

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des frères Mentour Constantine 1

Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie

N°d'ordre : 28/DS/2024

Série : 02/CH/2024

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Spécialité : Chimie Organique

Option : Phytochimie

Par

HAOUAT Ammar

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de
l'activité biologique des extraits de plantes appartenant à la
flore Algérienne**

Devant le jury :

Pr. Ramdane SEGHIRI	Université frères Mentouri Constantine 1	Président
Pr. Ratiba MEKKIOU	Université frères Mentouri, Constantine1	Directrice de thèse
Pr. Ouahiba BOUMAZA	Université frères Mentouri, Constantine1	Examineur
Pr. Lotfi BENMEKHBI	Université Salah Boubnider, Constantine3	Examineur
Pr. Mohamed DEHAMCHIA	Université Hama Lakhdar, Oued Souf	Examineur
Pr. Mohamed Said NEDJIMI	Université Kasdi Merbah, Ouargla	Examinatreur

Soutenu le : 23/06/2024

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement ALLAH, de m'avoir aidé à surmonter toutes les difficultés.

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Pr MEKKIOU Ratiba, Professeur à l'université de Constantine 1 qui a rendu possible ce travail. Son intérêt constant pour ce travail, ses conseils, ses encouragements, et sa disponibilité m'ont accompagné dans toutes les étapes de la réalisation de cette thèse.... Je lui témoigne mon respect et ma profonde considération.

Une partie de travail de cette thèse a été réalisé à l'Unité de recherche VARENBIOMOL de l'université des frères Mentouri Constantine 1 sous la direction du professeur Ramdhane SEGHIRI que je tiens à remercier pour ses encouragements et son soutien constant tout au long de la réalisation de ce travail et je le remercie également pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également les membres de mon jury :

Pr. Ouahiba BOUMAZA

Pr. Lotfi BENMEKHBI

Pr. Mohamed Said NEDJIMI

Et

Pr. Mohamed DEHAMCHIA

Je vous remercie et je vous témoigne ma gratitude et ma profonde considération.

J'adresse des remerciements particuliers aux professeurs Artur SILVA et Diana PINTO du campus de recherche QUPNA, Université d'Aveiro, Portugal où j'ai pu réaliser la majeure partie de cette thèse. Je leur remercie pour leur soutien, pendant toute la période de stage et surtout pour leur aide précieuse pendant la correction des articles.

Je remercie également toute personne qui m'a aidé directement ou indirectement dans la réalisation de ce travail : Pr. Susana CARDOSO, Pr. David PEREIRA, Chawki BENSOUICI, Adel KRID, Nadjah BELATTAR, Hicham HAZMOUNE, Monica VALEGA, Carlos, Ricardo et Catarina.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma famille, qui m'a toujours soutenu et encouragé tout au long de mon parcours. Je suis particulièrement reconnaissant envers mes parents, qui m'ont transmis des valeurs essentielles et m'ont inculqué le goût du travail et de la persévérance. Je remercie également ma tendre épouse, qui est mon pilier et ma source d'inspiration au quotidien. Enfin, je suis infiniment reconnaissant envers mes enfants, Mohamed Amine et Sama Lyne, qui apportent tant de joie et de bonheur dans ma vie.

Table des matières

I. Introduction	1
Références bibliographiques.....	4
II. Revue bibliographique	
II.1. La famille Cistaceae.....	7
II.1.1 Le genre <i>Cistus</i>	7
II.1.2. Description botanique de <i>C. salviifolius</i>	7
II.1.3. Classification botanique de <i>C. salviifolius</i>	8
II.1.4. Propriétés médicinales de <i>C. salviifolius</i>	8
II.1.5. composition chimique de <i>C. salviifolius</i>	9
II.2. La famille Lamiaceae.....	9
II.2.1. Genres <i>satureja</i>	9
II.2.3. Présentation de l'espèce <i>S. hispidula</i>	10
II.2.4. Description botanique.....	10
II.2.5. Habitat et distribution.....	11
II.2.6. Classification botanique de <i>S. hispidula</i>	11
II.2.6. Propriétés médicinales de <i>S. hispidula</i>	12
II.2.7. Composition chimique de <i>S. hispidula</i>	12
Références bibliographiques	13
III. Matériel & Méthodes.....	16
III.1. Réactifs.....	16
III.2. Matériel végétal.....	17
III.2.1. <i>C. Salviifolius</i>	17
III.2.2. <i>S. hispidula</i>	17
III.3. Extraction des huiles essentielles (HE).....	17
III.4. Teneur en molécules bioactives.....	18
III.5. Analyse de la composition phénolique par UHPLC-DAD-ESI-MSn.....	18
III.6. Analyse de la composition lipophile par GC-MS	19
III.7. Activité antioxydante.....	20
III.7.1. Détermination de l'activité de piégeage de DPPH.....	20
III.7.2. Détermination de l'activité de piégeage l'ABTS	20
III.7.3. Dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)	21
III.7.4. Test de la capacité réductrice des ions cuivrique (CUPRAC).....	21
III.7.5. Dosage du pouvoir réducteur	22
III.8. Activité anti-inflammatoire.....	22
III.9. Inhibition des activités des enzymes	23
III.9.1. Test de l'inhibition de l'enzyme α -Glucosidase	23
III.9.2. Test de l'inhibition de l'enzyme α -amylase.....	23
III.9.3. Inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE)	24
III.10. Activité antibactérienne	25
III.10.1. Souches bactériennes	25
III.10.2. Concentration inhibitrice minimale (CMI).....	25
III.11. Activité cytotoxique	25

