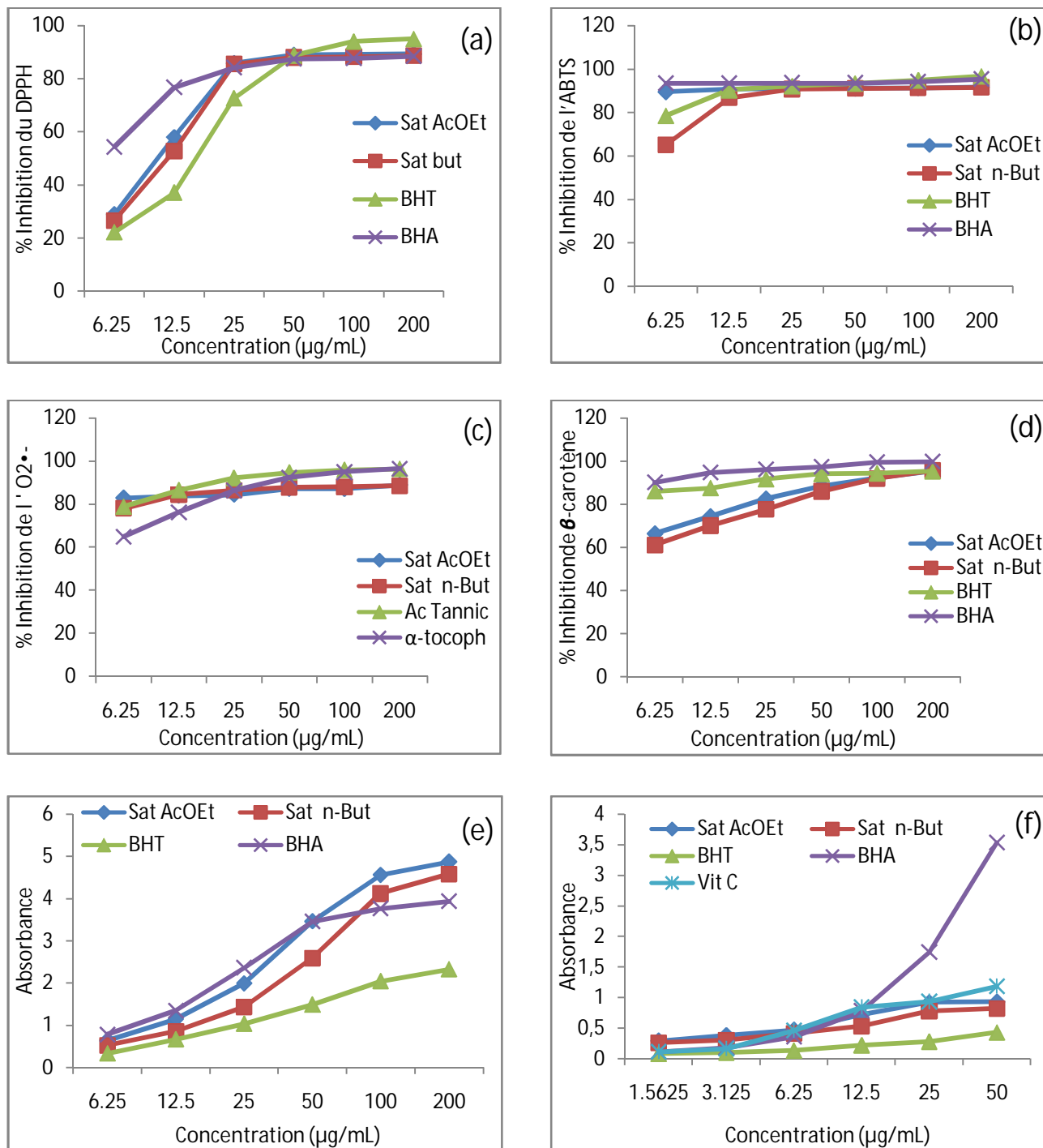


Figure 36 : Activité antioxydante; piégeage du DPPH[•] (a), piégeage de l'ABTS^{•+} (b), piégeage de l'O₂^{•-} (c), blanchissement du β-carotène (d), CUPRAC (e) et pouvoir réducteur (f) des fractions de *S. graeca* L.

Les graphes représentés en **figure 36** montrent une augmentation proportionnelle de l'activité antioxydante en fonction des concentrations des extraits et standards. Une phase stationnaire justifiant une réduction presque totale des radicaux libres en ses formes non radicalaires a été remarquée dans les graphes a, b, c et d.

D'après les résultats mentionnés dans le **tableau 18**, et en se basant sur les valeurs de CI_{50} et $A_{0,5}$, nous constatons que les deux extraits ont manifestés une activité très puissante en comparaison avec les antioxydants standards, d'où nous avons enregistré des valeurs de CI_{50} très proches de celles du BHA dans les tests ABTS et β -carotène, mieux que celles du BHT dans les tests DPPH (CI_{50} : $10,60 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$ et $11,42 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$) et CUPRAC ($A_{0,5}$: $4,43 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$ et $6,16 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$), mieux que celle de l' α -tocopherol dans le test PR ($A_{0,5}$: $6,94 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$ et $11,47 \pm 0,74 \mu\text{g/mL}$) pour l'AcOEt et *n*-but respectivement et même que l'acide tannique et l' α -tocopherol dans le test $O_2^{\cdot-}$ pour l'extrait AcOEt (CI_{50} : $1,26 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$). En plus, il paraît clairement que les deux extraits ont exercés des activités très proches dans la plupart des tests. L'extrait AcOEt était légèrement plus actif que celui *n*-but. Nos résultats de quantification des CPT et flavonoïdes ont montrés des teneurs élevés et très proches dans les deux extraits. Nos résultats montrent qu'une corrélation entre les activités antioxydantes et la teneur en CPT et flavonoïdes a été remarquée.

Les résultats obtenus pour les propriétés antioxydantes des extraits de *S.graeca* L. dans ce travail sont conformes à ceux rapportées par **Bougandoura et Bendimerad (2013)** sur les extraits aqueux et méthanoliques de *S. calamintha ssp. nepeta* (Tlemcen, Algérie), **Salehi-Arjmand et al., (2014)** sur *S. bachtiarica* (Iran) sauvage et cultivé, **Alizadeh (2015)** sur l'extrait méthanolique de *S. rechingeri* (Iran) en fonction du stade phénologique, **López-Cobo et al. (2015)** sur les extraits hydroéthanoliques et hydrométhanoliques de *S. montana* subsp. *kitaibelii*. (Serbie), **Alonso-Carrillo et al., (2017)** sur les extraits éthanoliques de *S.macrostema* avec une dépendance élevée à la composition du solvant et à la technique d'extraction et plus récemment **Veličković et al., (2018)** sur *S. montana* (Serbie) qui ont tous constatés des corrélations similaires entre la teneur en composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante de ces espèces. Ainsi, les analyses chromatographiques par HPLC ont prouvés une diversité des composés phénoliques dans les deux extraits. La présence de l'acide chlorogénique et la rutine à des concentrations élevées et l'acide ellagique dans l'extrait *n*-but d'une part et la présence de l'ac caféique, vanilline et ac protocatechuique pourrait être à l'origine de leur potentiel antioxydant le plus puissant. Aussi, la part de composés non identifiés dans les deux fractions, est généralement non négligeable.

Toutefois, à notre connaissance, il n'existait encore aucun rapport sur l'évaluation des propriétés antioxydantes de l'espèce *S.graeca* L.

2.1.5. Corrélation entre la teneur en CPT et l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est souvent liée à la quantité et à la nature des composés phénoliques présents dans les extraits. Les corrélations (R) entre les teneurs en CPT et l'activité antioxydante des différents extraits par différents tests (DPPH, ABTS, β -carotène, $O_2^{\cdot-}$, CUPRAC et PR) ont été déterminées à partir des courbes dose-réponse à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.03 en utilisant le test de *Pearson* ou $R \geq 0,95$ est considéré comme significativement corrélé. Les résultats de l'analyse de corrélation sont présentés dans le **tableau 19** et les **annexes (3, 4, 5 et 6)**.

Tableau 19 : Valeurs R (coefficient de corrélation) entre l'activité antioxydante et la teneur en CPT de *S.graeca* L. et *C.maritimum* L.

	DPPH	ABTS	β -carotène	$O_2^{\cdot-}$	CUPRAC	PR
Sat AcOEt	0,838 ^{ns}	0,756 ^{ns}	0,939 ^{ns}	0,985 [*]	0,998 ^{**}	0,812 ^{ns}
Sat <i>n</i> -but	0,847 ^{ns}	0,800 ^{ns}	0,955 [*]	0,807 ^{ns}	0,999 ^{***}	0,886 ^{ns}
Crt AcOEt	0,863 ^{ns}	0,731 ^{ns}	0,902 ^{ns}	0,873 ^{ns}	0,999 ^{***}	0,872 ^{ns}
Crt <i>n</i> -but	0,899 ^{ns}	0,737 ^{ns}	0,928 ^{ns}	0,971 [*]	0,998 ^{**}	0,973 [*]

* Corrélation significative, $P < 0,05$

** Corrélation significative, $P < 0,01$

*** Corrélation hautement significative, $P < 0,001$

^{ns} Corrélation non significative ($P \geq 0,05$)

Au vu de ces résultats, une corrélation positive a été remarquée entre tous les extraits avec tous les tests d'activité antioxydante. Il est intéressant de remarquer que les CPT des fractions Sat *n*-but et Crt AcOEt étaient fortement corrélés ($P < 0,001$) avec le test CUPRAC. Egalement, des corrélations significatives ont été observés entre les CPT de la fraction Sat AcOEt et les tests CUPRAC ($P < 0,01$) et $O_2^{\cdot-}$ ($P < 0,05$), entre Sat *n*-but et le test β -carotène ($P < 0,01$) et entre Crt *n*-but et les tests $O_2^{\cdot-}$ ($P < 0,05$), CUPRAC ($P < 0,01$) et PR ($P < 0,05$).

Globalement, ces résultats sont en accord avec de nombreux auteurs sur la contribution des composés phénoliques de différentes espèces dans l'activité antioxydante (**Adrar *et al.*, 2016; Veličković *et al.*, 2018**). La forte activité antioxydante des extraits AcOEt et *n*-but des deux plantes *C.maritimum* L. et *S.graeca* L. évaluée par différents systèmes pourrait être attribuée à leurs fort contenu en CPT et en flavonoïdes. Les autres composés mineurs ne devraient pas être négligés, parce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un

avec l'autre devrait être pris en considération dans les activités biologiques (**Bourgou et al., 2008**). En plus, la structure moléculaire et les différences de nombre et de position des groupements hydroxyles sur les cycles aromatiques avoir une grande influence sur l'activité antioxydante. La présence du groupe CH=CH-COOH dans les acides hydroxycinnamiques présents dans les extraits des deux plantes (acides *p*-coumarique, cafeique, *trans*-2-hydroxycinnamique, ferrulique et chlorogéniques) est considérée comme un élément clé de l'efficacité antioxydante. De plus, la rutine s'est avérée être le flavonoïde le plus abondant dans notre étude, tant pour *C.maritimum* L. (30,44 – 40, 32 µg/g) que pour *S.graeca* L. (41,63 µg/g). Ce flavonol est un antioxydant bien connu, dû à la présence de plus de groupes hydroxyles (**Cai et al., 2006 ; Bourgou et al., 2008**).

2.2. Activité anti-Alzheimer

2.2.1. Huiles essentielles de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

Les résultats de l'activité inhibitrice de l'AChE et BChE des huiles essentielles de *T. numidicus* Poiret. des quatre stades phénologiques ainsi que du standard en fonction de la concentration, exprimés en pourcentage d'inhibition sont regroupés dans les **figures 37** et **38**

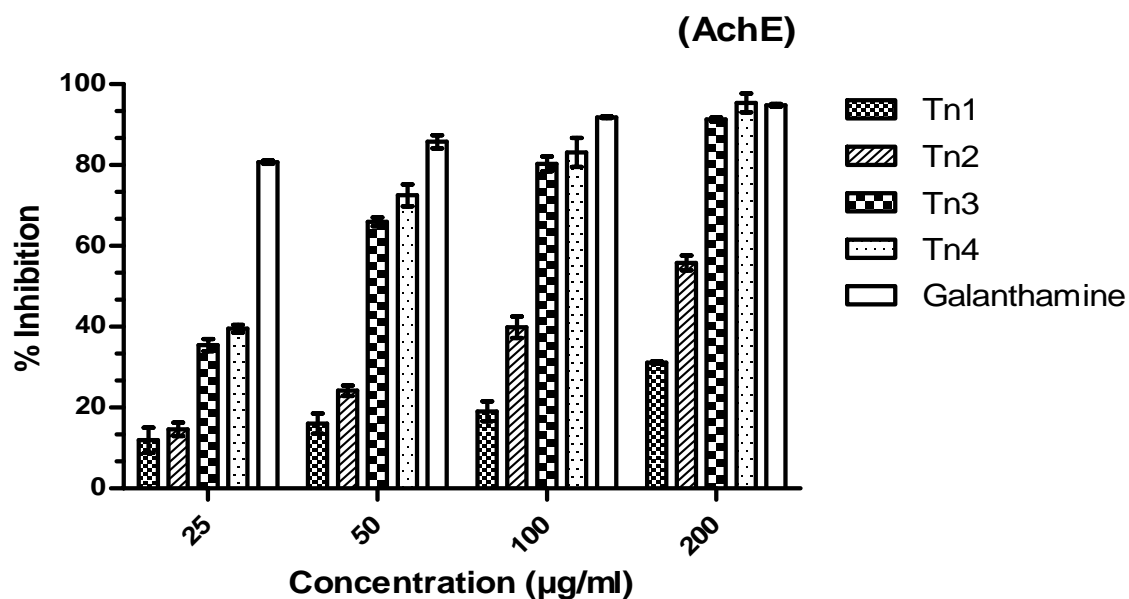


Figure 37 : Activité inhibitrice de l'acétylcholinesterase des huiles essentielles de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique.

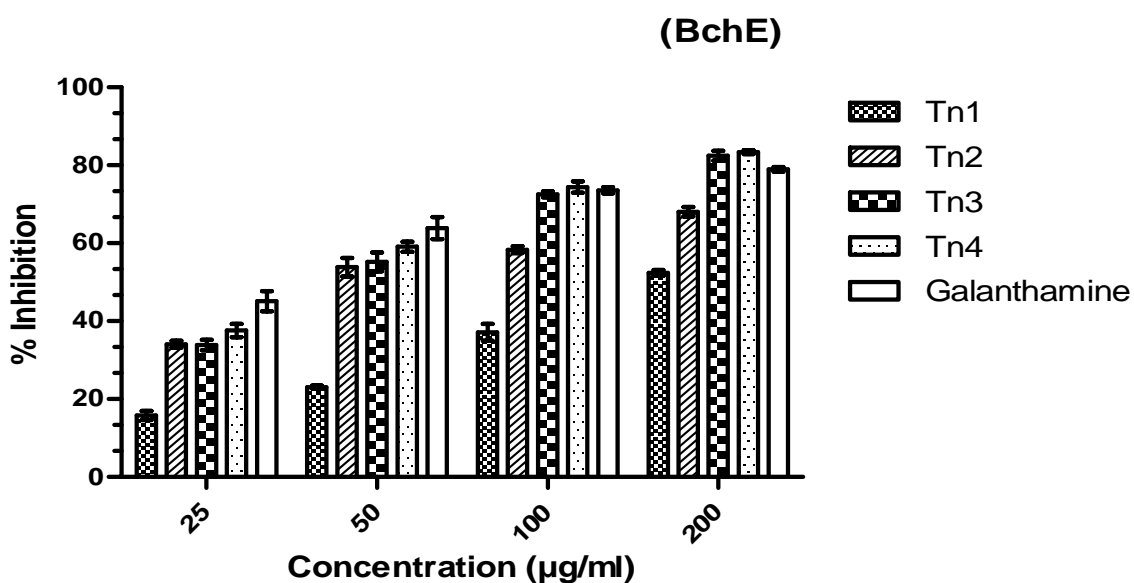


Figure 38: Activité inhibitrice de la butyrylcholinesterase des huiles essentielles de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique.

En plus, les pourcentages d'inhibition à la concentration maximale (200 µg/mL) et les valeurs de CI_{50} sont représentés dans le **tableau 20**.

Tableau 20 : Activité inhibitrice de l'AChE et BChE à la concentration maximale et valeurs de CI_{50} des HEs de *T.numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique.

Extraits	AChE		BChE	
	% Inhibition à 200 µg/mL	CI_{50} µg/mL	% Inhibition à 200 µg/mL	CI_{50} µg/mL
Tn1	31,16±0,28	> 200	52,39±0,77	185,44±2,98
Tn2	55,80±1,81	157,79±4,42	68,06±1,22	62,67±2,66
Tn3	91,26±0,55	39,23±1,48	82,47±1,27	44,08±1,79
Tn4	95,39±2,35	29,61±0,94	83,35±0,51	39,43±1,47
Galanthamine^a	94,77±0,34	6,27±1,15	78,95±0,58	34,75±1,99

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± écart type.
- (a) : Anticholinestérase standard.

L'ensemble des résultats illustrés en **figures 37 et 38** et le **tableau 20** confirment que toutes les HEs de *T.numidicus* sont des inhibiteurs importants de l'AChE et BChE, et qu'elles possédaient une activité dose dépendante. L'activité anticholinestérase de ces huiles a été comparée à la galanthamine à 200 µg/mL. Comme le montre le **tableau 20**, les huiles des deux premiers stades (végétatif et début de floraison) exerçaient un effet modéré par rapport à celles des autres stades et le standard. L'huile essentielle en stade de fructification (Tn4) était le meilleur inhibiteur de l'AChE et de la BChE en enregistrant des valeurs de CI_{50} de l'ordre de 29,61±0,94 µg/mL et 39,43±1,47 µg/mL avec l'AChE et BChE respectivement, très proches de celles de la galanthamine. L'ordre décroissant de l'activité exercée par ces huiles est : Tn4 > Tn 3 > Tn2 > Tn1.