III.11.1. Culture cellulaire.....	25
III.11.2. Évaluation de la viabilité des cellules.....	26
III.12. Docking moléculaire.....	26
III.12.1. Préparation de l' α -glucosidase et des ligands pour le docking moléculaire.....	26
III.12.2. Validation Docking.....	27
III.13. Analyse statistique	27
Références bibliographiques.....	28
IV. Résultats & Discussion	31
IV.1. L'espèce <i>C. salviifolius</i>	31
IV.1.1. Teneur en molécules bioactives.....	31
IV.1.2. Composition phénolique de l'extrait méthanolique de <i>C. salviifolius</i>	31
IV.1.3. Caractérisation par GC-MS	42
IV.1.3.1. Huile essentielle de <i>C. salviifolius</i>	42
IV.1.3.2. Composition de l'extrait chloroformique de <i>C. salviifolius</i> par GC-MS	52
IV.1.3.3. Composition lipophile de l'extrait éther de pétrole de <i>C. salviifolius</i> par GC-MS.....	57
IV.1.4. Activité Antioxydante... ..	62
IV.1.5. Activité anti-inflammatoire	63
IV.1.5. Inhibition des enzymes	64
IV.1.6. Activité antibactérienne	66
IV.1.7. Activité cytotoxique	68
IV.1.8. Etude docking moléculaire	69
Références bibliographiques.....	73
IV.2. L'espèce <i>S. hispidula</i>	80
IV.2.1. Teneur en molécules bioactives.....	80
IV.2.2. Caractérisation par UHPLC-DAD-ESI/MS des extraits de <i>S. hispidula</i>	80
IV.2.3. Caractérisation par GC-MS de l'espèce <i>S. hispidula</i>	93
IV.2.3.1. Huile essentielle de <i>S. hispidula</i>	93
IV.2.3.2. Composition lipophile de l'extrait hexanique de <i>S. hispidula</i>	100
IV.2.4. Activité antioxydante.....	105
IV.2.5. Activité Anti-inflammatoire	107
IV.2.6. Inhibition des enzymes	108
IV.2.7. Activité cytotoxique	110
Références bibliographiques.....	112
V. Conclusion & Perspectives	118

Liste des figures

Figure 1	Photographie de <i>C. salviifolius</i>	8
Figure 2	Photographie de <i>S. hispidula</i>	11
Figure 3	Chromatogramme UHPLC de l'extrait méthanolique de <i>C. salviifolius</i> enregistré à 280 nm	34
Figure 4	Principaux Fragments du Gentisoyl glucoside m/z 315 (A) et de l'Uralénéoside m/z 285 (B)	35
Figure 5	Principaux Fragments des flavonols aglycones : Quercetin m/z 315 (A), Apigénine m/z 315 (B), Rhamnetine m/z 315 (C), et isorhamnetine m/z 315 (D), Pinocembrin m/z 255 (E) et Castinine et m/z 373 (F)	38
Figure 6	Principaux fragments des flavones aglycones : Apigénine m/z 315 (A), Chrysériol m/z 299(B), et cirsiol m/z 329 (C)	39
Figure 7	Principaux fragments des flavanones aglycones : Pinocembrin m/z 255	40
Figure 8	Principaux fragments des flavonols aglycones : Myricétine 3- <i>O</i> -beta-D-galactopyranoside m/z 479 (A), Quercétine hexoside m/z 463 (B), Quercitrine m/z 463 (C), et Robinine m/z 739 (D)	41
Figure 9	Chromatogramme ionique total (TIC) de l'huile essentielle de <i>C. salviifolius</i>	42
Figure 10	Chromatogramme ionique total (TIC) de l'extrait chloroformique de <i>C. salviifolius</i>	52
Figure 11	Chromatogramme ionique total (TIC) de l'extrait éther de pétrole de <i>C. salviifolius</i>	57
Figure 12	Viabilité des cellules AGS et A549 exposées à l'extrait méthanolique de <i>C. salviifolius</i> (250 µg/mL) ou au milieu (témoin).	69
Figure 13	Superposition d'acarbose aux rayons X et meilleure pose d'amarrage dans le site actif de l' α -glucosidase.	70
Figure 14	Représentation 2D interactions de la quercétine avec l' α -glucosidase	71
Figure 15	Représentation 2D des interactions de la casticine avec l' α -glucosidase	71
Figure 16	Chromatogramme UHPLC des extraits éthanolique de <i>S. hispidula</i> enregistré à 280 nm.	84

Figure 17	Chromatogramme UHPLC des extraits éthanolique (a) et aqueux (b) de <i>S. hispidula</i> enregistré à 280 nm	85
Figure 18	Principaux fragments du 5-O-CQA m/z 353, composé majoritaire des extraits aqueux et éthanolique de <i>S. hispidula</i>	87
Figure 19	Principaux fragments du 4,5-O-diCQA m/z 515	88
Figure 20	Principaux fragments du Kaempferol-O-glucoside m/z 447	90
Figure 21	Principaux fragments de la Quercétine-O-acetyl glucoside m/z 505	90
Figure 22	Fragments principaux de l'acide rosemarinique m/z 359 et de l'Ophiopogonanone m/z 359	91
Figure 23	Chromatogramme ionique total (TIC) de l'huile essentielle de <i>S. hispidula</i> .	93
Figure 24	Viabilité des cellules AGS et A549 exposées à l'extrait éthanolique de <i>S. hispidula</i> (250 µg/mL) ou au milieu (témoin)	111

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification taxonomique des cistaceae	8
Tableau 2	classification taxonomique de <i>S. hispidula</i>	11
Tableau 3	Composition phénolique de l'extrait méthanolique de <i>C. salviifolius</i> par UHPLC-DAD-ESI/MS.	32
Tableau 4	Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>C. salviifolius</i> .	44
Tableau 5	Composition lipophile de l'extrait chloroformique de <i>C. salviifolius</i> (Données exprimées en µg composé/mg d'extrait)	54
Tableau 6	Composition lipophile de l'extrait éther de pétrole de <i>C. salviifolius</i> (Données exprimées en µg composé/mg d'extrait)	59
Tableau 7	Activité antioxydante (IC ₅₀ , µg/mL) des extraits de <i>C. salviifolius</i>	62
Tableau 8	Activité de piégeage de NO (IC ₅₀ , µg/mL) des extraits de <i>C. salviifolius</i>	63
Tableau 9	Résultat de l'inhibition des enzymes α-glucosidase, α-amylase et acétylcholinestérase par l'extrait méthanolique de <i>C. salviifolius</i> (la valeur IC ₅₀ correspondait à la concentration de 50 % de pourcentages d'inhibition)	64
Tableau 10	Les valeurs moyennes de CMI exprimées en µg/mL des extraits chloroformiques et éther de pétrole de <i>C. salviifolius</i> contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives.	67
Tableau 11	Énergies d'amarrage moléculaire de la quercétine et de la casticine	70
Tableau 12	Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits de <i>S. hispidula</i> .	80
Tableau 13	Composition phénolique des extraits éthanoliques et aqueux de <i>S. hispidula</i> par UHPLC-DAD-ESI/MS	82
Tableau 14	Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>S. hispidula</i>	95
Tableau 15	Composition de l'extrait hexanique de <i>S. hispidula</i> (Données exprimées en µg composé/mg d'extrait)	102
Tableau 16	Potentiel antioxydant de <i>S. hispidula</i> par les tests DPPH [•] , ABTS ⁺ et FRAP	106
Tableau 17	Activités de piégeage NO (IC ₅₀ , µg/mL) des extraits de <i>S. hispidula</i>	107
Tableau 18	Tests de l'inhibition des enzymes α-glucosidase et α-amylase par les extraits de <i>S. hispidula</i>	108

Introduction

I. Introduction

Après près d'un siècle d'étude sur les molécules issues de synthèse chimique, l'industrie pharmaceutique a repris son intérêt pour les substances bioactives des plantes médicinales comme source de nouvelles ressources thérapeutiques.

Contrairement au métabolisme primaire qui produit des molécules essentielles à la survie des plantes telles que les lipides et les glucides, le métabolisme secondaire est la source d'une variété de molécules biologiquement actives telles que les terpènes, les flavonoïdes et les phénols. Il a été démontré que bon nombre de ces substances sont responsables de différentes activités pharmacologiques notamment des effets analgésiques, sédatives, anti-inflammatoires, hypoglycémifiants, antimicrobiennes, antiparasitaires et antitumorales [1].

L'Algérie, considérée comme étant le plus grand pays du continent africain, possède l'une des biodiversités les plus riches de la planète, avec une flore estimée de 3000 espèces dont 15% sont endémiques [2]. Durant la dernière décennie, plusieurs chercheurs ont mené des études chimiques et pharmacologiques, sur ces espèces encore peu connues, dans le but de rechercher de nouvelles substances dotées d'activités biologiques pouvant être exploitées dans le domaine de l'industrie pharmaceutique pour l'élaboration de nouveaux traitements.

Cistus salviifolius est une espèce de la famille Cistaceae, largement répandue dans le nord African [3-4]. En Algérie, cette espèce est utilisée pour traiter diverses affections, telles que le diabète, les maladies rhumatismales et les maladies inflammatoires, ainsi que les troubles gastro-intestinaux [5-8].

Satureja hispidula Briq. (Lamiaceae), traditionnellement appelée sarriette est l'une des plantes médicinales endémiques d'Algérie pour laquelle plusieurs utilisations traditionnelles ont été rapportées [9-12]. Bien que des propriétés biologiques intéressantes aient été étudiées, principalement pour ses huiles essentielles, *S. hispidula* est encore considérée comme une espèce sous-explorée.