Les données de la littérature sur l'effet inhibiteur de l'AChE et BChE par des espèces *Thymus* étaient insuffisantes. **Zouari et al., (2011)** ont rapporté que l'huile de *T. algeriensis* possédait une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de l'AChE (CI_{50} = 150 µg/mL) sachant que cette huile était essentiellement constituée de camphre (7,82%), de γ -terpinéol (7,36%), d' α -pinène (6,75%), le 1,8-cinéole (5,54%) et l'hydrate de cis-sabinène (5,29%). L'huile essentielle de *Thymus nummularius* (Turquie) dont le thymol (60,38%) et terpinylacetate (10,49%) constituent les composés dominants a montré une activité inhibitrice élevée contre

les enzymes acétyl, butyryl cholinestérase (**Ertas et al., 2015**). Plus récemment, l'huile essentielle de *T.algeriensis* constituée majoritairement de carvacrol (43,2%), *p*-cymene (18,7%) and γ -terpinene (14,8%) est douée d'activité anticholinestérase (AChE) intéressante ($CI_{50} = 98.84 \pm 1.81 \mu\text{g/mL}$) (**Bendjabeur et al., 2018**). Par ailleurs, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'activité anticholinestérase de l'espèce *T.numidicus* Poiret.

En outre, les résultats d'analyses chromatographiques sur les huiles essentielles de *T.numidicus* Poiret. ont montré une variation de teneur en composés majoritaires notamment le thymol en fonction des stades de croissance, ce qui est correspondant à cette variation du potentiel inhibiteur des deux enzymes. L'huile du stade de fructification (Tn4) est caractérisée par la teneur la plus élevée en thymol, ce qui peut expliquer leur potentiel anticholinestérase remarqué par rapport aux autres stades. Ceci est en accord avec les résultats de **Ertas et al., (2015)** qui ont attribué l'effet antioxydant et anticholinestérase de *T. nummularius* à la forte teneur en thymol. Le site actif hydrophobe de l'AChE serait susceptible d'interactions hydrophobes. Selon les conclusions présentées par **Mukherjee et al., (2007)**, les monoterpènes possèdent un squelette carboné susceptible de contribuer à leur activité anticholinestérase. Le thymol, un monoterpène oxygéné, a fourni une bonne activité inhibitrice, en particulier sur l'AChE démontrant une valeur de CI_{50} de 47,5 $\mu\text{g/ml}$ (**Ozturk, 2012**).

Selon plusieurs auteurs (**Howes et al., 2003 ; Boga et al., 2011 ; Ertas et al., 2015**), une corrélation fortement positive entre les propriétés antioxydantes et effets inhibiteurs de cholinestérase a été prouvée. En plus, le stress oxydatif est considéré comme un marqueur pathologique essentiel qui aurait récemment joué un rôle causal dans la pathogenèse de la MA (**Chen et Zhong, 2014**). Ce qui vient confirmer la concordance de nos résultats d'activité anticholinestérase avec les résultats d'activité antioxydante présentés dans la partie précédente. Aussi, le fait que la MA est une maladie multifactorielle, Il est évident que leur traitement préventif et symptomatique doit inclure une stratégie médicamenteuse à cibles multiples (**Dall'Aqua et al., 2013**). De ce fait, les autres composants présents dans les HES de *T.numidicus* Poiret contribuent probablement, par synergie, à l'activité présentée.

2.2.2. Fractions phénoliques de *C.maritimum* L.

Les résultats de l'activité inhibitrice des cholinestérases (AChE et BChE) exprimées en pourcentage d'inhibition et des valeurs de CI_{50} sont regroupés dans le **tableau 21**.

Tableau 21 : Activité inhibitrice de l'AChE et BChE à la concentration maximale (200 μ g/mL) des fractions phénoliques de *C.maritimum* L.

Extraits	% Inhibition à 200 μ g/mL	
	AChE	BChE
Crt AcOEt	na	na
Crt <i>n</i> -but	na	na
Galanthamine^a	94,77\pm0,34	78,95\pm0,58

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm écart type.
- (a) : Anticholinestérase standard.
- na : non active

Les fractions AcOEt et *n*-but de *C.maritimum* L. s'avéraient complètement inactifs vis-à-vis les deux enzymes AChE et BChE à toutes les concentrations testés (concentration maximale était à 200 μ g/mL).

Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenues par d'autres auteurs sur la même espèce. A titre d'exemple, **Generalic Mekinic et al., (2016)** ont montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *C. maritimum* (Croatie) a exercé un effet inhibiteur faible contre l'AChE et la BChE à la concentration 227 μ g/mL (27,2 % et 19,6 % respectivement), qui peut être attribuée à la teneur élevée en acide chlorogénique. Ce dernier a été testé comme composé pur à la même concentration, il a donné un pourcentage d'inhibition de 48,1% et 29,8% contre l'AChE et BChE respectivement.

2.2.3. Fractions phénoliques de *S.graeca* L.

Les résultats de l'activité inhibitrice de la BChE exprimées en pourcentage d'inhibition et des valeurs de CI_{50} sont regroupés dans le **tableau 22**.

Tableau 22 : Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des fractions phénoliques de *S.graeca* L.

Extraits	% Inhibition de la BChE					CI ₅₀ (µg/mL)	
	Concentration (µg/mL)	12,5	25	50	100		200
Sat AcOEt		18,91±0,59	19,31±1,47	20,80±1,30	29,45±2,06	44,71±2,06	> 200
Sat <i>n</i> -But		na	na	7,35±0,83	9,48±1,91	9,63±2,66	> 200
Gаланthamine		24,03±2,94	45,13±2,60	63,87±2,85	73,57±0,77	78,95±0,58	34,75±1,99

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± écart type.
- na : non active

Les fractions AcOEt et *n*-But de *S.graeca* L. ont montré une certaine activité inhibitrice vis-à-vis de la BChE, mais étaient moins actifs que le standard (galanthamine). Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été enregistré par la fraction AcOEt avec une valeur de 44,71% à 200 µg/mL. D'autre part, aucune activité inhibitrice de l'AChE n'a été trouvée par les deux fractions.

Ces résultats viennent confirmés celles trouvés par **Silva et al., (2009)**, d'où ils ont constaté que la fraction acétone de *Satureja montana* (Espagne), comprenant parmi ces constituants les acides : férulique, caféique, gallique et chlorogénique, n'a pas affecté l'activité de l'AChE mais a exercé une inhibition significative contre la BChE. Dans le même contexte, **Ozturk (2012)** a rapporté une faible activité inhibitrice par l'extrait méthanolique de *Satureja thymbra* (Turkey) particulièrement contre l'AChE (CI₅₀ : 928 µg/mL).

Selon **Li et al., (2007)** les acides phénoliques sont l'un des principaux composés phytochimiques antioxydants, capables de réduire les risques de certaines altérations liées à l'âge, notamment la maladie d'Alzheimer. De plus, **Kanski et al. (2002)** ont indiqué que l'acide férulique, présent en plus grande quantité dans un extrait, réduit considérablement les dommages causés par les radicaux libres dans les systèmes de cellules neuronales, ce qui suggère l'importance des antioxydants naturels dans l'intervention thérapeutique contre les troubles neurodégénératifs, tels que la maladie d'Alzheimer, dans laquelle le stress oxydatif est impliqué.

2.3. Activité antimicrobienne et antibiofilm

L'activité antimicrobienne des HEs de *T. numidicus* Poiret. et *C. maritimum* L. et des fractions phénoliques de *S. graeca* L. et *C. maritimum* L. a été évaluée sur des souches bactériennes à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Enterococcus faecalis* ATCC19433 et *Listeria monocytogenes* ATCC7644), à Gram négatif (*Pseudomonas fluorescens* RSKK240) et deux levures (*Candida albicans* ATCC 10239 et *Candida tropicalis* RSKK 665) en utilisant la méthode de microdilution. La sensibilité des souches testées est estimée par la mesure de la CMI, qui correspond à la concentration minimale de l'extrait ou d'HE capables d'inhiber la croissance microbienne, exprimée en mg/mL.

D'autre part, la capacité de nos extraits à inhiber la formation de biofilm microbien a été évaluée sur *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Listeria monocytogenes* ATCC7644, *Pseudomonas fluorescens* RSKK240 et *Candida albicans* ATCC 10239, et exprimée en pourcentage d'inhibition.

2.3.1. HEs de *T. numidicus* Poiret en fonction du stade phénologique

Les valeurs de CMI des HEs de *T. numidicus* Poiret. représentées par quatre échantillons en fonction du stade phénologique (Tn1 : stade végétative, Tn2 : début de floraison, Tn3 : en pleine floraison et Tn4 : en fructification) reportés dans le **tableau 23**.

Tableau 23: Valeurs CMIs obtenues par les HEs de *T. numidicus* Poiret. en fonction du stade phénologique

Souches microbiennes		CMI (mg/mL)			
		Tn1	Tn2	Tn3	Tn4
Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0,25	0,125	0,125	0,125
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	0,062	0,062	0,062	0,062
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	0,062	0,062	0,062	0,062
Gram Négatif	<i>Pseudomonas fluorescens</i> RSKK240	0,25	0,25	0,25	0,25
Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	0,25	0,25	0,25	0,25
	<i>Candida tropicalis</i> RSKK 665	0,25	0,25	0,25	0,25

- Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne de deux répétitions
- CMI: Concentration Minimale Inhibitrice (mg. mL⁻¹)

Les résultats de l'effet inhibiteur de ces HEs sur le développement de biofilms microbiens sont consignés dans le **tableau 24**.

Tableau 24 : Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les HEs de *T.numidicus* en fonction du stade phénologique

Souches microbiennes	% inhibition du biofilm				
	Tn 1	Tn 2	Tn 3	Tn 4	
<i>S.aureus</i> ATCC25923	CMI	44,25±3,75	49,78±2,50	50,24±1,05	53,65±2,66
	CMI/2	9,51±3,13	42,37±5,16	36,63±0,43	33,63±3,75
	CMI/4	4,76±2,66	25,88±5,01	25,41±3,65	26,44±5,48
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	CMI	NI	NI	NI	NI
	CMI/2	NI	NI	NI	NI
	CMI/4	NI	NI	NI	NI
<i>P. fluorescens</i> RSKK240	CMI	50,09±1,86	53,51±2,97	61,16±1,86	64,25±0,72
	CMI/2	25,88±2,75	44,61±1,87	53,67±0,60	56,32±0,58
	CMI/4	23,12±3,85	30,19±2,93	50,13±1,81	55,65±2,19
<i>C. albicans</i> ATCC 10239	CMI	53,01±1,01	54,26±3,27	52,55±1,32	56,39±0,76
	CMI/2	51,05±0,76	50,52±3,02	49,19±1,07	48,92±2,27
	CMI/4	NI	NI	NI	NI

- NI : pas d'inhibition

D'après le **tableau 23**, tous les extraits étudiés ont une tendance à inhiber la croissance microbienne avec des CMI différentes. Cette dernière est variée en fonction de la souche microbienne utilisée ; bactérie (Gram positif ou à Gram négatif) ou levure, et du stade phénologique de l'HE testée.

Selon **Machado et al. (2005)**, les échantillons avec des valeurs de CMI inférieures à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont considérés comme ayant une excellente activité antibactérienne; des valeurs comprises entre 10 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont bonnes; entre 100 et 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ seraient modérées; des valeurs comprises entre 500 et 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ seraient faibles, et enfin inactifs si elles sont supérieures 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Les quatre huiles essentielles de *T. numidicus* ont montré une activité inhibitrice sur l'ensemble des microorganismes testés, dont les valeurs des CMI allant de 0,062 mg/ml à 0,25 mg/ml. Généralement, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que celles à Gram

négalif, ce qui est confirmé par le cas des souches *E. foecalis* ATCC19433, *L. monocytogenes* ATCC7644, et *S. aureus* ATCC25923 qui ont donné des valeurs de CMI allant de (0,062 – 0,125) mg/ml par rapport à celle de *P. fluorescens* RSKK240 (0,25 mg/mL).

L'HE au stade végétatif a révélé une CMI élevée vis-à-vis *S. aureus* ATCC25923 (0,250 mg/ml) en comparaison avec celles des trois autres stades (0,125mg/ml). En outre, les espèces *E. foecalis* ATCC19433 et *L. monocytogenes* ATCC7644 sont sensibles aux quatre essences aromatiques testées avec une CMI égale à 0,062mg/ml. L'activité antifongique a été testée sur deux espèces levuriennes du genre *Candida* dont *C. albicans* ATCC 10239 et *C. tropicalis* RSKK665, et leurs CMI ont été de l'ordre de 0,25mg/ml pour toutes les HES étudiées.

A la lumière de la bibliographie effectuée, plusieurs études ont été réalisées sur l'activité antimicrobienne des HES des espèces *Thymus*. L'espèce *S. aureus*, bactérie responsable de plusieurs pathologies infectieuses, est la plus utilisée par les scientifiques pour évaluer l'effet antibactérien des substances d'origine végétale. En effet, les CMI obtenues par l'HE des trois stades de croissance sur *S. aureus* ATCC25923 sont très proches de celles obtenues par **Adrar et al. (2016)** avec l'HE des parties aériennes (feuilles + fleurs) de *T. numidicus* de Bejaia (CMI = 0,234 mg/mL), aussi proches de celle de la variété de Tizi ouzou avec une CMI égale à 0,44 mg/ml (**Messara et al., 2018**). La sensibilité de *S. aureus* a été soulevée aussi par **Nabet et al., (2016)** qui ont étudié l'HE de la partie aérienne de *T. fontanesii* collectée de Bejaia en stade de floraison dont la CMI a été de l'ordre de 0,11 mg/mL. La même concentration a été enregistrée contre la souche *L. monocytogenes*. La sensibilité de la souche *E. foecalis* a été rapportée par **Marin et al., (2018)** avec une CMI égale à 0,148 mg/mL, deux fois supérieur à celles trouvés par nos HES. Par contre, une CMI très faible de l'ordre de 3,125 µg/mL a été obtenue par l'HE des feuilles de *T. fedtschenkoi* (Iran) (**Aminkhani et al., 2019**). D'après notre consultation bibliographique, l'espèce *Pseudomonas fluorescens* n'a pas été testée auparavant par les extraits de *Thymus*. Les études ont surtout montré l'effet antibactérien sur *P. aeruginosa*, d'où cette espèce était souvent moins sensible par rapport aux autres souches (**Adrar et al., 2016 ; Messara et al., 2018 et Marin et al., 2018**). Les résultats de sensibilité de la souche *C. albicans* ont été aussi proches de celles mentionnés par **Messara et al., (2018)** (0,27 mg/mL), deux fois supérieur à celles trouvés par **Nabet et al., (2016)** et par **Marin et al., (2018)** de l'HE des parties aériennes de *T. fontanesii* (Bejaia) et *T. capitatus* (Grèce) respectivement. Egalement, une faible CMI (donc une bonne activité antifongique) a été observée avec l'HE de *T. vulgaris* de l'ordre de

16,3 μ g/mL (**fani et al., 2017**). Par ailleurs, aucun rapport n'a été soulevé sur la sensibilité de la souche *Candida tropicalis* RSKK 665 envers les composés volatiles des espèces *Thymus*.

Ces écarts dans les valeurs de concentration minimale inhibitrice signalés par différents auteurs de diverses régions sont principalement attribuables au fait que la composition chimique des HEs et la concentration en composés actifs (thymol, carvacrol, linalol, *P*-cymène, etc.) sont largement déterminées par le génotype de la plante, stade de développement, la partie de la plante et influence des facteurs environnementaux (**Imelouane et al., 2009**). L'activité antimicrobienne des HEs des espèces *Thymus* semblent être associée aux composés phénoliques thymol et carvacrol (**Giordani et al., 2008**). De plus, **Ceylan et al., (2014)** ont confirmé la plus forte activité antimicrobienne du thymol et du carvacrol contre *Pseudomonas sp.* Bien que le mode d'action de ces composés ne soit pas clairement compris, on pense principalement que le groupe hydroxyle de ces 2 composés interagit avec la membrane cytoplasmique, modifie sa perméabilité et affecte l'ordre lipidique et la stabilité de sa bicouche, entraînant une augmentation du flux passif de protons à travers la membrane, entraînant une perturbation de la membrane cytoplasmique et une fuite du contenu cellulaire (**Rota et al., 2007**).

Les huiles essentielles sont des sources potentielles de nouvelles molécules anti-biofilm, en particulier contre les micro-organismes pathogènes (**Nostro et al., 2007**). Par conséquent, les effets inhibiteurs des HEs de *T. numidicus* Poiret. sur le développement de biofilms microbiens ont été étudiés contre des souches hautement producteurs de biofilm (*S.aureus* ATCC25923, *L. monocytogenes* ATCC7644, *P. fluorescens* RSKK240 et *Candida albicans* ATCC 10239). D'après les résultats mentionnés dans le **tableau 24**, il paraît clairement que les pourcentages d'inhibition de la formation de biofilm se concordent d'une manière générale avec celles des CMI obtenus par les différents extraits. Les extraits ayant induit de petites CMI présentent les pourcentages d'inhibition les plus élevés sur les souches correspondantes. Cette activité dépendait de la concentration utilisée pour l'inhibition de la formation du biofilm. Les concentrations de CMI ont produit une influence plus importante que celle de CMI/2 et CMI/4. En plus, des variations dans les pourcentages d'inhibition sont remarquées par les HEs en fonction du stade de phénologique, par exemple des valeurs de l'ordre 50,09 \pm 1,86, 53,51 \pm 2,97, 61,16 \pm 1,86 et 64,25 \pm 0,72 sont enregistrés par les huiles Tn1, Tn2, Tn3 et Tn4 contre la souche *P. fluorescens* RSKK240 respectivement.