Dans le domaine de la phytochimie, l'identification et la quantification des substances bioactives d'origine végétales sont d'autant plus liées à l'utilisation d'outils analytiques puissants tels que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) ou (LC/MS en anglais) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie

de masse CG/SM ou (GC/MS en anglais). Cette dernière étant particulièrement utilisée pour l'analyse de composants aux propriétés apolaires tels que les huiles essentielles. Les composants aux propriétés polaires, tels que les composés phénoliques sont généralement analysés par la LC/MS, une technique caractérisée par sa capacité de haute résolution ainsi que sa fiabilité et sa précision.

Ainsi, la présente étude a été réalisée sur ces deux espèces différentes originaires d'Algérie et vise le criblage de leurs profils chimiques par LC/MS et GC/MS, l'investigation de leurs compositions en huiles essentielles, ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires, d'inhibitions enzymatiques, cytotoxiques et antimicrobiennes. Une étude *in silico* par docking moléculaire a également été réalisée pour examiner plus en détail les interactions entre les principaux composés identifiés dans les extraits de ces espèces et les enzymes α -glucosidase, α -amylase et acétylcholinestérase.

Cette étude a été divisée en de nombreuses sections différentes, logiquement liées, dont la première a été consacrée à une synthèse bibliographique résumant les caractéristiques botaniques ainsi que les utilisations thérapeutiques des deux espèces étudiées.

Le deuxième volet matériel et méthodes décrit succinctement la démarche employée dans cette enquête. Ainsi, une description concise des méthodes chromatographiques (LC/MS et GC/MS) utilisées pour l'élucidation et la quantification des constituents des deux espèces a été apportée. L'accent a été également mis sur les différents tests biologiques utilisés pour l'évaluation des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et cytotoxiques à l'égard des lignées cellulaires du cancer gastrique humain (AGS) et du cancer du poumon humain à petites cellules (A549), ainsi que les effets inhibiteurs de ces plantes à l'égard des enzymes métaboliques liées au diabète sucré à savoir l' α -glucosidase et l' α -amylase en plus de l'acétylcholinestérase, enzyme liée à la maladie d'Alzheimer. L'effet antibactérien a été évalué à l'égard de souches bactériennes obtenues de l'institut Pasteur d'Alger ou isolées d'échantillons pathologiques obtenus du Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine.

Dans le troisième volet de la thèse, les résultats obtenus, leur interprétation ainsi qu'une discussion détaillée ont été apportés.

Enfin une conclusion générale met en évidence les principaux résultats obtenus et leur rôle pour la valorisation du patrimoine national dans le domaine des plantes médicinales. Des perspectives de recherches ont aussi été dégagées.

Références bibliographiques

1. Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources: Types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4-14.
2. Chouaki, S., Bessedik, F., Chebouti, A., Maamri, F., Oumata, S., Kheldoun, S., Hamana, M. F., Douzene, M., Bellah, F., & Kheldoun, A. (2006). Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques. INRAA/FAO
3. Arrington, J. M., and Kubitzki, K. (2003). Cistaceae. In K. Kubitzki and C. Bayer (Eds.), *Kubitzki's The Families and Genera of vascular plants* (Vol. 5, pp. 62–70). Springer.
4. Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A., & Vanella, A. (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biology and Toxicology*, 16(2), 83-90.
5. Haouat, A. C., Sqalli, H., Farah, A., Haggoud, A., and Iraqui, M. (2013). Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytothérapie*, 11(6), 365.
6. Yesilada, E., Gürbüz, I., and Shibata, H. (1999). Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 289-293.
7. Sayah, K., Marmouzi, I., Naceiri Mrabti, H., Cherrah, Y., and Faouzi, M. E. A., (2017). Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia. *BioMed Res. Int.*, 1-7
8. El Euch, S. K., Bouajila, J., and Bouzouita, N. (2015). Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, 1100-1105.
9. Hamidpour, R., Hamidpour, S., Hamidpour, M., Shalari, M., and Sohraby, M. (2014). Summer savory: From the selection of traditional applications to the novel effect in relief, prevention, and treatment of a number of serious illnesses such as diabetes, cardiovascular disease, Alzheimer's disease, and cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4, 140–144.

10. Benarba, B. (2016). Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: An ethnobotanical study. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(4), 320-330.
11. Hamza, N., Berke, B., Umar, A., Cheze, C., Gin, H., and Moore, N. (2019). A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 238, 111841.
12. Momtaz, S., and Abdollahi, M. (2008). A systematic review of the biological activities of *Satureja* L. species. *Pharmacologyonline*, 2, 34–58.

Revue Bibliographique

II.1. La famille Cistaceae

Il s'agit d'une famille de plantes dicotylédones, composée de 200 espèces réparties en dix genres [1-5]. Elle est principalement présente dans la méditerranée, l'Afrique du Sud, l'Asie et l'Amérique du Nord. En Algérie, la famille Cistaceae est présente sur le littoral et le tell. Elle pousse sur les broussailles, les terrains siliceux, et les roches [6].