Nos résultats montrent que la formation de biofilm était considérablement inhibée par l'huile essentielle en stade de fructification, en enregistrant une valeur maximale de pourcentage d'inhibition de l'ordre de $64,25 \pm 0,72$ contre *P. fluorescens* RSKK240 à la concentration de 0,25 mg/mL (CMI). D'autre part, aucune activité inhibitrice du biofilm n'a été observée contre la souche *L. monocytogenes* ATCC7644 à toutes les concentrations testées.

Il n'y avait pas d'études dans la littérature sur l'effet anti-biofilm de l'huile essentielle *T. numidicus* Poiret. Cependant, une étude sur l'HE de l'espèce *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *davisianus* collectée de la Turquie en pleine floraison a été réalisée par **Ceylan et al., (2014)**, démontrant des résultats d'inhibition similaires notamment contre *S. aureus* (28,9 %) et *P. fluorescens* (65,1 %). Dans la même étude, le thymol a montré une forte activité contre le développement du biofilm de *S. aureus* (49,2 %).

Les HEs de *T. numidicus* Poiret possèdent une forte activité antimicrobienne et antibiofilm, qui peuvent être utilisées comme alternatives aux antibiotiques. Cette activité était apparemment liée à leurs principaux composés majoritaires particulièrement le thymol, surtout en stade de fructification. Cependant, les autres composés minoritaires ne devront pas être négligés car une synergie ainsi qu'une éventuelle interaction entre les différents constituants de l'He pourrait également affecter l'activité antimicrobienne.

2.3.2. HEs de *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique

Les valeurs CMI et les pourcentages d'inhibition obtenues par les HEs de *C. maritimum* L. représentée par trois échantillons en fonction du stade phénologique (Crt1 : stade végétative, Crt2 : en floraison et Crt3 : en fructification) sont reportés dans les **tableaux 25 et 26**.

Tableau 25: Valeurs CMI obtenues par les HEs de *C. maritimum* L. en fonction du stade phénologique

Souches microbiennes		CMI (mg/mL)		
		Crt1	Crt2	Crt3
Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	> 2	> 2	> 2
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	> 2	> 2	> 2
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	> 2	> 2	> 2
Gram Négatif	<i>Pseudomonas fluorescens</i> RSKK240	> 2	> 2	> 2
Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	1	1	1
	<i>Candida tropicalis</i> RSKK 665	0,5	1	1

- Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne de deux répétitions
- CMI: Concentration Minimale Inhibitrice (mg. mL⁻¹)

Tableau 26 : Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les HEs de *C. maritimum* en fonction du stade phénologique

Souches microbiennes	Concentrations	% inhibition du biofilm		
		Crt 1	Crt 2	Crt 3
<i>S.aureus</i> ATCC25923	CMI	NI	NI	NI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	CMI	NI	NI	NI
<i>P. fluorescens</i> RSKK240	CMI	NI	NI	NI
<i>C. albicans</i> ATCC 10239	CMI	NI	NI	NI

- NI : pas d'inhibition

Les résultats présentés dans le **tableau 25** montrent qu'aucune des huiles essentielles ne présente d'activité antimicrobienne vis-à-vis toutes les souches bactériennes testées (CMI supérieurs à 2 mg/mL). Ainsi, selon la classification des CMI par **Machado et al. (2005)**, une faible activité antifongique a été observée par les trois HEs contre les souches levuriennes *Candida albicans* ATCC 10239 et *Candida tropicalis* RSKK 665 (CMI comprises entre 0,5 à 1 mg/mL). Dans le même contexte, aucune activité antibiofilm n'a été déterminée par toutes ces HEs. Il paraît clairement que les pourcentages d'inhibition concordent d'une manière générale avec celles des CMI obtenus par les trois essences.

Ces résultats sont cohérents avec certaines études précédentes, démontrant que les huiles essentielles de *C. maritimum* L. de différentes régions avaient une faible activité antimicrobienne. A des concentrations de 1,87 à 3,75 mg/mL, les HEs des parties aériennes de *C. maritimum* L. collecté en floraison des deux régions : Antalya et Mersin de la Turquie n'ont exercés aucun effet antimicrobien contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Senatore *et al.*, 2000). Dans le même contexte, Houta *et al.*, (2015) ont rapporté que l'extrait MeOH de différentes parties de *C. maritimum* L. (tiges, feuilles et fleurs) originaire de Tunisie possède une faible activité contre *S. aureus* ATCC 25923 et *C. albicans* ATCC 1405 en donnant des diamètres d'inhibition variant de 7 à 13 mm.

Les composés oxygénés, qui entrent dans la composition des huiles essentielles, sont généralement plus actifs que les composés hydrocarbonés, connues pour leurs faibles propriétés antimicrobiennes (Kalemba et Kunicka, 2003). Selon Dorman *et Deans* (2000), les huiles contenant des cétones ou des esters, telles que le β -myrcène, l' α -thujone ou l'acétate de géranyle, avaient une activité beaucoup plus faible, tandis que les huiles volatiles contenant des hydrocarbures terpéniques étaient généralement inactives. Les terpènes hydrocarbonés de l'huile essentielle de *C. maritimum* L. sont d'ailleurs inactifs.

2.3.3. Fractions phénoliques de *C. maritimum* L.

Les valeurs CMI et pourcentages d'inhibition obtenus par les fractions acétate d'éthyle (Crt AcOEt) et *n*-butanol (Crt *n*-but) de *C. maritimum* L. sont représentés dans les **tableaux 27** et **28**.

Tableau 27: Valeurs CMI obtenues par les fractions phénoliques de *C. maritimum* L.

Souches microbiennes		CMI (mg/mL)	
		Crt AcOEt	Crt <i>n</i> -but
Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	2,5	10
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	> 10	> 10
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	> 10	> 10
Gram Négatif	<i>Pseudomonas fluorescens</i> RSKK240	5	5
Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	2,5	10
	<i>Candida tropicalis</i> RSKK 665	2,5	5

- Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne de deux répétitions
- CMI: Concentration Minimale Inhibitrice (mg. mL⁻¹)

Tableau 28 : Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les fractions phénoliques de *C. maritimum* L.

Souches microbiennes		% inhibition du biofilm	
		Crt AcOEt	Crt <i>n</i> -but
<i>S.aureus</i> ATCC25923	CMI	38,75±6,30	NI
	CMI/2	27,54±1,62	NI
	CMI/4	14,55±2,34	NI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	CMI	23,12±1,42	NI
	CMI/2	NI	NI
	CMI/4	NI	NI
<i>P. fluorescens</i> RSKK240	CMI	59,81±2,26	NI
	CMI/2	50,42±2,51	NI
	CMI/4	NI	NI
<i>C. albicans</i> ATCC 10239	CMI	27,56±1,26	NI
	CMI/2	25,42±5,29	NI
	CMI/4	14,56±2,52	NI

- NI : pas d'inhibition

Les fractions phénoliques de *C. maritimum* L. se sont révélées moins actifs vis-à-vis toutes les souches microbiennes testées en comparaison avec les huiles essentielles. Ces fractions ont démontré de très faibles niveaux de sensibilité vis-à-vis la majorité des espèces microbiennes testés, entre autre *L. monocytogenes* ATCC7644, *E. faecalis* ATCC19433 (CMI

supérieurs à 10 mg/ml), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (10 mg/ml par *n*-but) et *P. fluorescens* RSKK240 avec une CMI égale à 5 mg/mL. Les souches *S. aureus* ATCC25923, *C. albicans* ATCC10239 et *C. tropicalis* RSKK 665 se sont apparues relativement sensibles vis-à-vis la fraction AcOEt en comparant avec celle de *n*-but dont leurs CMIs sont de l'ordre de 2,5 mg/ml. Si on prend la catégorisation de **Machado et al. (2005)** décrite précédemment, on peut déduire que ces deux fractions sont inactives envers toutes les espèces microbiennes testées.

D'autre part, les résultats de l'activité antibiofilm de ces fractions mentionnés dans le **tableau 28** montrent que seule la fraction AcOEt était capable d'inhiber le développement du biofilm microbien de toutes les souches testés en enregistrant des pourcentages d'inhibition variant de 23,12 à 59,81% à la concentration CMI.

Les résultats de l'effet antimicrobien sont comparables avec ceux obtenus par certains auteurs sur la même espèce de diverses régions et d'autres espèces halophytes appartenant à la famille des Apiacées. Il a été rapporté que l'extrait MeOH de différentes parties de *C. maritimum* L. (feuilles, tiges, graines et fleurs) originaire de Tunisie possède une faible activité contre *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *C. albicans* ATCC 1405 en donnant des diamètres d'inhibition variant de 10 à 12 mm (**Houta et al., 2011**). De même, les extraits polaire et apolaire des feuilles de *C. maritimum* et *Eryngium maritimum* L. (Apiaceae) originaires de France sont inefficaces contre *S. aureus* ATCC 33862 et *L. monocytogenes* ATCC 19112 (**Meot-Duros et al., 2008**).

L'ensemble de ces études antérieures viennent conforter nos résultats d'effet antimicrobien des fractions phénoliques de *C. maritimum* L. vis à vis les souches testées malgré leurs richesse en composés phénoliques et flavonoïdes.

2.3.4. Fractions phénoliques de *S. graeca* L.

Les valeurs CMIs et pourcentages d'inhibition du biofilm obtenus par les fractions acétate d'éthyle (Sat AcOEt) et *n*-butanol (Sat *n*-but) de *S. graeca* L. représentés dans les **tableaux 29 et 30**.

Tableau 29: Valeurs CMI obtenues par les fractions phénoliques de *S. graeca* L.

Souches microbiennes		CMI (mg/mL)	
		SatAcOEt	Satn-but
Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0,625	0,625
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	1,25	2,5
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644	1,25	1,25
Gram Négatif	<i>Pseudomonas fluorescens</i> RSKK240	0,312	0,312
Levures	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	2,5	10
	<i>Candida tropicalis</i> RSKK 665	2,5	5

- Les résultats sont exprimés comme étant la moyenne de deux répétitions
- CMI: Concentration Minimale Inhibitrice (mg. mL⁻¹)

Tableau 30 : Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm par les fractions phénoliques de *S. graeca* L.

Souches microbiennes		% inhibition du biofilm	
		Sat AcOEt	Sat n-but
<i>S.aureus</i> ATCC25923	CMI	NI	NI
	CMI/2	NI	NI
	CMI/4	NI	NI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC7644	CMI	23,43±0,44	NI
	CMI/2	18,71±0,88	NI
	CMI/4	12,42±1,24	NI
<i>P. fluorescens</i> RSKK240	CMI	NI	NI
	CMI/2	NI	NI
	CMI/4	NI	NI
<i>C. albicans</i> ATCC 10239	CMI	38,59±2,27	NI
	CMI/2	16,88±2,77	NI
	CMI/4	NI	NI

- NI : pas d'inhibition

Les fractions AcOEt et *n*-but de *S. graeca* L. possèdent un large spectre d'action couvrant les bactéries à Gram positif, Gram négatif et le genre *Candida* en comparant avec celles de la plante *C. maritimum* L. Elles avaient le même effet antibactérien (CMI) contre

S.aureus ATCC25923 (0,625mg/ml), *L. monocytogenes* ATCC7644 (1,25mg/ml) et *P. fluorescens* RSKK240 (0,312mg/ml). Cependant, la fraction AcOEt a exercé un effet important par rapport à celui *n*-but sur *E. faecalis* ATCC19433 (1,25 et 2,50 mg/mL), *C. albicans* ATCC10239 (2,5 et 10 mg/mL) et *C. tropicalis* RSKK 665 (2,5 et 5 mg/mL).

Les résultats de l'activité antibiofilm présentés dans le **tableau 30** montrent que l'extrait AcOEt a exercé un effet modéré d'inhibition du biofilm formé par uniquement les deux souches: *L. monocytogenes* (23,43%) et *C. albicans* (38,59%).

D'après la recherche bibliographique, il n'y avait aucun travail portant sur l'activité antimicrobienne des extraits de *S. graeca* L. En outre, des études sur les autres espèces du genre *Satureja* sont rapportées. **Ćetković et al. (2007)** ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *S. kitaibelii* d'ou, l'activité maximale (CMI = 10 mg/ml) a été montrée par l'extrait AcOEt contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* et par l'extrait de chloroforme contre *P. aeruginosa* tandis que le *n*-but était faiblement actif contre *S. aureus* (CMI = 50 mg/ml). En revanche, une très faible activité antimicrobienne (CMI \geq 100 mg/mL) de tous les extraits a été trouvée contre les levures testées (*C. pseudotropicalis* et *S. cerevisiae*). Dans une autre étude, les extraits aqueux et EtOH de *S. boissieri* (Turquie), riches en hesperidine et ac rosmarinique, ont montré une faible activité contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*, et n'étaient pas efficace contre *C. albicans* selon **Abdülmelik et al., (2018)**.

D'autre part, **Stanojković et al., 2013** suggèrent une forte activité antimicrobienne de l'extrait MeOH de *S. kitaibelii* originaire de la Serbie vis-à-vis *S. aureus* (0,625 mg/mL) , *L. monocytogenes* (1,25 mg/mL), *P.aerugenosa* (1,25 mg/mL) et *C. albicans* (0,625 mg/mL). Plus récemment, **Mohammed et al., (2019)** ont démontré l'activité antimicrobienne des extraits EtOH, MeOH et dichlorométhane de *S. hortensis* (Turquie) contre les souches *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* avec des CMI's varient entre 0,025 et 0,400 mg/mL.

Nos extraits possèdent une certaine activité antimicrobienne en raison de leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes, qui peuvent être utilisées comme alternative aux antibiotiques. De plus, l'acide chlorogénique et la rutine, connus pour leur potentiel antimicrobien (**Stojković et al., 2013 ; Kabir et al., 2014**), ont été détectés comme principaux composés phénoliques, ce qui pourrait expliquer l'effet remarqué.

CONCLUSION

Conclusion

Le présent travail avait pour objectif la recherche de nouvelles substances biologiquement actives d'origine végétale, présentant des activités antioxydantes, anti-Alzheimer et antimicrobiennes. Cette étude a été menée en ciblant deux sortes de produits, dont les composés phénoliques et les huiles essentielles vue leur importance croissante en phytothérapie. Pour cela, trois espèces provenant des régions humides et subhumides ont été choisies : *Thymus numidicus* Poiret., *Satureja graeca* L. (Lamiaceae) et *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). Le choix de ces plantes était basé principalement sur la fréquence de leurs utilisations dans la médecine traditionnelle, de leur richesse en composés bioactifs et du critère d'endémisme qui caractérise les deux espèces Lamiacées.

Les huiles essentielles de l'espèce *T.numidicus* Poiret, obtenues par hydrodistillation à partir des parties aériennes, ont été caractérisées. Une variation en rendement et composition chimique en fonction du stade phénologique a été remarquée. Les rendements par rapport à la matière sèche sont de l'ordre de : 1,21% < 1,90% < 2,05% < 2,10% obtenus par les huiles en stades : végétative (Tn1), début de floraison (Tn2), pleine floraison (Tn3) et fructification (Tn4). Ces HEs sont constituées majoritairement de thymol (52,17 - 89,69%), linalol (0 - 10,87%), thymol méthyl éther (0-16,16%), carvacrol (4,61–6,52%) et *p*-cymène (0,73 – 5,43 %) en fonction du stade de croissance. Le thymol, composé prédominant dans les quatre stades était au seuil en stade de fructification (89,69%).

L'étude de l'espèce *C. maritimum* L. montre qu'elle est producteur d'huiles essentielles avec des rendements variant au cours des différents stades de croissance présentant un rendement maximal en stade de fructification (0,71%). Les analyses chimiques de ces huiles ont permis d'identifier 41, 22 et 32 composés représentant 92,6%, 94,4% et 95,5% des produits volatiles totaux des trois essences respectivement : Crt 1 (en stade végétatif), Crt 2 (en floraison) et Crt 3 (en fructification), dont une variation quantitative et qualitative considérable en composés identifiés a été démontrée. Ces essences sont globalement dominées par : 2-Undécanone, thymol, carvacrol, α -Bisabolène, α -phellandrene, Globulol, Apiol, Spathulenol, thymyl methyl ether et *p*-Cymène.

L'extraction par épuisement successive avec des solvants de polarité croissante, à partir des parties aériennes de *S. graeca* L. et *C. maritimum* L., nous a permis d'obtenir quatre fractions (*n*-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) pour chaque plante. Les

CONCLUSION

rendements les plus remarquables sont celles des fractions polaires (AcOEt et *n*-but) en enregistrant les valeurs (0,51 et 2,17) % par *S.graeca* L. et (0,29 et 0,96) % par *C. maritimum* L. respectivement. L'estimation quantitative des phénols totaux et flavonoïdes dans ces fractions a révélé des teneurs considérables en ces molécules avec une teneur appréciable en CPT dans la fraction AcOEt de *S. graeca* L. ($268,38 \pm 1,907$ μg EAG/mg d'extrait) et en flavonoïdes dans la fraction AcOEt de *C.maritimum* L.

L'analyse qualitative par HPLC-DAD a permis d'identifier 11 et 9 composés phénoliques dans les fractions AcOEt et *n*-butanol de *C. maritimum* L. et également 5 et 9 composés dans les fractions AcOEt et *n*-butanol de *S. graeca* L. respectivement. Cette analyse a permis de mettre en évidence la présence de certains composés phénoliques communs entre les deux espèces comme les acides phénoliques : acide protocatechuique, acide caffeique, acide ellagique et acide chlorogénique et un flavonoïde : la rutine. Ces deux derniers ont été détectés avec des proportions relativement élevés dans les deux espèces.

L'ensemble des résultats trouvés montrent que la majorité des extraits testés sont doués d'activités biologiques remarquables. En effet, l'activité antioxydante observée par les fractions phénoliques de *S. graeca* L. et *C. maritimum* L., en premier lieu, et les HEs de *T.numidicus* Poiret. notamment en stade de fructification, suggère leurs possible utilisation comme antioxydants naturels capables de prévenir contre les pathologies liés au stress oxydatif. Les composés phénoliques constituent le groupe principal qui contribue à l'activité antioxydante des biomolécules végétales. Dans cette étude, La forte activité antioxydante des fractions phénoliques présentent une bonne corrélation avec les teneurs en composés phénoliques en particulier celles des testes CUPRAC, β -carotène et $\text{O}_2^{\cdot-}$.

L'étude de l'activité anti-Alzheimer *in vitro* a montré que les HEs de *T.numidicus* sont des inhibiteurs puissants de l'AChE et BChE. Cela est confirmé par des valeurs de CI_{50} très faibles et se varient en fonction du stade phénologique de la plante particulièrement en stade de fructification. En revanche, les fractions phénoliques de *S.graeca* L. sont moins importantes, et celles de *C. maritimum* L. ainsi que les HEs sont inefficaces contre les deux enzymes.

Nos extraits ont été testés pour leur potentiel antimicrobien et antibiofilm contre des bactéries à Gram positif, Gram négatif et levures. Les HEs de *T. numidicus* Poiret. des quatre stades phénologiques ont témoigné d'une forte activité antimicrobienne vis-à-vis tous les

CONCLUSION

microorganismes testés avec des CMI situées entre (0,062 et 0,25 mg/mL). Par conséquent, une forte activité antibiofilm a été observée par ces huiles démontrant une valeur maximale d'inhibition du biofilm par l'huile en stade de fructification de l'ordre de 64,25% sur *P. fluorescens* RSKK240 à la concentration CMI (0,25 mg/mL). D'autre part, aucune activité antimicrobienne n'a été détectée par les trois huiles de *C. maritimum* L. envers toutes les souches testées, et une activité modérée a été remarquée par les fractions phénoliques de cette espèce, ainsi que celles de *S. graeca* L.

Les résultats présentés dans cette étude constituent des informations intéressantes sur les biomolécules des espèces étudiés. Cependant, de nombreuses investigations devraient être menées sur des modèles *in vivo* en particulier l'activité antioxydante et anti-Alzheimer. Egalement, il serait souhaitable d'étudier le mode d'action des extraits actifs vis-à-vis les microorganismes pathogènes et enfin de tester ces extraits pour leurs effets toxicologiques probables afin d'optimiser leurs utilisations potentielles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd El Tawab A.M., Shahin N.N., et Abd el Mohsen M.M. (2014). Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 224: 196–205.

Abdülmelik A., Ercan B., Yusuf A., Turkan F., Alkan H. et Kılıç Ö. (2018). Polyphenolic Content, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of *Satureja boissieri*. *Iranian journal of chemistry & chemical engineering*, 37: 209-219.

Adams R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4 ed, Allured publishing corporation, USA.

Adrar N., Oukil N. et Bedjou F. (2015). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88: 01-08.

Ahmad I., Ahmad M.S.A., Ashraf M., Hussain M. et Ashraf M.Y. (2011). Seasonal variation in some medicinal and biochemical ingredients in *Mentha longifolia* (L.) Huds. *Pakistan Journal of Botany*, 43: 69–77.

Al-Bayati F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 403–406.

Al-Dhabi N.A., Arasu M.V., Park C.H., et Park S.U. (2015). An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal : Experimental and Clinical Sciences*, 14: 59–63.

Alemán A., Marín D., Taladrid D. Montero P., et Carmen Gómez-Guillén M. (2019). Encapsulation of antioxidant sea fennel (*Crithmum maritimum*) aqueous and ethanolic extracts in freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes. *Food Research International*, 119: 665-674.

Alizadeh A. (2015). Essential oil composition, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activity of cultivated *Satureja rechingeri* Jamzad at different phenological stages. *Zeitschrift für Naturforschung*, 70: 51–58.

Alizadeh A. (2017). Essential oil constituents, phenolic content and antioxidant activity of two endemic *Satureja* species from Iran. *Bangladesh Journal of Botany*, 46: 925-931.

Alonso-Carrillo N., Aguilar-Santamaría M. de los Á., Vernon-Carter E.J., Jiménez-Alvarado R., Cruz-Sosa F., et Román-Guerrero A. (2017). Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops and Products*, 103: 213–221.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aminkhani A., Sharifi R., Ranjbar E., Chalabian F. et Katouzian F. (2019).** Antimicrobial activities and chemical constituents of essential oil extracted from stem, leaf, and flower of *Thymus fedtschenkoi* from Khoy, Iran. *Journal of Food Processing and Preservation*. doi:10.1111/jfpp.14149.
- Amiri H. (2011).** The *in vitro* antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja macrosiphonia* Bornm., *Natural Product Research*, 25: 232–243.
- Amiri H. (2012).** Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three *Thymus* Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1–8.
- Angela M., Laur V., Daniela H., Dragulescu C., Iuliana A. et Olah N.K. (2008).** Polyphenolic analyses from *Thymus* species. *Production romany academy*, 3: 117-121.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S.E. (2008).** Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160 :413–419.
- Avlessi F., Dangou J., Wotto D.V., Alitonou G.A., Sohounhloue D. K. et Menut C. (2004).** Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes Rendus Chimie*, 7: 1057–1061.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
- Ballard CG. (2002).** Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *European Neurology*, 47: 64-70.
- Barbosa T.M. et Levy S.B. (2000).** The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updates*, 3: 303-311.
- Barros L., Duenas M., Ferreira I.C.F.R., Baptista P. et Santos-Buelga C. (2009).** Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chemical Toxicology*, 47: 1076-1079.
- Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V., et Komes D. (2018).** Overview of polyphenols and their properties. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, 1: 3–44.
- Benayache F., Boureghda A., Ameddah S., Marchioni E., Benayache F., Benayache S., (2014).** Flavonoids from *Thymus numidicus* Poiret. *Der Pharmacia Lettre*, 6: 50-54.
- Benayache F., Chalard P., Figueredo G., Benayache F. et Benayache S. (2014).** Chemical composition of the essential of *Thymus numidicus* Poiret. *Der Pharmacia Lettre*, 6 : 182-185.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bendjabeur S., Benchabane O., Bensouici C., Hazzit M., Baaliouamer A., et Bitam A. (2018).** Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 4: 2278–2288.
- Benkiniouar R., Touil A., Zaidi F., Rhouati S., Chosson E., Seguin E., Comteg. et Bellvert F. (2010).** Isolation and identification of five free flavonoid aglycones from *Thymus numidicus*. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*, 20: 11-15.
- Billerbek V.G. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5 : 249-253.
- Blois M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Boga M., Hacibekiroglu I., Kolak U. (2011).** Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. *Pharmaceutical Biology*, 49: 290–295.
- Boroja T., Katanić J., Rosić G., Selaković D., Joksimović J., Mišić D., et Mihailović V. (2018).** Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 118: 252-263.
- Boros B., Jakabová S., Dörnyei Á., Horváth G., Pluhár Z., Kilár F. et Felinger A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972–7980.
- Bougandoura N., Bendimerad N. (2012).** Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp.(nepeta) briq. *Revue des bioressources*, 2 : 1-7.
- Bougandoura N., Bendimerad N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp.Nepeta (L.) Briq. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 09 : 14-19.
- Boughendjioua H. et Djeddi S. (2018).** Quality Attributes of the Thyme (*Thymus numidicus* Poiret.) Essential Oil. *Journal of Plant Sciences*,6: 12-15.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., et Marzouk B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 48-55.
- Brahmachari G. (2011).** Natural Products in the Drug Discovery Programmes in Alzheimer's: Impacts and Prospects. *Asia pacific biotech. News, Singapore*, 15: 14-34.
- Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales*. Tec et Doc Lavoisier. Paris, p278.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Burczyk J., Wierzchowska-Renke K., Głowniak K., Głowniak P., Marek D. (2002).** Geographic and environmental influences on the variation of essential oil and coumarins in *Crithmum maritimum* L. , *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* , 9: 305–311.
- Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- C.L.S.I. (2006).** *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*, 7th ed. (M7– A7). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- C'etkovic G.S., Mandic A.I., Č'ananovic-Brunet J.M., Djilas S.M., et Tumbas V.T. (2007).** HPLC Screening of Phenolic Compounds in Winter Savory (*Satureja montana* L.) Extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30: 293–306.
- Cabana R., Silva L.R., Valentão P., Viturro C.I. et Andrade P.B. (2013).** Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (*Lamiaceae*). *Industrial Crops and Products*, 48: 49– 56.
- Cai Y.Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Cork H. (2006).** Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872 2888.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L. et Ferret A. (2007).** Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90: 2580–2595.
- Ćetković G.S., Č'ananović-Brunet J.M., Djilas S.M., Tumbas V., Markov S., et Cvetković D. (2007).** Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 8:1013-1027.
- Cetkovic G.S., Mandić A.I., Č'ananović-Brunet J.M., Djilas S.M. et Tumbas V.T. (2007).** HPLC Screening of Phenolic Compounds in Winter Savory (*Satureja montana* L.) Extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30: 293–306.
- Ceylan O. et Ugur A. (2014).** Chemical composition and anti-biofilm activity of *Thymus sipyleus* BOISS. subsp. *sipyleus* BOISS. var. *davisianus* RONNIGER essential oil. *Archives of Pharmacal Research*, 38: 957–965.
- Ceylan O., Sarac N., Ugur A., Sahin M.D. (2014).** The antimicrobial and antibiofilm activities of *Origanum vulgare* ssp. *viride* essential oils, endemic in Turkey. *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*, 3: 28-34
- Chen X., Guo C., et Kong J. (2012).** Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 7: 376–385.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen Z. et Zhong C. (2014).** Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30: 271–281.
- Chizzola R., Michitsch H., et Franz C. (2008).** Antioxidative Properties of *Thymus vulgaris* Leaves: Comparison of Different Extracts and Essential Oil Chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6897–6904.
- Choi Y., Jeong H.S. et Lee J. (2007).** Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chemistry*, 103: 130-138.
- Cornara L., D'Arrigo C., Pioli F., Borghesi B., Bottino C., Patrone E., Mariotti M.G. (2009).** Micromorphological investigation on the leaves of the rock samphire (*Crithmum maritimum* L.): Occurrence of hesperidin and diosmin crystals. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 143: 283–292.
- Cornara L., La-Rocca A., Marsili S., et Mariotti M. G. (2009).** Traditional uses of plants in the eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 125: 16–30.
- Corticchiato M., Bernardini A., Costa J., Bayet C., Saunois A., et Voirin B. (1995).** Free flavonoid aglycones from *Thymus herba barona* and its monoterpenoid chemotypes. *Phytochemistry*, 40: 115–120.
- Cowan M.C. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
- Cushnie T, Lamb A.J. (2011).** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38: 99-107.
- Daglia M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 174–181.
- Dall'Acqua S. (2013).** Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. *Botanics: Targets and Therapy*, 3: 19–28.
- Donlan R.M. et Costerton J.V. (2002).** Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167–193.
- Dorman H.J. et Deans S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88:308-16.
- Dorman H.J.D. et Deans S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied microbiology*, 88: 308-316.
- Dupont F., Guignard J.L. (2007).** *Abrèges botanique systématique moléculaire*. 14ème édition révisée, Masson.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Elizabeth K. et Rao M.N.A. (1990).** Oxygen radical scavenging activity of *curcumin*. *International journal of pharmaceutics*, 58: 237-240.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherston R.M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7: 88–95.
- Enogieru A.B., Haylett W., Hiss D.C., Bardien S., et Ekpo O.E. (2018).** Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 1–17.
- Ertas A., Boga M., Yilmaz M. A., Yesil Y., Tel G., Temel H., Hasimi N., Gazioglu I., Ozturk M., et Ugurlu P. (2015).** A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products*, 67: 336–345.
- Essawi T. et Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 343–349.
- Fang L., Chen M., Liu Z., Fang X., Gou S., Chen L. (2016).** Ferulic acid–carbazole hybrid compounds: Combination of cholinesterase inhibition, antioxidant and neuroprotection as multifunctional anti-Alzheimer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24: 886–893.
- Fani M. et Kohanteb J. (2017).** *In vitro* Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2017:1-7.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Favier A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64 : 390–396.
- Floyd R.A., et Hensley K. (2002).** Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 23: 795–807.
- Gabrilska R.A. et Rumbaugh K.P. (2015).** Biofilm models of polymicrobial infection. *Future Microbiology*, 10: 1997-2015.
- Generalic Mekinic I., Blazevic I., Mudnic I., Burčul F., Grga M., Skroza D., Jerčić I., Ljubenkov I., Boban M., Miloš M. et Katalinić V. (2016).** Sea fennel (*Crithmum maritimum*L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 3104-3112.
- Generalić Mekinić I., Šimat V., Ljubenkov I., Burčul, F., Grga, M., Mihajlovski, M., ... Skroza, D (2018).** Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(Apiaceae), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 124: 947-953.

Geny B., Charles A.L., Lejay A., Meyer A. (2019). Pollution et stress oxydant. *Revue Française d'allergologie*, 59 : 174–176.

Georgiou D., Djeddi S., Skaltsa H., (2015). Secondary metabolites from *Thymus numidicus* Poiret. *Biochemical Systematics and Ecology*, 59: 104-106.

Ghotbabadi F.S., Alizadeh A., Zadehbagheri M. Ardalan, Kamelmanesh M.M. et Shaabani M. (2012). Phytochemical composition of the essential oil, total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in Iranian *Satureja sahendica* Bornm. at different ontogenesis conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 3525-3534.

Giordani R., Hadeif Y. et Kaloustian J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79: 199–203.

Giweli A., Džamić A.M., Soković M., Ristić M.S. et Marin P. D. (2012). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Libya. *Molecules*, 17: 4836-4850.

Gohari A.R., Saeidnia S., Gohari M.R., Afrapoli F.M., Malmir M. et Hadjiakhoondi A. (2006). Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. *Natural product research*, 23: 1609-14.

Guignard J.L. (1994). *Botanique*. 9ème édition, Ed., Masson, Paris. 276p.

Gulcin I. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217: 213–220.

Habtemariam S. (2019). Natural Products in Alzheimer's Disease Therapy: Would Old Therapeutic Approaches Fix the Broken Promise of Modern Medicines. *Molecules*, 24: 1519.

Hadeif Y., Kaloustian J., Chefrour A., Mikail, C., Abou, L., Giodani, R., et Portugal, H. (2007). Chemical composition and variability of the essential oil of *Thymus numidicus* Poir. from Algeria. *Acta Botanica Gallica*, 154: 265-74.

Hadjmohammadi M.R., Soltani M. et sharifi V. (2012). Use of hollow fiber liquid phase microextraction and HPLC for extraction and determination of apigenin in human urine after consumption of *Satureja sahendica* Bornm. *Journal of Chromatography B*, 900: 85– 88.

Hajimehdipoor H., Gohari A.R., Ajani Y., Saeidnia S. (2014). Comparative study of the total phenol content and antioxidant activity of some medicinal herbal extracts. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1: 21-25.

Harborne J.B., 1989. *Methods in plant biochemistry*. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant Phenolics*. Academic Press, London, UK.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo A. R., Faleiro M. L., et Miguel M. G. (2009).** Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, 116: 714–721.
- Hoiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Bassi G. L., Coenye T., Donelli G., et Williams C. (2015).** Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. *Clinical microbiology and infection*, 21: 1–25.
- Houghton P.J., Ren Y., et Howes M.J. (2006).** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23: 181- 199.
- Houta O., Akrouf A., Najja H., Neffati M., et Amri H. (2015).** Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil from *Crithmum maritimum* Cultivated in Tunisia. *Journal of essential oil-bearing plants*, 18: 1459 – 1466.
- Houta O., Akrouf A., Neffati M., Amri H. (2011).** Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial potentials of *Crithmum maritimum* cultivated in Tunisia arid zones. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 1: 138-143.
- Houta O., Chouaeb H., Neffati M., Amri H. (2012).** Criblage chimique préliminaire des protéines et caroténoïdes présents dans un *crithmum maritimum* cultivée en Tunisie. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 14 : 77-82.
- Howes M.J.R., Perry N.S.L., Houghton P.J. (2003).** Plants with traditional uses and activities relevant to the management of Alzheimer’s disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy research*, 17: 1–18.
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Latif S., Sherazi S.T.H., , Ahmad A., et Sarker S.D. (2013).** Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 185-192.
- Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H. et Przybylski R. (2008).** Chemical composition, Antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108: 986-995.
- Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K. Et El Bachiri A. (2009).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11:205–208.
- Ismaili H., Sosa S., Brkic D., Fkih-Tetouani S., Ildrissi A., Touat D., Aquino R. P. et Tubaro A. (2002).** Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54: 1137–1140.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jabri K.I., Bettaieb I., Msaada K., Hammami M. et Marzouk B. (2012).** Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *Journal of Functional Foods*, 4: 661-669.
- Jäger A.K. et Saaby L. (2011).** Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16: 1471-1485.
- Jallali I., Megdiche W., M'Hamdi B. Oueslati S., Smaoui A., Abdelly C., et Ksouri R. (2012).** Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. with physiological stage and extraction method. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34 : 1451–1459.
- Jallali I., Zaouali Y., Missaoui I., Smeoui A., Abdelly C., et Ksouri R. (2014).** Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonic extracts of two edible halophytes: *Cithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry*, 145: 1031–1038.
- Jancheva M., Grigorakis S., Loupassaki S., et Makris D.P. (2017).** Optimised extraction of antioxidant polyphenols from *Satureja thymbra* using newly designed glycerol-based natural low-transition temperature mixtures (LTTMs). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6: 31–40.
- Jukic M. et Milo M. (2005).** Catalytic Oxydation and Antioxydant Properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croatica Chemica Acta*, 78: 105- 110.
- Júnior S.D.C., de Oliveira Santos J.V., de Almeida Campos L.A. (2018).** Antibacterial and antibiofilm activities of quercetin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* with resistance profile. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3: 1948-1958.
- Kabir F., Katayama S., Tanji N. et Nakamura S. (2014).** Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57: 359–365.
- Kabouche A. (2005).** *Etude phytochimique des plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae*, Thèse de Doctorat en Chimie, Département de Chimie, Université Mentouri-Constantine.
- Kabouche A., Kabouche Z. et Bruneau C. (2005).** Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20 : 235-236.
- Kabouche A., Kabouche Z., Bruneau C. (2005).** Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20: 235–36.
- Kalemba D. et Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Kanski J., Aksenova M., Stoyanova A., Butterfield A. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. *Journal of nutritional biochemistry*, 13: 273–281.