Les Cistacées sont des arbustes souvent épineux. Leurs feuilles sont simples et leur forme est variable, allant du lancéolé au linéaire. Les fleurs sont généralement grandes et colorées, à cinq pétales. Ce ne sont pas des solitaires ou des groupées en cymes. Les Cistacées sont des plantes à fleurs mellifères, et sont donc importantes pour les abeilles et autres pollinisateurs. Ils sont également utiles à des fins médicales.

II.1.1. Le genre *Cistus*

La famille Cistaceae comporte environ 20 genres et 200 espèces dont le plus important est le genre *Cistus* avec environ 150 espèces. Il s'agit d'arbustes répandues dans la méditerranée et l'Afrique du Nord. Les cistes sont des arbustes ou des petits arbres aux feuilles simples et aux fleurs voyantes, généralement blanches, jaunes ou roses. Certaines espèces, comme le Ciste ladanifère (*Cistus ladaniferus*), sont exploitées pour leur résine aromatique, le ladanum [3, 7, 8].

II.1.2. Description botanique de *C. salviifolius*

C. salviifolius, ou ciste à feuilles de sauge, est un arbrisseau très réappandu dans le bassin méditerranéen où il pousse dans les garrigues, les maquis ainsi que les pinèdes. C'est un arbuste buissonnant, au port prostré. Les feuilles sont opposées et pétiolées, ovales ou oblonges, réticulées, gaufrées et tomenteuses sur les deux faces [9].

Les fleurs de *C. salviifolius* sont solitaires ou groupées en petites cymes terminales. Elles sont blanches, avec cinq pétales et un centre jaune. La floraison est disponible de mai à juin [10]. Le fruit est une capsule globuleuse d'environ 5 à 8 mm de diamètre, contenant de nombreuses graines de forme oblongue ou ovoïde, d'environ 1 mm de long [3, 11].



Fig. 1. Photographie de *C. salviifolius*

II.1.3. Classification botanique de *C. salviifolius*

Le tableau 1 donne la classification systématique de l'espèce *Cistus salviifolius* [12].

Tableau 1. Classification de l'espèce *Cistus salviifolius* [12].

Embranchement	Spermaphytes
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta ou Angiospermes
Classe	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae
Genre	<i>Cistus</i>
L'espèce	<i>Cistus salviifolius</i>

II.1.4. Propriétés médicinales de *C. salviifolius*

C. salviifolius, ou ciste à feuilles de sauge, est utilisée en médecine traditionnelle depuis plusieurs siècles.

Les cistes sont fréquemment utilisés en médecine traditionnelle afin de traiter certains troubles de santé tels que la fièvre, la diarrhée, les maladies de peau, les rhumatismes et d'autres maladies inflammatoires [13]. En Algérie, les infusions et autres préparations de

C. salviifolius sont utilisées comme remèdes de troubles gastro-intestinaux, du rhumatisme et des maladies inflammatoires, ainsi que le diabète sucré.

Des rapports antérieurs ont été publiés décrivant les propriétés biologiques de *C. salviifolius*. Ainsi, il a été rapporté que les extraits de cette espèce présentent des propriétés antimicrobiennes [14], anti-ulcéreuses [15], anti-inflammatoires et analgésiques [16], antioxydantes., anticholinestérase, anti-superoxyde dismutase et cytotoxiques [17].

II.1.5. Composition chimique de *C. salviifolius*

Une étude de la composition de l'extrait des feuilles et tiges des espèces du genre *Cistus*, y compris *C. salviifolius* cultivé en Espagne, a été précédemment menée pour établir la relation entre le chémotype et le sous-genre sur la base de la composition en polyphénols de l'espèce [18-19]. Bien que des études sur le profil chimique et les propriétés biologiques de *C. salviifolius* aient été publiées, il n'existe aucun rapport LC-ESI-MS/MS disponible pour identifier et quantifier les constituants chimiques de cette espèce. À notre connaissance, aucune de ces études n'a porté sur l'évaluation de la composition lipophile des extraits apolaires de *C. salviifolius*.

De plus, il est bien connu que le climat influence fortement la composition et de des propriétés biologiques des espèces de plantes. Par conséquent, *C. salviifolius* algérien peut différer des espèces cultivées dans d'autres habitats et déjà caractérisées dans des études antérieures.

II.2. La famille Lamiaceae

Les Lamiaceae sont des plantes herbacées, arbustives ou arborescentes. Leurs feuilles sont simples, opposées ou verticillées, et leur forme est variable, allant du lancéolé au linéaire. Les fleurs sont généralement petites et colorées, à cinq pétales groupées en cymes [20].

Les Lamiacées sont des plantes à fleurs mellifères, et elles sont donc importantes pour les abeilles et autres pollinisateurs. Ils sont généralement utiles à des fins médicales, culinaires et ornementales.

II.2.1. Genre *Satureja*

Le genre *Satureja* comprend environ 200 espèces d'herbes aromatiques, très répandues dans les régions de la Méditerranée, de l'Amérique et du Sud ouest de l'Asie [21].