Kargioğlu M., Ceneci S., Serteser A., Konuk M., et Vural G. (2010). Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey. *Human Ecology*, 38: 429–450.

Koh K.J., Pearce A.L., Marshman G., Finlay-Jones J.J. et Hart P.H. (2002). Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British Journal of Dermatology*, 147:1212–1217.

Kouch M., Bennadja S., Djahoudi A. et Saoudi A. (2014). Antipseudomonal activity of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25: 149–53.

Kouch M., Bennadja S., Djahoudi A. et Aouadi S. (2014). Antipseudomonal Activity of the Essential Oil of *Thymus numidicus* Poiret. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 29: 149-153.

Kulisic T., Radonic A. et Milos M. (2005). Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Italian Journal of Food Science*, 17: 1-10.

Lanari A., Amenta F., Silvestrelli G., Tomassoni D., Parnetti L. (2006). Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*, 127: 158- 165.

Laouer H., Boulaacheb N., Akkal S., Meierhenrich U.J., Baldovini N., et Prado S. (2009). Composition and *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of two populations of *Thymus numidicus* Poiret. *Journal of Essential Oil Research*, 21: 374-377.

Lee H.P., Zhu X., Casadesus G., Castellani R.J., Nunomura A., Smith M.A., Lee H., Perry G. (2010). Antioxidant approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics*, 10: 1201–1208.

Lesniewska H. (2013). Faire face à la maladie d'Alzheimer, RETZ.

Li W., Wei C., White P., Beta T. (2007). High-amylose corn exhibits better antioxidant activity than typical and waxy genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 291–292.

López-Cobo A., Gómez-Caravaca A.M., Švarc-Gajić J., Segura-Carretero A., et Fernández-Gutiérrez A. (2015). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *Journal of Functional Foods*, 18: 1167–1178.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lucarini M., Pedrielli P., Pedulli G.F., Valginigli L., Gimes D. et Tordo P. (1999).** Bond dissociation energies of the N–H bond and rate constants for the reaction with alkyl, alkoxy, and peroxy radicals of phenothiazines and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 121: 11546–11553.
- Machado K.E., Cechinel Filho V., Tessarolo R., Mallmann C., Meyre-Silva C., Bella Cruz A. (2005).** Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology*, 43:636–639.
- Malmir M., Gohari A.R., Saeidnia S., Silva O. (2015).** A new bioactive monoterpene–flavonoid from *Satureja khuzistanica*. *Fitoterapia*, 105: 107–112.
- Marco G.J., (1968).** A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45: 594-598.
- Mariana P., et Laurian V. (2007).** Study of polyphenols from the species *Thymus pulegioides* L (Lamiaceae). *Farmacia- Bucuresti*, 55: 297- 302.
- Marin M., Novakovic M., Vuckovic I., Tešević V., Kolarevic S., et Vukovic-Gacic B. (2018).** Wild *Thymus capitatus* Hoff. et Link. chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21: 388–399.
- Markham K.R. (1982).** *Techniques of flavonoid identification (Chapitre 1 et 2)*. Ed., Treherne J.E et Rubery P.H. Academic Press.
- Meot-Duros L. et Magne C. (2009).** Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 37–41.
- Meot-Duros L., Le Floch G. et Magne C. (2008).** Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 258–262.
- Merghem R., Jay M., Viricel M-R, Bayet C. et Voirin B. (1995).** Five 8-C-Benzylated Flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*, 38: 637- 640.
- Meritt J.H., Kadouri D.E. et O'Toole G.A. (2005).** Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology* 1: 1–3.
- Messara Y., Fernane F. et Meddour R. (2018).** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Phytothérapie*, 16: 163-168.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R. et Beek T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N. (2002).** Antioxidant activity of chemical components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the Oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1845–1851.
- Mohammed FS., Dastan T., Sevindik M. et Selamoglu Z. (2019).** Antioxidant, antimicrobial activity and therapeutic profile of *Satureja hortensis* from Erzincan province. *Cumhuriyet Medical Journal*, 41: 558-562.
- Mukherjee PK., Kumar V., Mal M., Houghton PJ. (2007).** Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14: 289–300.
- Nabet N., Boudries H., Chougui N., Loupassaki S., Souagui S., Burló F., et Larbat R. (2017).** Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties*, 20: 1843-1855.
- Nabet N., Boudries H., Loupassaki S. Souagui S et Madani K. (2017).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. And *Origanum glandulosum* Desf. essential oils. *International Food Research Journal*, 24: 2518-2525.
- Naeini A., Khosravi A.R., Chitsaz M., Shokri H., et Kamlnejad M. (2009).** Anti-Candida albicans activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *Journal de Mycologie Médicale*, 19 : 168-172.
- Nauciel C. (2000).** *Bactériologie médicale*. Edit. Masson, Paris, 275p.
- Naveed M., Hejazi V., Abbas M., Kamboh A.A., Khan, G.J., Shumzaid M., et XiaoHui Z. (2018).** Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97: 67–74.
- Neha K., Haider M.R., Pathak A., Yar M.S. (2019).** Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178: 687-704.
- Nguir A., Znati M., Garrab M., Flamini G., Hamza M.A. et Ben Jannet H. (2015).** Hydrodistillation kinetic and biological investigations of essential oils from the Tunisian *Crithmum maritimum* (L.). *Journal of the Tunisian Chemical Society*, 17: 83-94.
- Nickavar B., Mojab F., et Dolat-Abadi R. (2005).** Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*, 90: 609–611.
- Nostro A., Roccaro A.S., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A., Pizzimenti F.C., Cioni P.L., Procopio F., et Blanco A.R. (2007).** Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 519–523.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44: 307–315
- Özcan M., Akgül A., Baser K.H.C., Özck T., Tabanca N. (2001).** Essential oil composition of sea fennel (*Crithmum maritimum*) from Turkey. *Nahrung Food*, 45: 353–356.
- Ozen T., Demirtas I., Aksit H. (2011).** Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124: 58–64.
- Öztürk M. (2012).** Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry*, 134: 48–54.
- Öztürk M., Kolak U., Topçu G., Öksüz S. et Choudhary M. I. (2011).** Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry*, 126: 31–38
- Pandey M.M., Vijayakumar M., Rastogi S., Rawat A.K.S. (2012).** Phenolic content and antioxidant properties of selected Indian spices of Apiaceae. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 18: 246–256.
- Pavela R., Maggi F., Lupidi G., Cianfaglione K., Dauvergne X., Bruno M., et Benelli G. (2017).** Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Industrial Crops and Products*, 109: 603–610.
- Perk A.A., Shatynska-Mytsyk I., Gerçek Y.C., Boztaş K., Yazgan M., Fayyaz S., et Farooqi A.A. (2014).** Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells. *Cancer Cell International*, 14: 124.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 233–239.
- Politeo O., Botica I., Bilusic T., Jukic M., Carev I., Burcul F. et Milos M. (2011).** Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco. *Journal of medicinal plant research*, 5: 6590–6596.
- Praticò D., (2008).** Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29: 609–615.
- Praticò D., et Mecocci P., (2013).** *Studies on Alzheimer's Disease. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Edit. Humana Press, Etats-Unis, p 236.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Quezel, P. et Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II, Ed. CNRS, Paris.

Radulovic N.S., Blagojevic P.D., Stojanovi Radic Z.Z. et N.M. Stojanovic (2013). Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current medicinal chemistry*, 20: 932-952.

Re R., Pellegrini A., Proteggente A., Pannala M., Yang M. et Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26: 1231-1237.

Renna M. et Gonnella, M. (2012). The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations. *International journal of gastronomy and food science*, 1: 111-115.

Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A. et 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.

Rota C., Carraminana J.J., Burillo J. et Herrera A. (2004). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67: 252-1256.

Rota MC., Herrera RM., Martínez JA., Sotomayor J.A., et Jordán M.J. (2007) Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19: 681–687.

Saeidnia S., Gohari A.R., Manayi A., et Kourepaz-Mahmoodabadi M. (2016). *Satureja*: Ethnomedicine, Phytochemical Diversity and Pharmacological Activities. *Springer Briefs in Pharmacology and Toxicology*. ISBN 978-3-319-25026-7 (eBook).

Saeidnia S., Nourbakhsh M.S., Gohari A.R., Davood A. (2011). Isolation and Identification of the Main Compounds of *Satureja sahendica* Bornm. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5: 1450-1453.

Saidj F., Rezzoug S.A., Bentahar F. et Boutekedjiret C. (2008). Chemical composition and insecticidal properties of *Thymus numidicus* Poiret essential oil from Algeria. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 11: 397–405.

Salehi B., Abu-Darwish M.S., Tarawneh A.H., Cabral, C., Gadetskaya A.V., Salgueiro, L., et Contreras, M. del M. (2019). *Thymus* spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science and Technology*, 85: 287-306.

Salehi-Arjmand H., Mazaheri D., Hadian J. Majnoon Hosseini N., et Ghorbanpour M. (2012). Essential oils composition, antioxidant activities and phenolics content of wild and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

cultivated *Satureja bachtiarica* Bunge plants of Yazd origin. *Journal of Medicinal Plants*, 13: 6-14.

Sánchez-Moreno C. 2002. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. *Alimentaria*, 329: 19–28

Scalbert A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.

Selvamohan T., Ramadas V., et Kishore S.S.S. (2012). Antimicrobial activity of selected medicinal plants against some selected human pathogenic bacteria. *Advances in Applied Science Research*, 3: 3374–3381.

Senatore F., Napolitano F. et Ozcan M. (2000). Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 15: 186-189.

Shahidi F. et Naczki M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, CRC Press, p 403-442.

Silva F.V.M., Martins A., Salta J., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Mira D., et Rauter A.P. (2009). Phytochemical Profile and Anticholinesterase and Antimicrobial Activities of Supercritical versus Conventional Extracts of *Satureja montana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 11557–11563.

Singh A.K., Gupta A., Mishra A.K., Gupta V., Bansal P., Kumar S. (2010). Medicinal Plant for Curing Alzheimer's Disease. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 1: 108–114.

Singleton V.L., Rossi J.A.J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 : 144-158.

Skoula M., Grayerc R.J. et Kite G.C. (2005). Surface flavonoids in *Satureja thymbra* and *Satureja spinosa* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 541–544.

Smail A., Lyoussi B., Maria G., Miguel (2011). Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. *Molecules*, 16: 7672–7690.

Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Académie des Sciences Paris, Série B*, 327: 649-662.

Soto-Mendivil E.A., Moreno-Rodriguez J.F., Estarron-Espinosa M., GarciaFajardo J.A., et Obledo-Vazquez E.N. (2006). Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *eGnosis (Online)*, 4, 16.

Spencer, J.P.E. (2010). The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*, 104: 40-47.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Stalikas C.D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoïds. *Journal of separation science*, 30: 3268 – 3295.
- Stanojković T., Kolundžija B., Ćirić A., Soković M., nikolić D. et Kundaković T. (2013).** Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* wierzb. Ex heuff (Lamiaceae). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8 : 845 – 854.
- Stefanović, O. D. (2018).** Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*. doi:10.5772/intechopen.72026
- Stojković D., Petrović J., Soković M., Glamočlija J., Kukić-Marković J. et Petrović, S. (2013).** *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 : 3205–3208.
- Tel-Çayan G., Öztürk M., Duru M.E., Rehman M.U., Adhikari A., Türkoğlu A., et Choudhary M.I. (2015).** Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*. *Industrial Crops and Products*, 76: 749-754.
- Tepe B., Sarikurkcü C., Berk S., Alim A. et Akpulat H.A. (2011).** Chemical Composition, Radical Scavenging and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus boveii* and *Thymus hyemalis*. *Records of Natural Products*. 5: 208-220
- Upadhyay R.; Mohan Rao L. (2013).** An outlook on chlorogenic acids occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical reviews in food science and nutrition* 53: 968–984.
- Veličković V., Mašković J.M., Mašković P.Z. (2018).** Analytical Control and Antioxidative Activity of Different Teas in Serbia. *Der Chemica Sinica*, 9: 599-604.
- Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Kindl M., Vladić J., Lower-Nedza A., et Brantner A. (2014).** Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules*, 19: 767–782.
- Vogt T. (2010).** Phenylpropanoid Biosynthesis, *Molecular Plant*, 3: 2-20.
- Weinreb O., Silvia M., Amit T., et Youdim M.B.H., (2004).** Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 506–516.
- Yoo K.M., Lee C.H., Lee H., Moon B.K. et Lee C.Y. (2008).** Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food chemistry*, 106: 929-936.
- Zeghib A., Laggoune S., Kabouche A. Semra Z., Smati F., Touzani R., et Kabouche Z., (2013).** Composition, antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret from Constantine (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5: 206-210.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

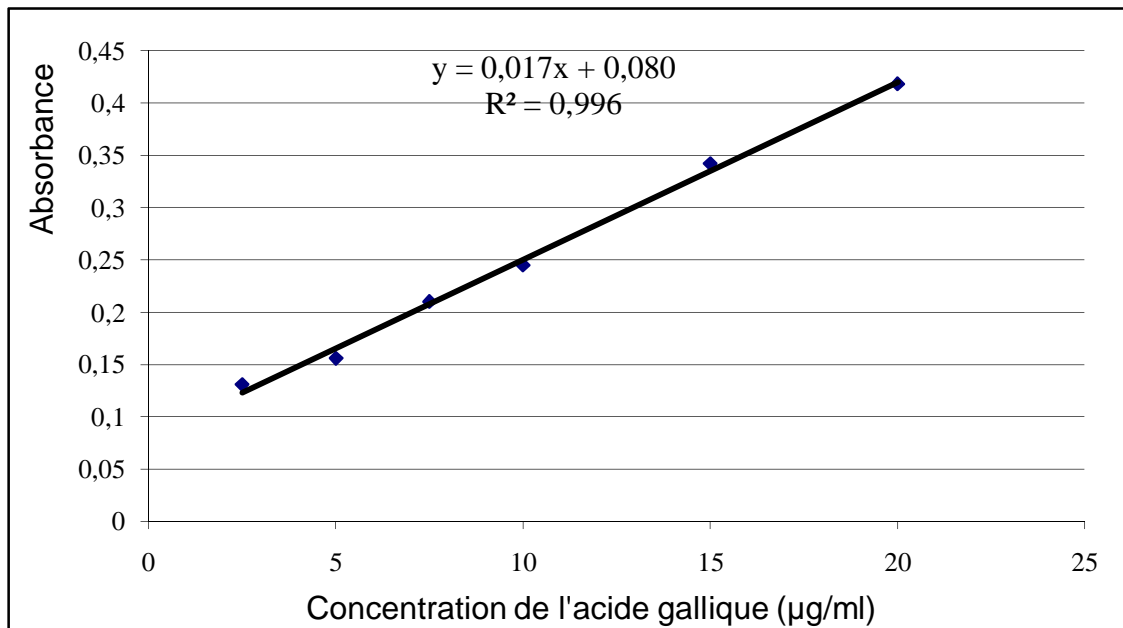
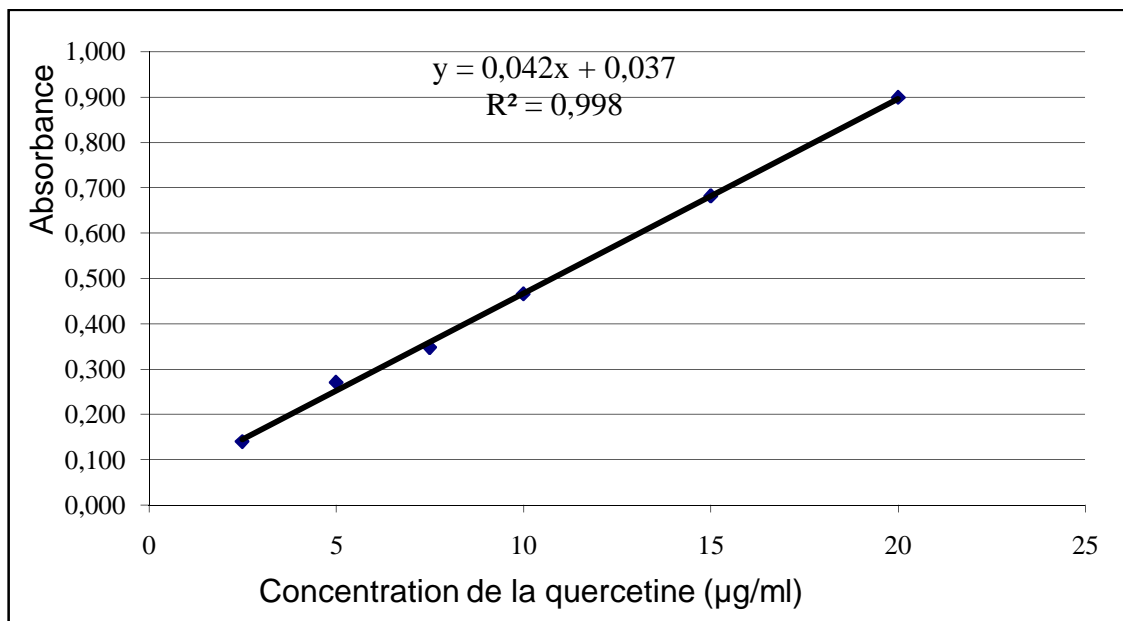
Zeljковиć S.Ć., Topčagić A., Požgan F., Štefane B., Tarkowski P., et Maksimović M. (2015). Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L. *Industrial Crops and Products*, 76, 1094–1099.

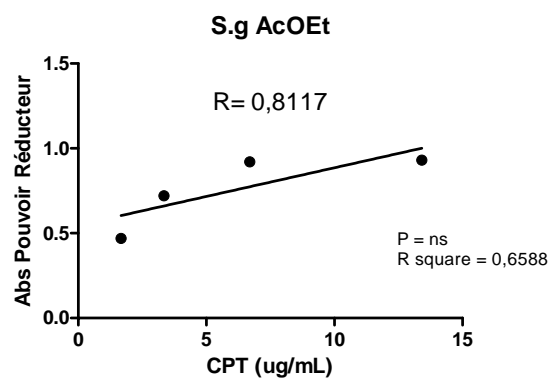
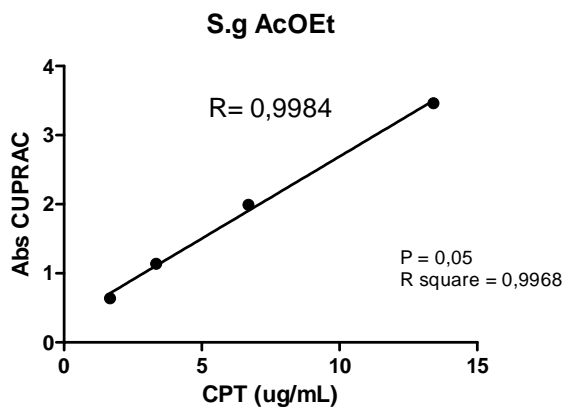
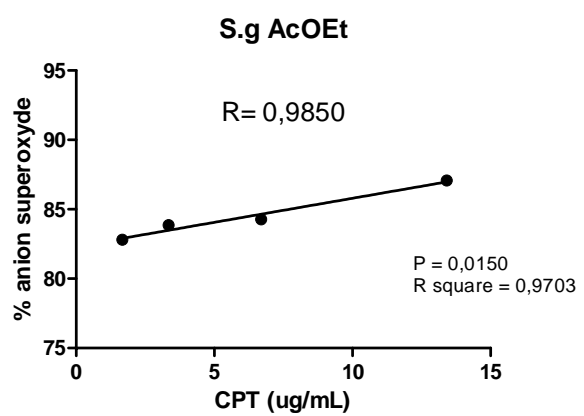
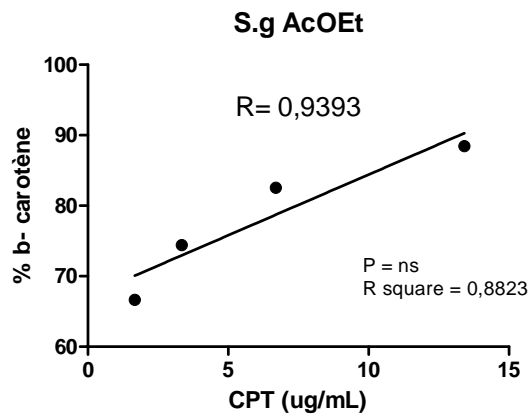
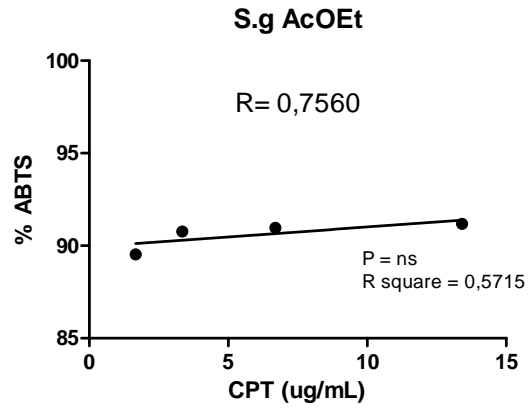
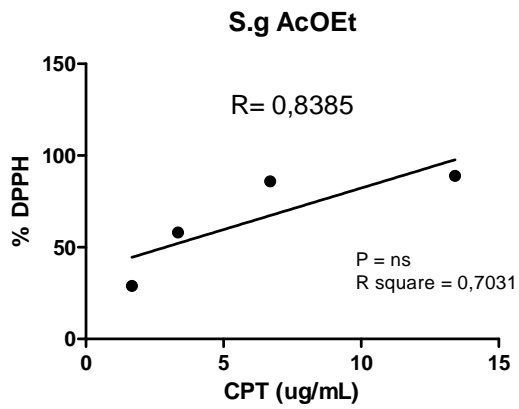
Zellagui A., Boutellaa S., Arab Y. et Gherraf N. (2014). GC/MS Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oil leaves *Thymus numidicus* Poiret. growing in Mila. *Journal of New Technology and Materials*, 4: 155-160.

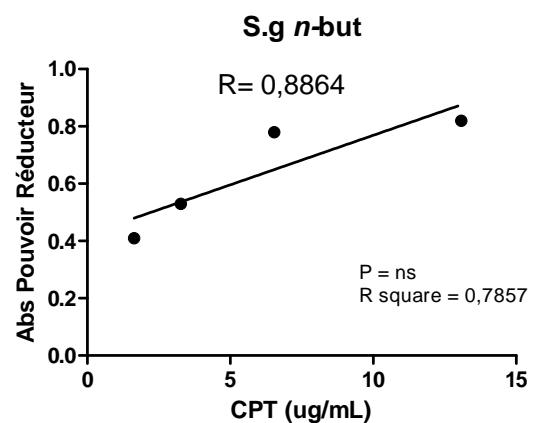
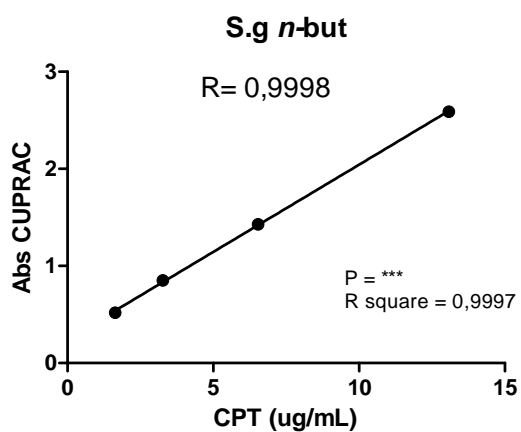
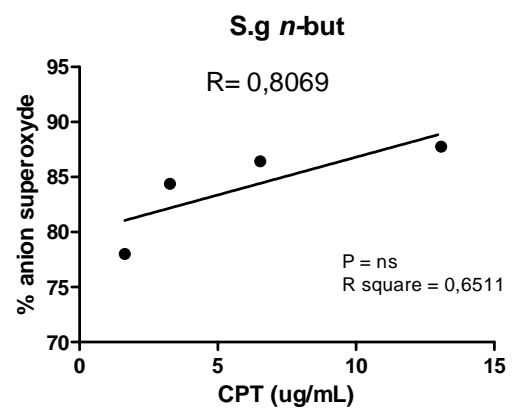
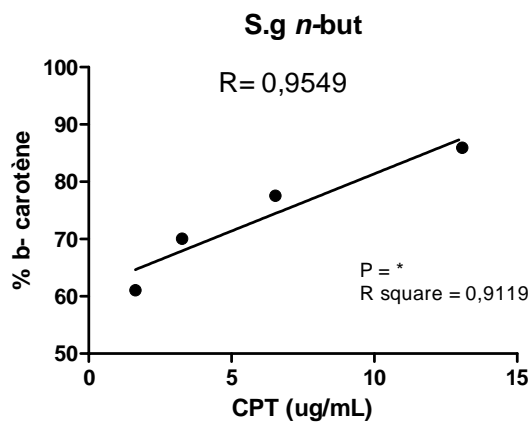
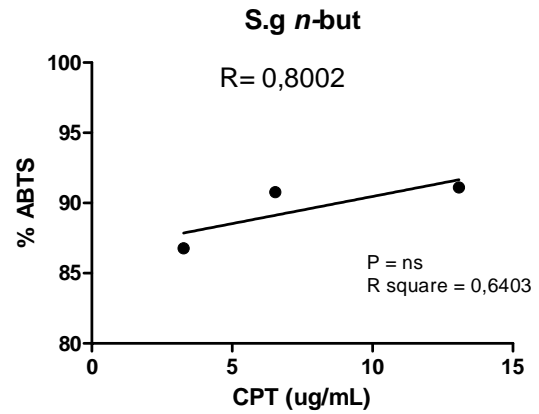
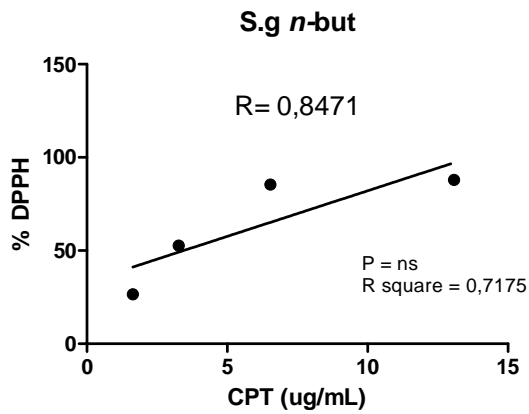
Zhao Y. et Zhao B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 1-10.

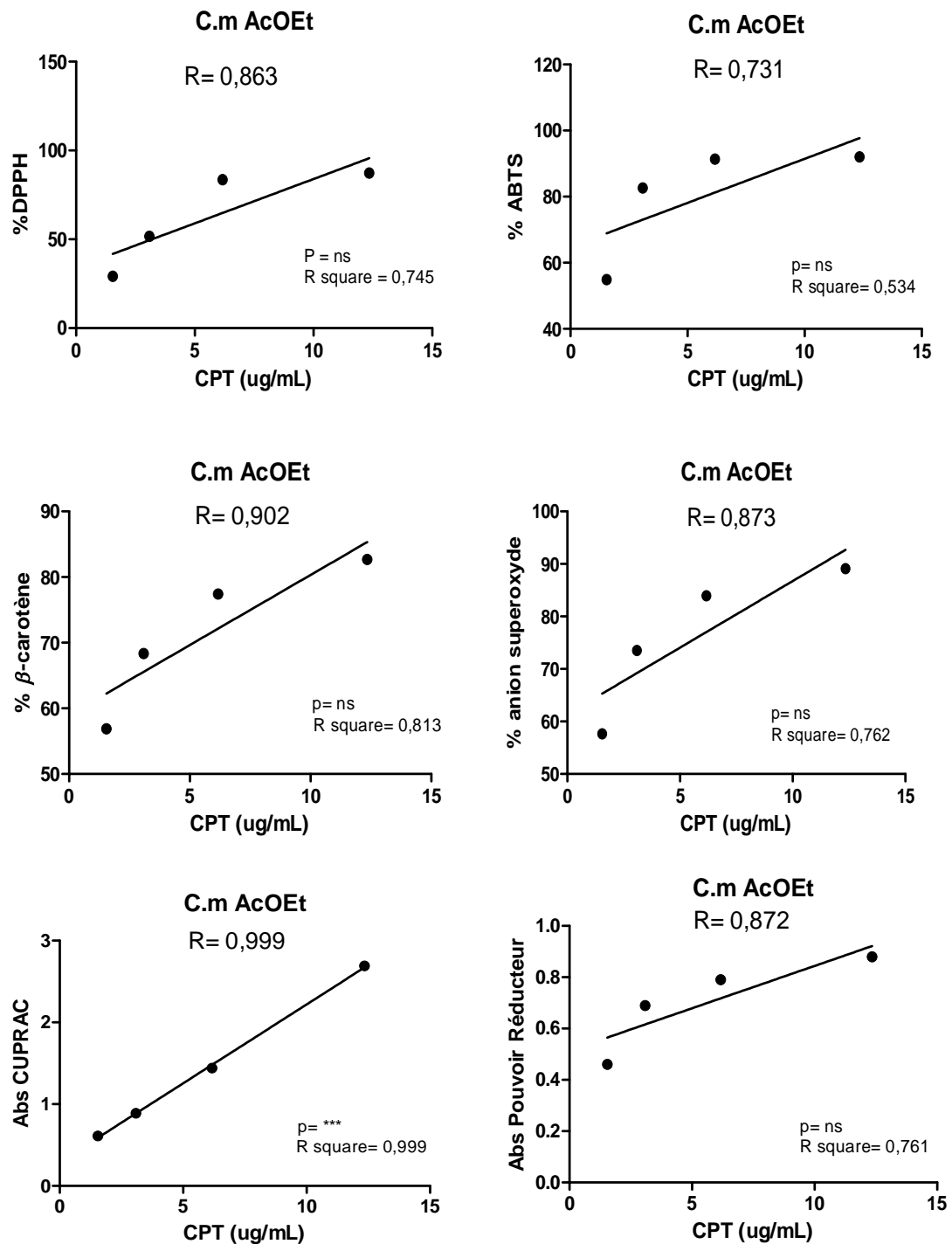
Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Bougatef A., Karray A., Neffati M., et Ayadi M. A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Food and Bioproducts Processing*, 89: 257–265.

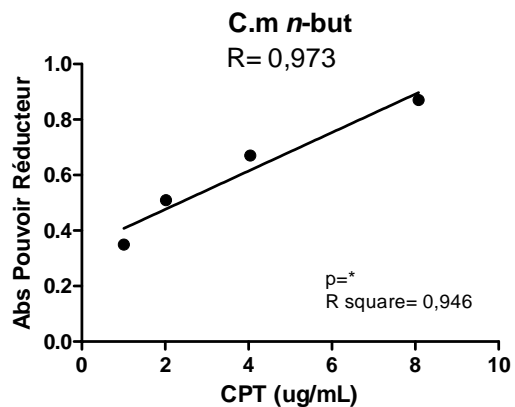
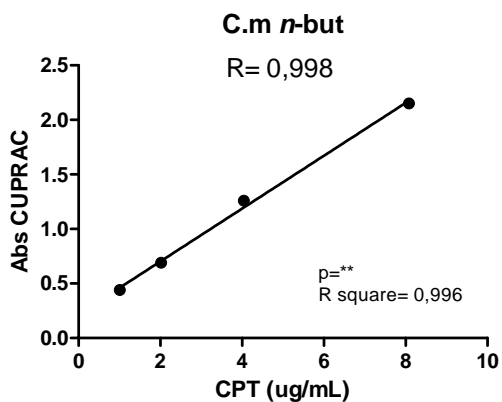
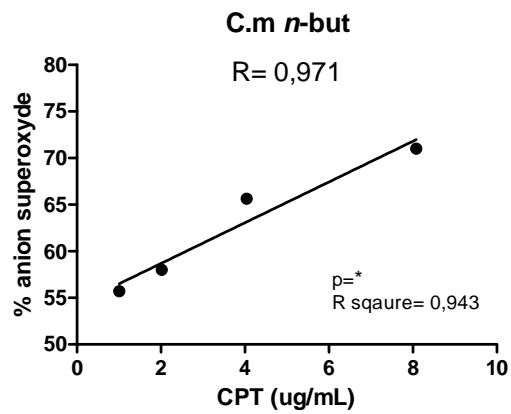
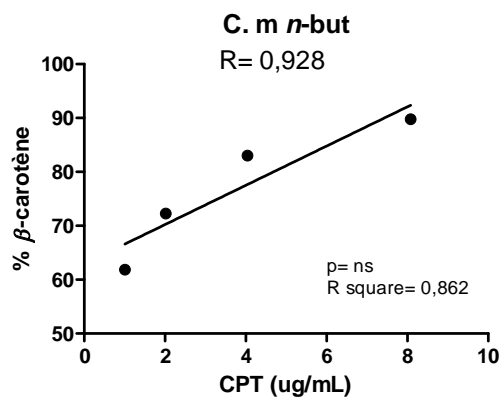
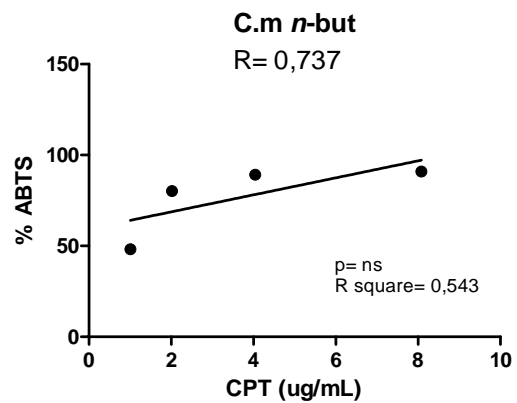
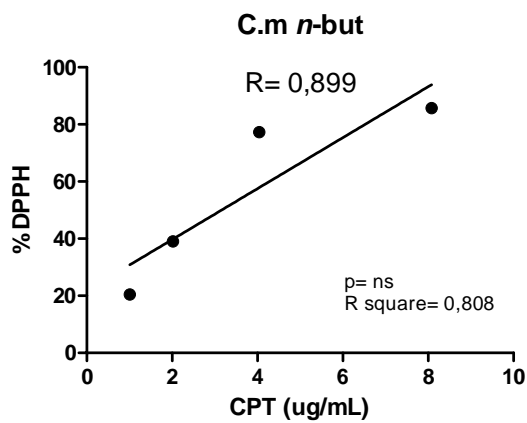
ANNEXES

Annexe 01 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique**Annexe 02** : courbe d'étalonnage de la quercétine.