Les espèces du genre *Satureja* sont caractérisées par leurs feuilles ovales ou lancéolées, opposées et entières, et leurs fleurs bilabées, de couleur blanche, rose ou violette. Les fruits sont des tétrakènes, c'est-à-dire qu'ils se divisent en quatre parties à maturité.

Les espèces du genre *Satureja* sont connues pour leur utilisation dans la médecine populaire et dans la cuisine. Elles sont réputées pour leurs propriétés antiseptiques, antispasmodiques, digestives et diurétiques. Les feuilles et les fleurs des sarriettes sont également utilisées comme aromates en cuisine.

Parmi les espèces les plus connues du genre *Satureja*, on peut citer :

- *Satureja montana* (sarriette des montagnes)
- *Satureja hortensis* (sarriette des jardins)
- *Satureja thymbra* (sarriette de Crète)
- *Satureja subspicata* (sarriette d'été)
- *S. hispidula* (espèce endémique d'Algérie)

Les sarriettes préfèrent les sols légers et bien drainés, et les expositions ensoleillées. Elles se multiplient par semis ou par bouturage.

II.2.3. Présentation de l'espèce *S. hispidula*

S. hispidula, ou sarriette hérissée également appelée *Calamintha hispidula* [22], est une plante aromatique vivace endémique d'Algérie où elle s'étend dans les garrigues, les maquis et les pelouses.

II.2.4. Description botanique

S. hispidula est une plante vivace de type herbacé dont la taille varie de 20 à 40 cm. Ses tiges sont habillées, ramifiées et couvertes par des raides poils. Les feuilles sont lancéolées, vetues de poils et dont la taille varie de 1 à 3 cm

Les fleurs de *S. hispidula* sont petites, roses ou blanches, et groupées en cymes terminales. La floraison a généralement lieu du Juin jusqu'à Août.



Fig. 2. Photographie de *S. hispidula*

II.2.5. Habitat et distribution

S. hispidula pousse dans les forêts Nord Est Algérien. La répartition géographique de cette flore s'étend de la petite Kabylie jusqu'à les frontières de la Tunisie [23].

II.2.6. Classification botanique de *S. hispidula*

Le tableau 2 résume la classification taxonomique de *S. hispidula*

Tableau 2. Classification taxonomique de *S. hispidula* Boiss. et Reut. [23]

Règne	Plantae
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Satureja</i>
Espèce	<i>Satureja hispidula</i>
Synonyme	<i>Calmintha hispidula</i>
Nom commun	sarriette, baume sauvage, pouliot de montagne
Nom vernaculaire	Touret

II.2.6. Propriétés médicinales de *S. hispidula*

S. hispidula est une plante médicinale traditionnelle utilisée pour traiter une variété de troubles notamment les douleurs gastriques et les troubles digestifs, fatigue psychique, diarrhée, et stress. Elle possède aussi des propriétés vermifuges.

II.2.7. Composition chimique de *S. hispidula*

Aucune étude n'a été menée pour analyser la composition chimique de *S. hispidula* jusqu'à ce jour. Cependant, des données concernant les huiles essentielles de cette plante existent dans la littérature. (Sebti, et al) [24] rapportent que l'huile essentielle de *S. hispidula* est constituée principalement de menthone, d'oxyde de pipéritone (24,72 %), de pulégone (12,75 %) et de cyclohexanone.

Références bibliographiques

1. Christenhusz, M. J. M., and Byng, J. W. (2016). The number of known plant species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201-217.
2. Bedoya, L. M., Bermejo, P., and Abad, M. J. (2009). Anti-infectious activity in the Cistaceae family in the Iberian Peninsula. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 519-525.
3. Guzmán, B., and Vargas, P. (2009). Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography*, 36, 954-968.
4. Arrington, J. M., & Kubitzki, K. (2003). Cistaceae. In K. Kubitzki and C. Bayer (Eds.), *The families and genera of vascular plants* (Vol. 5, pp. 68-). Springer Berlin.
5. Dansereau, P. (1939). Monographie du genre *Cistus*. *Boissiera*, 4, 1-90.
6. Beniston, Nt., & Beniston, Ws. (1984). *Fleurs d'Algérie*. Entreprise Nationale du Livre. Alger. pp. 97-99.
7. Ellul, P., Boscaiu, M., Vicente, O., Moreno, V., & Rosselló, J. A. (2002). Intra- and interspecific variation in DNA content in *Cistus*. *Annals of Botany*, 90, 345–351.
8. Kamari, G., Blanché, C., & Siljak-Yakovlev, S. (2009). Mediterranean chromosome number reports 19. *Flora Mediterranea*, 19, 313-336.
9. Baillon, H. (1872). *Histoire des plantes, Monographie des Bixacées : Cistacées et Violacées*. Librairie Hachette, Paris. 356 p.
10. Markova, M. S. (1975). Haryosystematische Untersuchungen an den Cistaceae Bulgariens. *Plant Systematics and Evolution*, 123, 283-315.
11. Delgado, J. A., Serrano, J. M., López, F., and Acosta, F. J. (2008). Seed size and seed germination in the Mediterranean fire-prone shrub *Cistus ladanifer*. *Plant Ecology*, 197(2), 269-276.
12. Angiosperm Phylogeny Group [APG]. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1-20.
13. Attaguile, G., Russo, A., Compisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., and Vanella, A. (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biology and Toxicology*, 16(2), 83-90.