Annexe 03 : Corrélation entre les CPT de la fraction AcOEt de *S. graeca* L. et les différents tests antioxydants

Annexe 04: Corrélation entre les CPT de la fraction *n*-but *S. graeca* L. et les différents tests antioxydants

Annexe 05 : Corrélation entre les CPT de la fraction AcOEt de *C. maritimum* L. et les différents tests antioxydants

Annexe 06 : Corrélation entre les CPT de la fraction n-but de *C. maritimum* L. et les différents tests antioxydants

Annexe 07 : Liste de publications et de communications sur le sujet

- **Pubication scientifique**

Saber Boutellaa, Amar Zellagui, Mehmet Öztürk, Chawki Bensouici, Özge Tokul Ölmez, Mouna Menakh, Mehmet Emin Duru (2019). HPLC-DAD profiling and antioxidant activity of the *n* butanol extract from aerial parts of Algerian *Crithmum maritimum* L., *Acta Scientifica Naturalis*, Vol 6, No1, Pages 8-16.

- **Communications internationales**

- 1- **Boutellaa Saber**, Zellagui Amar et MENAKH Mouna. *Crithmum maritimum* L.: Extraction, dosage et activité antioxydante. Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM-2018, Université d'ElOued, les 17 et 18 janvier **2018**.
- 2- **Boutellaa Saber** and ZELLAGUI Amar. Chemical composition and antibacterial activity of *Thymus numidicus* Poiret. aerial parts at different phenological stages. Séminaire International sur Phytodiversité et Plantes d'intérêt écologique et économique en Algérie. 29 - 30 OCTOBRE **2017**.
- 3- Amar Zellagui, **Saber Boutellaa**, Agena Ghout, Noureddine Gherraf, Ibrahim Demirtash and Salah Ghouati. Seasonal variation of Essential Oils Composition from *Thymus numidicus* and their antioxidant and Antimicrobial Effects. 6th International Chemistry Conference. King Saoud University. 08-10 November **2016**.

Acta Scientifica Naturalis

Former Annual of Konstantin Preslavsky University – Chemistry, Physics, Biology, Geography
Journal homepage: asn.shu.bg

Received: 01.2019

Accepted: 02.2019

HPLC-DAD profiling and antioxidant activity of the *n*-butanol extract from aerial parts of Algerian *Crithmum maritimum* L.

Saber Boutellaa^{1,2*}, Amar Zellagui², Mehmet Öztürk³, Chawki Bensouici⁴, Özge Tokul Ölmez³, Mouna Menakh², Mehmet Emin Duru³

¹ Life and Nature Science Department, Science and Technology Institute, University center of Mila, 43000, Algeria

² Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Faculty of Sciences SNV, University of Larbi Ben Mhidi, 04000 Oum El Bouaghi, Algeria

³ Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Mugla Sıtkı Koçman University, 48121 Mugla, Turkey

⁴ Centre de Recherche en Biotechnologie, P.B E73/UV N°03 Ali Mendjeli Nouvelle Ville, 25000 Constantine, Algérie.

Abstract: In this study, phenolic compounds from *Crithmum maritimum* L. *n*-butanol soluble fraction were quantified and identified spectrophotometrically and by using HPLC-DAD technics. They equally investigated for their antioxidant potential utilizing six *in vitro* assays: DPPH, ABTS^{•+}, O₂^{•-}, Bleaching of β -carotene in linoleic acid, CUPRAC and Ferric reducing power. High amounts of total phenolics and flavonoids were recorded: $161.57 \pm 0.479 \mu\text{g GA}_{\text{eq.}} \cdot \text{mg}^{-1}$ and $31.56 \pm 0.291 \mu\text{g Q}_{\text{eq.}} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectively. Nine compounds among them hydroxycinnamic acid and hydroxybenzoic acid derivatives, coumarins and flavonoids were identified. Chlorogenic acid known for their various pharmacological properties was detected as major compound of the extract. Rutin, vanillin, *trans*-2-hydroxycinnamic acid, ellagic acid, ferrulic acid, 6,7 dihydroxy coumarin, methyl 1,4 benzoquinone and *trans*-cinnamic acid were also detected. The extract was found to exhibit strong antioxidant capacities in all systems. Based on these results, it is right to conclude the *n*-butanol extract is promising source of natural antioxidants.

Key words: *Crithmum maritimum* L.; HPLC-DAD; phenolics; flavonoids; antioxidant activity.

Introduction

Living organism produces free radicals spontaneously and in an excessive way, which conduct to the oxidative stress that would cause numerous pathological damages like cancer, neurodegenerative, cardiovascular and autoimmune diseases [1-4]. Natural antioxidants are group of substances able to enhance the organism's defense system. Vitamins, terpenes, alkaloids and phenolics isolated from medicinal plants were largely investigated to find natural antioxidants [5]. Phenolics are one of the most groups of phytochemicals studied in recent times due to their high and various biological activities. Phenolic acids, flavonoids, coumarins, stilbens, lignans, tanins and more of other phenolic compounds have been found to exhibit properties as anti-hypertensive, anti-inflammatory, antiproliferative, anticarcinogenic, antimicrobial and antioxidants [6- 8].

Crithmum maritimum L. belongs to the family Apiaceae, largely used as food ingredient and in traditional medicine in many countries since old times [9]. It mainly known as sea fennel, crest marine, marine fennel, rock samphire and sampier, a halophile aromatic plant grows wild on maritime rocks and occasionally on sands [10]. It is mostly distributed from Mediterranean and Black sea to the European

Atlantic coast [9, 11]. In Algeria, the genus *Crithmum* is represented by only the species *C.maritimum* L. [12]. Researches on this species demonstrated the presence of essential oils [11], phenolic compounds [13-16], Vitamins and minerals [17, 18], proteins and amino acids [19] and fatty acids [20].

The soluble phenolic constituents of the *n*-butanol fraction from *C. maritimum* L. have not been studied previously. The present research aimed to identify and quantify phenolic components present in the *n*-butanol extract from aerial parts of *C.maritimum* L. in full flowering stage using Folin Ciocalteu, aluminum chloride and HPLC-DAD analysis and to determine their antioxidant potential by different methods: DPPH[•], ABTS^{•+} and O₂^{•-} scavenging, lipid peroxidation, ferric reducing power and CUPRAC.

Material and methods

Plant material

Aerial parts of marine fennel (*Crithmum maritimum* L.) were collected in August 2016 at full flowering stage, in the region of Jijel North eastern of Algeria (36°47'16.33" N Lat., 5°38'53.45" E Long. and 3 m altitude). A voucher specimen (ZA / 144) was deposited at the laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Life Science and Nature Department, University of Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi, Algeria.

Preparation of the extract

The Powdered aerial parts of *C. maritimum* L. (50 g) were macerated with 80 % ethanol at room temperature for three times every 24 h and filtered to obtain hydro alcoholic extract, which was concentrated under reduced pressure (40°) to remove ethanol, and then successively extracted with increasing polarity solvents; *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. Obtained extracts were stored at 4°C until analysis.

Phytochemical analysis

Total phenolics and flavonoids Quantification

The colorimetric method using Folin Ciocalteu as reagent was followed to determine total soluble phenolics amount in the *n*-butanol extract from *C. maritimum* L. aerial parts [21]. The reaction mixture was constituted with 500 µL of extract at 250 µg/mL, 2500 µL of F.C reagent (1/10 in water) followed by 2000 µL of (20 g/l) sodium carbonate. After ninety minutes, the absorbance was measured at 760 nm. The concentration of phenolics was found using the equation of linear regression obtained from the standard calibration curve:

$$Y = 0.017x + 0.080 \text{ Gallic acid } (\mu\text{g}), R^2 = 0.996.$$

Flavonoid content of the extract was performed according to the method of aluminum trichloride showed by Miliauskas et al [22]. One milliliter of extract at 250µg/ml dissolved in methanol was added to one milliliter of 2% methanol solution of AlCl₃. The absorbance was read at 430 nm after incubation of ten minutes at ambient temperature. The concentration of flavonoids was calculated using the equation of linear regression obtained from quercetin curve:

$$Y = 0.042x + 0.037 \text{ quercetin } (\mu\text{g}), R^2 = 0.998.$$

HPLC-DAD screening of phenolics

Analysis of butanol extract and 27 standard phenolics were carried out using a Shimadzu reverse phase high performance liquid chromatography (Shimadzu Cooperation, Japan) system that consist of a Shimadzu model LC-20AT solvent delivery unit and a Shimadzu model SPD-M20A diode array detection system and were controlled by LC-solution software (CBM-20A System Controller Shimadzu). The column temperature was set at 35 °C. The chromatographic separation was performed on a Inertsil ODS-3 (4µm, 4.0 mm x 150 mm) column and Inertsil ODS-3 guard column, mobile phases were aqueous acetic acid 0.1% (A) and methanol (B). Gradient elution from 2% to 100% was performed as previously showed by Barros et al. [23] and Tel-Çayan et al. [24]. Stock solution of sample was prepared in methanol at 8 mg.mL⁻¹ and filtered with an Agilent 0.45 µm filter. The injected volume was 20 µL. Detection was carried out diode array detector (DAD) using 254 nm wavelength. The detected phenolics were characterized by comparison of their retention times and results were expressed as micrograms per gram of dry weight.

Determination of antioxidant activity

All tests were performed in 96-wells microplates using a (Perkin Elmer, Enspire) microplate reader. The results were established as 50% inhibition concentration (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) that means sample concentration providing 50 % activity (DPPH, ABTS, $O_2^{\cdot-}$ and β -Carotene-linoleic acid) and $A_{0.5}$ which corresponding the concentration indicating 0.500 absorbance (CUPRAC and Reducing power).

DPPH Free Radical Scavenging assay

The effect of the *n*-butanol extract and standard antioxidants (BHA and BHT) on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical was estimated according to the method of Blois [25]. Sample ($40 \mu\text{L}$; $6.25\text{--}200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added to $160 \mu\text{L}$ of DPPH methanol solution (10^{-4}M) in triplicate. The mixture was incubated for 30 min at room temperature, and then the absorbance was measured against a blank (methanol) at 517 nm. The percentage of DPPH scavenging effect was calculated using the equation:

$$\%I = [(A_1 - A_2)/A_1] \times 100$$

Where; A_1 and A_2 are respectively absorbance of negative control and sample.

ABTS Cation Radical Scavenging Assay

Butanol extract was tested against ABTS cation radical using the method of Re et al. [26]. Briefly, 7 mM ABTS solution in water was prepared, and then 2.45 mM potassium persulfate was added to generate ABTS cation radical, stored in the obscurity at room temperature for 12h. The absorbance of this solution was adjusted with H_2O to 0.700 ± 0.020 at 734 nm. In every well of microplate, $160 \mu\text{L}$ of this solution was added to $40 \mu\text{L}$ of sample and standards in triplicate. Methanol was used as negative control while BHT and BHA were used as standard antioxidants. The absorbance was read at 734 nm after 10 min of incubation at room temperature and inhibition percentage was then calculated according to the DPPH formula.

β -Carotene-linoleic acid assay

The method of Marco [27] was used to evaluate the β -carotene-linoleic acid bleaching activity of our extract. Briefly, 0.5 mg of β -carotene was dissolved in 1 mL of chloroform, mixed with $25 \mu\text{L}$ of linoleic acid and emulsified by $200 \mu\text{L}$ of Tween 40. After evaporation of chloroform under vacuum at 40°C , the residue was recuperated with 100 mL of distilled water saturated with oxygen. Absorbance was adjusted to (0.800 - 0.900) at 470 nm with oxygenated water. To $160 \mu\text{L}$ of this solution, $40 \mu\text{L}$ of sample at concentrations (6.25 – 200) $\mu\text{g/mL}$ and standards (BHA and BHT) was added. After incubation of two hours at 50°C , absorbance was measured at 470 nm and the bleaching ratio of β -carotene was determined as follows:

$$R = (\ln a_1/a_2)/t$$

Where; a_1 and a_2 were respectively absorbance at start of reaction (t_0) and after 120 min (t_{120}). Whereas, antioxidant activity (A %) was expressed as a percentage and calculated by the equation as bellow:

$$A\% = [(R_{\text{control}} - R_{\text{sample}})/ R_{\text{control}}] * 100$$

Superoxide anion radical scavenging assay

$O_2^{\cdot-}$ scavenging activity was measured by the alkaline DMSO method which monitored by Elizabeth and Rao [28] with some modification. This method is based on reducing Nitroblue tetrazolium (yellow color) into formazan (blue color) under generated alkaline DMSO. $130 \mu\text{L}$ of alkaline DMSO (prepared with dissolving 20 mg of NaOH in 100 mL of DMSO to generate $O_2^{\cdot-}$) was mixed with $40 \mu\text{L}$ of extract at different concentrations (6.25-200) $\mu\text{g/mL}$, and then add $30 \mu\text{L}$ of NBT (1 mg/mL in distilled water). α -tocopherol was used as standard and methanol was used as negative control. Absorbance was read at 560 nm after 10 min of incubation at room temperature, and percentage of $O_2^{\cdot-}$ inhibition was measured as shown with DPPH equation.

Reducing power assay

The reductive abilities of the extract were assessed using Fe^{3+} to Fe^{2+} reductive capacity as described by Oyaizu [29]. $10 \mu\text{L}$ of sample (1.562-50) $\mu\text{g/mL}$ was mixed with $40 \mu\text{L}$ of phosphate buffer (pH 6.6) and $50 \mu\text{L}$ of potassium ferricyanide (1%) (1 g of $K_3Fe(CN)_6$ in 100 mL H_2O), and then the mixture was incubated at 50°C for 20 min. $50 \mu\text{L}$ of trichloroacetic acid (10%), $40 \mu\text{L}$ H_2O and $10 \mu\text{L}$ ferricchloride

FeCl₃ (0.1%) were added to the mixture. Absorbance was measured at 700 against a blank (methanol). Results were given as absorbance and compared with those of BHT and BHA used as positive controls.

Cupric reducing capacity (CUPRAC)

The cupric reducing antioxidant capacity was determined using the method of Apak et al. [30] modified by Öztürk et al. [31] A mixture constituted for 60 µL ammonium acetate buffer (1M, pH 7.0), 50 µL of 7.5 mM neocuproin and 50 µL 10 mM (Cu Cl₂, 2H₂O) was prepared and then 40 µL of sample solution at concentrations (6.25-200) µg/mL was added to the initial mixture. After one hour of incubation at room temperature, the absorbance at 450 nm was read against a blank reagent. Standard antioxidants used in this test were BHT and BHA. Results were given as absorbance and A_{0.5} (µg/mL) values corresponding to the concentration indicating 0.50 absorbance intensity were assessed.

Statistical Analysis

All data and results were performed in triplicate and expressed as mean ± standard deviation (S.D).

Results

Total phenolics and flavonoids contents

According to the results shown in table (1), the amounts of total phenolics and flavonoids of *n*-butanol extract of *C.maritimum* L. were found to be important values with 161.57± 0.479 micrograms of gallic acid equivalent per mg of extract (µg GA_{eq}.mg⁻¹Ext) and 31.56± 0.291 micrograms of quercetin equivalent per mg of extract (µg Q_{eq}.mg⁻¹Ext). The extraction yield was determined to be 0.96 % in dry weight of plant.

Table 1. Determination of extraction yield, total phenolics and flavonoids contents in the *n*-butanol extract of *C. maritimum* L.

	Extraction yield (%)	Total phenolics (µg GA _{eq} .mg ⁻¹ Ext) ^a	Total flavonoids (µg Q _{eq} .mg ⁻¹ Ext) ^b
<i>n</i> -butanol extract	0.96	161.57± 0.479	31.56± 0.291

Results are expressed as means ± standard deviation of three measurements.

(a) Microgram of Gallic Acid Equivalent per milligram of extract.

(b) Microgram of Quercetin Equivalent per milligram of extract.

Identification and quantification of compounds by HPLC-DAD

Nine compounds including phenolic acids, flavonoids and coumarins were identified and quantified as figured in table (2). The most abundant compound detected in the *n*-butanol extract of *C.maritimum* L. was Chlorogenic acid (120.69 µg/g), followed by Rutin (30.44 µg/g), vanillin (6.04 µg/g), *trans*-2-hydroxycinnamic acid (5.76 µg/g), ellagic acid (3.01µg/g) and ferrulic acid (2.58 µg/g). Moreover, some compounds like 6,7 dihydroxycoumarin, Methyl 1,4 benzoquinone and *trans*-cinnamic acid were also noted in traces.

Table 2. HPLC-DAD analysis of the *n*-butanol extract of *C.maritimum* L.

N°	Compounds	Retention time (min)	composition (µg/g)
1	Methyl 1,4 benzoquinone	09.65	0.68
2	6,7 dihydroxy coumarin	11.62	0.23
3	Vanillin	14.89	6.04
4	Chlorogenic acid	17.05	120.69
5	Ferrulic acid	19.76	2.58
6	<i>trans</i> -2-hydroxycinnamic acid	21.98	5.76
7	Rutin	22.01	30.44
8	Ellagic acid	22.54	3.01
9	<i>trans</i> -cinnamic acid	24.52	0.01

Antioxidant activity

The results for antioxidant potential with six methods based on several mechanisms of action were represented in figure 1, as inhibition percentage as a function of concentration. The table 3, summarizes values of IC₅₀, A_{0.5} and percentage of inhibition at minimum concentration. Trough all graphs, the activity was increasing dose-dependent way at concentrations from 6.25 to 200 µg/ml. At minimum concentration, the *n*-butanol extract of *C.maritimum* L. show an interesting antioxidant activity compared with those of standard antioxidants in all tests. In DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{•-} and β-carotene tests; the extract gave values of IC₅₀ proximate to those given by the standards. On the other hand, in CUPRAC and Ferric reducing power tests; values of A_{0.5} were more important than had BHT.