14. El Euch, S. K., Bouajila, J., and Bouzouita, N. (2015). Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, 1100-1105.
15. Haouat, A. C., Sqalli, H., Farah, A., Haggoud, A., and Iraqui, M. (2013). Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytothérapie*, 11(6), 365–372.
16. Sayah K, Marmouzi I, Naceiri Mrabti H, Cherrah Y, Faouzi MEA. (2017). Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia. *BioMed Res Int*,1-7.
17. Yeşilada, E., Gürbüz, I., and Shibata, H. (1999). Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(3), 289-293.
18. Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Roldan, C., Guillen, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., and Micol, V. (2011). A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochemical Analysis*, 22(4), 303-312.
19. Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M. L. A., Vincieri, F. F., and Pinelli, P. (2005). Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salviifolius* L. leaves. *Chromatographia*, 62(3-4), 245.
20. Ozenda, P. (1958). *Flore du Sahara*. Éditions CNRS, Paris, France.
21. Kaya, A., Satıl, F., and Göğöl, F. (2009). Nutlet surface micromorphology of Turkish *Satureja* (Lamiaceae). *Biologia*, 64(5), 902-907.
22. Dobignard, A., and Chatelain, C. (2010-2013). *Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord (5 Vol.)*. Genève : Conservatoire et Jardin botaniques de Genève.
23. Quézel, P., & Santa, S. (1962-1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome I, 2ème Ed.)*. CNRS, Paris, France.
24. Sebti, M., Zellagui, A., Lahouel, M., and Gherraf, N. (2013). Ethnopharmacology and essential oils composition of *Calamintha hispidula* (Boissier and Reuter) Maire. Growing in Algeria. *TBAP Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3(5-6), 339-344.

Matériel & Méthodes



III. Matériel & Méthodes

III.1. Réactifs

L'hydroxylanisolebutylé (BHA), le 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), le néocuproïne, l'acide trichloroacétique (TCA), et le ferricyanure de potassium ont été utilisés pour la détermination de l'activité antioxydante et ont été achetés auprès de Sigma Chemical Co. (Allemagne). Les produits chimiques suivants ont été utilisés pour les tests d'inhibition enzymatique: l'alpha-glucosidase, l'acide ascorbique, le 4-nitrophényl α -D-glucopyranoside (pNPG), l'alpha-amylase, le béta-nicotinamide adénindinucleotide (β -NADH), le phénazinéméthosulfate (PMS), le chlorure de bleu de nitrotetrazolium (NBT) et l'acide ascorbique ont été achetés auprès de la société Sigma, située à St. Louis, dans le Missouri, aux États-Unis, tandis que l'acarbose et l'amidon ont été achetés respectivement auprès de Fluka (Bucarest, Roumanie) et Fisher (Pittsburgh, PA, USA). Les produits suivants ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, États-Unis) : l'acétylcholinestérase (AChE), l'acétylthiocholine iodée et le donépézil. Le nitroprussiate de sodium, la sulfanilamide et l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) ont été obtenus auprès d'Acros Organics (Hampton, NH, USA). L'acide gallique, le réactif de FolinCioCalteu (FC), et le Na_2CO_3 ont été achetés chez Panreac (Barcelone, Espagne).

Les standards utilisés pour l'élucidation des composés phénoliques et pour l'élaboration des courbes d'étalonnage ont été obtenus auprès d'EXTRASYNTHÈSE (Genay Cedex, France). L'acétonitrile de qualité HPLC et l'acide formique ont été achetés chez Panreac (Barcelone, Espagne). Les produits suivants ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits : Le DMEM (Milieu Eagle modifié de Dulbecco), le sérum fœtal bovin (FBS), la solution de 0,05% de trypsine-EDTA, la solution de Hank (HBSS) et la solution de pénicilline-streptomycine (5000 unités/ml ; 5000 g/ml, respectivement) ont été achetés auprès de GIBCO (Invitrogen, NY, USA).

Tous les solvants employés pour l'extraction, y compris l'éthanol, le méthanol, l'hexane, l'éther de pétrole et le chloroforme, étaient de grade analytique.

III.2. Matériel végétal

III.2.1. *Cistus Salviifolius*

Des parties aériennes de *C. salviifolius* ont été collectées à Taref (Nord-Est de l'Algérie, 31° 56' 34" N, 1° 55' 52" O) en février 2018. Après collecte, les feuilles ont été séchées à température ambiante (25°C) puis réduites en poudre.

L'extraction a été réalisée selon la méthode de macération. La poudre sèche a été soumise à une extraction séquentielle en utilisant des solvants de polarité croissante. 500 grammes de poudre de *C. salviifolius* ont été macérés dans 1,5 L de l'éther de pétrole à température ambiante pendant 24 heures à trois reprises. Les filtrats résultants ont ensuite été éliminés et la poudre résiduelle a été séquentiellement extraite avec le chloroforme puis le méthanol. Chaque étape a été effectuée trois fois. Les filtrats de chaque solvant ont été concentrés à 30°C et stockés à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure. Trois extraits différents ont été obtenus : l'extrait éther de pétrole (EEP), l'extrait chloroforme (EC), et l'extrait méthanol (EM).