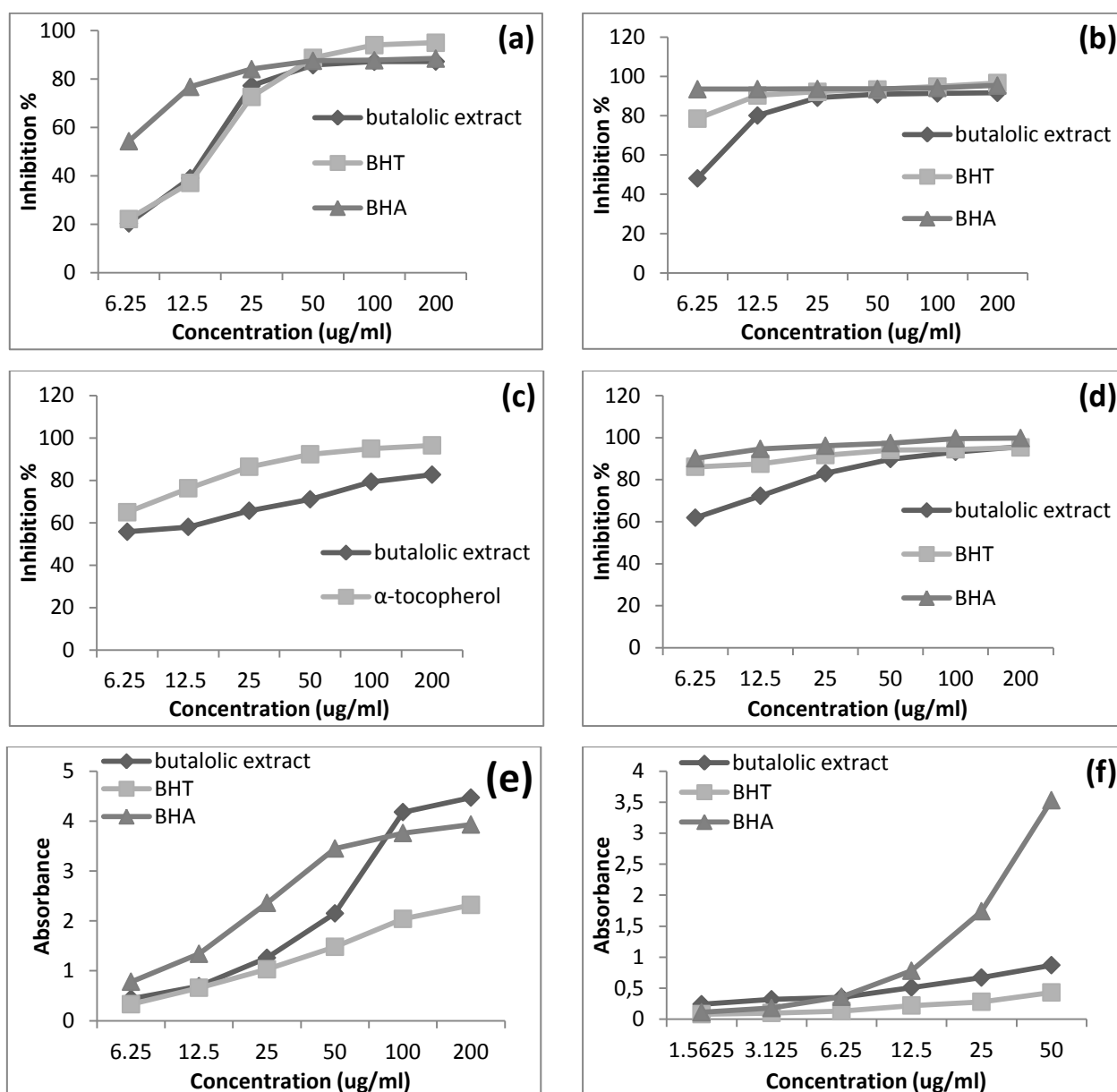


Fig. 1. Antioxidant activity; DPPH[•] scavenging (a), ABTS^{•+} scavenging (b), O₂^{•-} scavenging (c), Bleaching of β-carotene in linoleic acid (d), CUPRAC (e) and Ferric reducing power (f) of *C.maritimum* L. butanolic extract.

Assay		butanol extract	BHA	BHT	α -Tocopherol
DPPH [•]	I(%) at 6.25 μ g/mL	20.42 \pm 0.54	54.33 \pm 1.59	22.21 \pm 1.30	nt
	IC ₅₀ μ g/mL	16.07 \pm 0.39	5.73 \pm 0.41	12.99 \pm 0.41	nt
ABTS ^{•+}	I(%) at 6.25 μ g/mL	48.18 \pm 1.06	93.52 \pm 0.09	78.55 \pm 3.43	nt
	IC ₅₀ μ g/mL	6.94 \pm 0.40	1.81 \pm 0.10	1.29 \pm 0.30	nt
β -carotene-linoleic acid	I(%) at 6.25 μ g/mL	61.85 \pm 2.82	90.11 \pm 0.68	86.09 \pm 1.04	nt
	IC ₅₀ μ g/mL	1.87 \pm 0.03	0.90 \pm 0.02	1.05 \pm 0.01	nt
O ₂ ^{-•}	I(%) at 6.25 μ g/mL	55.72 \pm 3.04	nt	nt	64.92 \pm 1.01
	IC ₅₀ μ g/mL	3.46 \pm 0.28	nt	nt	3.19 \pm 0.40
CUPRAC	Abs at 6.25 μ g/mL	0.44 \pm 0.00	0.78 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	nt
	A _{0.50} μ g/mL	8.13 \pm 0.39	3.64 \pm 0.19	9.62 \pm 0.87	nt
Ferric reducing power	Abs at 6.25 μ g/mL	0.35 \pm 0.03	0.36 \pm 0.04	0.13 \pm 0.02	nt
	A _{0.50} μ g/mL	11.94 \pm 0.47	8.41 \pm 0.67	>50	34.93 \pm 2.38

Values expressed are means \pm S.D. of three parallel measurements, nt: not tested., BHA: Butylated-hydroxyl anisole, BHT: Butylated-hydroxyl toluene

Discussion

Phenolics are qualitatively and quantitatively one of the broadest groups of secondary metabolites described in literature, they are ubiquitous in green plants and are highly diversified [32]. The Apiaceae family is well known by its richness in phenolic compounds [33]. Aerial parts from *C.maritimum* L. were good extracted by polar solvent *n*-butanol and gave good amounts of total phenolics and flavonoids. The quantification of these compounds was well documented in previous studies about polar fractions (methanol and ethanol extracts) of the plant from aerial parts, separated organs, the same part of plant in different growing stages and the plant from different localities [13-16].

A diversified mixture of phenolic components was identified in the *n*-butanol extract from hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids and coumarins to flavonoids. It has been noted that chlorogenic acid was the main component of *n*-butanol extract, which were in accordance with Nabet et al. [14] who found a concentration of 6366 mg/Kg dw in the hydro-methanolic extract from aerial parts of the Algerian variety (Bejaia). In a study carried out by Generalic Mekinic et al [15] on separated organs from Croatian variety during flowering stage, concentration of chlorogenic acid in flowers, stems and leaves was estimated at 7.7 \pm 1.3, 0.7 \pm 0.0 and 8.1 \pm 0.1 mg/g of extract respectively. More recently, Generalic Mekinic et al [16] reported an amount of 5646.5 \pm 110.2 μ g/g of dry plant for chlorogenic acid in the ethanol extract from aerial parts at full flowering stage. The presence of chlorogenic acid in relatively high amounts in the plant kingdom as well as in species belonging to Apiaceae family was largely described in literature [15, 33, 34,]. There are many reports on biological activities of phenolic acids, coumarins and flavonoids, chlorogenic acid and derivatives have multiple properties including anti-inflammatory [06], antispasmodic [35], inhibition of the HIV-1 integrase [36], antibacterial and antioxidant [07]. In the same context, therapeutic potencies of flavonoids and coumarins as antioxidant, cardiovascular disease

protection, vascular fragility, antiinflammatory, neurodegenerative diseases prevention and anti-platelet aggregation were widely published [8].

The antioxidant activity was assessed using scavenging properties, chain breaking, reducing potential and redox assays. The *n*-butanol extract of *C.maritimum* L. was found to exhibit a strong antioxidant potential in all assays. Otherwise, moderate activity was reported by authors about methanol and hydromethanol extracts [13, 14, 16, 37, 38]. The antioxidant effect of the extract might be attributed to the high amount of phenolics especially chlorogenic acid as predominant active compound and also rutin, vanillin, *trans*-2-hydroxycinnamic acid, ellagic acid and ferrulic acid.

Conclusion

The *n*-butanol extract from aerial parts of *C. maritimum* L. with high amounts of soluble phenolics predominantly with chlorogenic acid as hydroxycinnamic acid derivative and other compounds with variable concentrations including rutin, vanillin, *trans*-2-hydroxycinnamic acid, ellagic acid and ferrulic acid was found to have good antioxidant activity obviously through scavenging several radicals, inhibiting of lipid peroxidation and reducing abilities. Also, this effect may be due to the synergistic action of present compounds. Our findings were very encouraging and motivating to pursue supplementary investigations in order to isolate and purify individual components that are conducting this act and further more to study *in vivo* biological activities.

Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria.

References

- [1] Aruoma, O. I., Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 199–212.
- [2] Montaigner, L.; Olivier, R.; Pasquier, C., Oxidative stress in Cancer. AIDS and neurodegenerative diseases, Eds., Marcel Dekker, New York, 157, **1998**.
- [3] Riboli, E.; Norat, T., Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk, *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 559–569.
- [4] Letelier, M.E.; Molina-Berrios, A.; Cortés-Troncoso, J.; Jara-Sandoval, J.; Holst, M.; Palma, K.; Montoya, M.; González-Lira, V., DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules, *Toxicol. Vitro.* **2008**, *22*, 279–286.
- [5] Li, A. N.; Li, S.; Li, H. B.; Xu, D. P.; Xu, X. R.; Chen, F., Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers, *J. Funct. Foods*, **2014**, *6*, 319–330.
- [6] Dos Santos, M.; Almeida, MC.; Lopes, N. P.; De Souza, G. E. P., Evaluation of the Anti inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid, *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 2236-2240.
- [7] Cheng, J.; Dai, F.; Zhou, B.; Yang, L.; Liu, Z., Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship, *Food Chem.* **2007**, *104*, 132–139.
- [8] Raffa, D.; Maggio, B.; Raimondi, M. V.; Plescia, F.; Daidone, G., Recent discoveries of anticancer flavonoids, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 213-228.
- [9] Coiffard, L., Aperçu historique sur l'utilisation médicinale et alimentaire du crithme maritime, *Revue d'histoire Pharmaceutique*, **1991**, *38*, 313-317.
- [10] Renna, M.; Gonnella, M., The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations, *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2012**, *1*, 111-115.
- [11] Males, Z.; Blazevic, N.; Plazibat, M., Variations in the yield and composition of the essential oil of *Crithmum maritimum* L., *Acta. Pharm.* **2001**, *51*, 81–84.
- [12] Quezel P. ; Santa, S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Eds. C.N.R.S, Paris, **1963**.
- [13] Meot-Duros, L.; Le Floch, G.; Magne, C., Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species, *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 258–262.

- [14] Nabet, N.; Boudries, H.; Chougui, N.; Loupassaki, S.; Souagui, S.; Burló, F.; Hernández, F.; Carbonell-Barrachina, A. A.; Madani K.; Lariat, R., Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts, *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, 1843-1855.
- [15] Generalić Mekinić, I.; Blazević, I.; Mudnić, I.; Burcul, F.; Grga, M.; Skroza, D.; Jercić, I.; Ljubenković, I.; Boban, M.; Miloš, M.; Katalinić, V., Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity, *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3104-3112.
- [16] Generalić Mekinić, I.; Šimat, V.; Ljubenković, I.; Burcul, F.; Grga, M.; Mihajlovski, M.; Lončar, R.; Katalinić, V.; Skroza, D., Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities, *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *124*, 947-953.
- [17] Franke, W., Vitamin C in sea fennel (*Crithmum maritimum*), an edible wild plant, *Econ. Bot.* **1982**, *36*, 163-165.
- [18] Coiffard L.; De Roeck-Holtzhauer, Y., *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae): Hydromineral composition and phytochemical screening, *Ann. Pharm. Fr.* **1994**, *52*, 153-159.
- [19] Coiffard L.; De Roeck-Holtzhauer, Y., Geographical and seasonal variations in protein content and free aminoacids of *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), *Acta. Bot. Gallica*, **1995**, *142*, 405-414.
- [20] Guil-Guerrero, J. L.; Rodríguez-García, I., Lipids classes, fatty acids and carotenes of the leaves of six edible wild plants, *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 313-316.
- [21] Singleton V. L.; Rossi, J.A.J., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Amer. J. Enol. Viticult.* **1965**, *16*, 144-158.
- [22] Miliauskas, G.; Venskutonis P.R.; Beek, T.A., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chem.* **2004**, *85*, 231-237.
- [23] Barros, L.; Duenas, M.; Ferreira, I.C.F.R.; Baptista P.; Santos-Buelga, C., Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species, *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1076-1079.
- [24] Tel-Çayan, G.; Öztürk, M.; Duru, M. E.; Rehman, M. U.; Adhikari, A.; Türkoglu A.; Choudhary, M. I., Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*, *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *76*, 749-754.
- [25] Blois, M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.
- [26] Re, R.; Pellegrini, A.; Proteggente, A.; Pannala, M.; Yang M.; Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237.
- [27] Marco, G.J., A rapid method for evaluation of antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1968**, *45*, 594-598.
- [28] Elizabeth K.; Rao, M.N.A., Oxygen radical scavenging activity of curcumin, *Int. J. Pharm.* **1990**, *58*, 237-240.
- [29] Oyaizu, M., Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine, *Jap. J. Nutr.* **1986**, *44*, 307-315.
- [30] Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek M.; Çelik, S. E., Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchim. Acta.* **2008**, *160*, 413-419.
- [31] Öztürk, M.; Kolak, U.; Topçu, G.; Öksüz S.; Choudhary M.I., Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation, *Food Chem.* **2011**, *126*, 31-38.
- [32] Havsteen, H.B., The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Ther.* **2002**, *96*, 67-202.
- [33] Pandey, M. M.; Vijayakumar, M.; Rastogi S.; Rawat, A.K.S., Phenolic content and antioxidant properties of selected Indian species of Apiaceae, *J. Herbs Spices Med. Plants*, **2012**, *18*, 246-256.
- [34] Upadhyay R.; Mohan Rao, L., An outlook on chlorogenic acids occurrence, chemistry, technology, and biological activities, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *53*, 968-984.
- [35] Farah, A.; De Paulis, T.; Trugo L. C.; Martin, P. R., Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1505-1513.
- [36] Robinson, W. E.; Reinecke, M. G.; Abdel-Malek, S.; Jia Q.; Chow, S. A., Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HPV integrase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, *93*, 6326-6331.

- [37] Houta, O.; Akrouf, A.; Neffati M.; Amri, H., Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial potentials of *Crithmum maritimum* cultivated in Tunisia arid zones, *J.B.A.P.N.* **2011**, *1*, 138-143.
- [38] Jallali, I.; Zaouali, Y.; Missaoui, I.; Smeoui, A.; Abdelly C.; Ksouri, R., Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetonetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L., *Food Chem.* **2014**, *145*, 1031- 1038.



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued

Faculté des Sciences Exactes

Séminaire International sur les Plantes Médicinales (SIPM-2018)

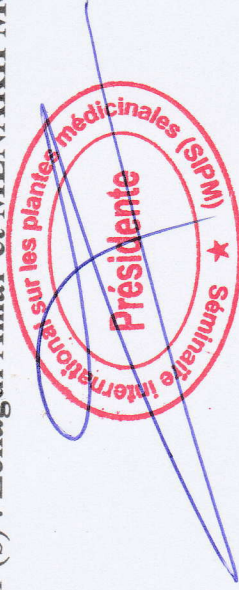
ATTESTATION DE PARTICIPATION

BOUTELLAA Saber

a présenté UNE COMMUNICATION PAR AFFICHE

au Séminaire International sur les Plantes Médicinales (SIPM –2018), organisé du 17 au 18 janvier 2018 à l'Université d'El-Oued, intitulée : «*Crithmum maritimum* L.: Extraction, dosage et activité antioxydante»

Co-auteur (s) : Zellagui Amar et MENAKH Mouna



Présidente du Séminaire

Dr. Naïma BENCHIKHA



SNV



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed Boudiaf de M'Sila

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

1985



جامعة محمد بوضياف - المسيلة
Université Mohamed Boudiaf - M'Sila

Séminaire International sur :
Phytodiversité et Plantes d'intérêt écologique et économique en Algérie
Inventaire, Conservation et Valorisation

Les 29 et 30 octobre 2017

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité scientifique du Séminaire atteste que :

Melle/Mme/Mr : **BOUTELLAA Saber**

A présenté une communication affichée

Intitulée : **Chemical composition and antibacterial activity of *Thymus numidicus* Poiret. aerial parts at different phenological stages**

Co Auteurs : ZELLAGUI Amar

Le Président du Séminaire

Dr. Khellaf REBBAS

Univ M. B. M'Sila
Faculté des Sciences / SNV

SIPA-ICV 29/30.10.2017



Le Doyen de la Faculté des Sciences

Dr. Ettayib BENSACI