III.2.2. *Satureja hispidula*

Les parties aériennes de *S. hispidula* Briq. ont été collectés dans la zone de Jijel située dans le Nord-Est de l'Algérie (36° 40' 36" N, 5° 57' 09" E) en Mars 2019. Les feuilles ont été séchées à température ambiante (25°C) puis réduites en poudre en utilisant un broyeur électrique.

Des extractions séparées ont été réalisées en utilisant trois solvants : l'eau, l'éthanol et l'hexane. Pour préparer l'extrait aqueux, 10 g de poudre obtenue ont été mélangés à 200 ml d'eau et bouillis pendant 15 minutes avant filtration. La solution résultante a été congelée, lyophilisée et conservée à 4°C jusqu'à utilisation. Les extraits éthanol et hexane ont été préparés séparément à température ambiante en faisant macérer 10 g de matière végétale dans 200 ml d'éthanol et 200 ml d'hexane respectivement. Pour maximiser le rendement de l'extraction, une macération de 48 heures a été effectuée, répétée à trois reprises afin d'extraire la totalité des composés présents dans l'échantillon. L'éthanol et l'hexane ont ensuite été éliminés sous pression réduite.

III.3. Extraction des huiles essentielles (HE)

Les huiles essentielles des espèces *C. salviifolius* et de *S. hispidula* ont été obtenues par technique d'hydrodistillation en utilisant un appareil Clevenger. Pour chaque espèce, 250 g de

poudre sèche ont été ajoutés à 500 mL d'eau selon la méthodologie proposée par Teles et al [1]. Après extraction, le sulfate de sodium anhydre a été ajouté à l'huile essentielle collectée pour retenir l'eau résiduelle afin d'éviter les pertes par hydrolyse pendant le stockage. Les huiles essentielles obtenues ont ensuite été collectées et conservées à 4°C.

III.4. Teneur en polyphénols et flavonoïdes

Pour l'estimation de la teneur phénolique (TP), la méthode de Folin-Ciocalteu, décrite par Singleton, et al [2] a été utilisée. 15 µL d'extrait de plante (1 mg/mL) ont été mélangés à 15 µL de réactif de Folin-Ciocalteu et 60 µL d'H₂O. Après 5 min d'incubation, 150 µL d'une solution aqueuse de Na₂CO₃ à 20% ont été additionnées. L'incubation a été effectuée dans l'obscurité pendant 60 minutes puis l'absorbance a été mesurée à 760nm. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

La teneur en flavonoïdes (TF) a été évaluée à l'aide d'une technique légèrement modifiée précédemment rapportée par Türkoglu, et al [3]. En bref, un aliquote de 100 µL de chaque extrait a été combiné avec un volume de 100 µL d'une solution à 2 % de chlorure d'aluminium (AlCl₃). Après avoir incubé le mélange pendant 10 min à 25°C, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde égale à 415 nm. La teneur en flavonoïdes a été évaluée en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

III.5. Analyse de la composition phénolique par UHPLC-DAD-ESI-MSn

Chacun des extraits éthanol et aqueux de *S. hispidula* ainsi que l'extrait méthanol de *C. salviifolius* ont été analysés en utilisant un chromatographe liquide analytique (Dionex Co., San Jose, CA) équipé d'un détecteur DAD couplé à un spectromètre de masse de type Thermo LTQ XL muni d'une source d'ionisation fonctionnant au mode négatif. La colonne utilisée était une C18 hypersil Gold (Thermo Scientific, USA). Les éluants utilisés étaient un mélange d'une solution aqueuse d'acide formique à 0,1 % (v/v) (A) et de l'acétonitrile (B). Le volume d'injection et le débit étaient respectivement de 10 µL et 0.2 mL/min. L'analyse complète couvrait l'intégralité de la plage de masse de 100 à 2000 m/z. Les données spectrales UV-Vis ont été acquises sur une plage de longueurs d'onde allant de 200 à 500 nm, et les profils chromatographiques ont été générés à 280 nm. Le système Thermo Xcalibur Qual Browser de

Thermo Scientific (USA) a été utilisé pour l'analyse et le traitement des différents spectres obtenus.

La méthode des étalons externes qui consiste à établir une relation de proportionnalité entre la réponse analytique et la concentration connue des solutions étalons, a été utilisée pour la quantification des composés identifiés dans chaque extrait. Les solutions étalons employées ont été préparées et analysées dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'analyse des échantillons.

La comparaison des temps de rétention et des données MS et UV des pics obtenus avec ceux des standards purs a permis de confirmer leur identification. Des données MS et UV issues de la littérature ont été également utilisées pour confirmer l'identification de ces pics.

III.6. Analyse de la composition lipophile par GC-MS

La composition lipophile des extraits chloroforme et éther de pétrole de *C. salviifolius* et de l'extrait hexane de *S. hispidula* ainsi que des huiles essentielles des deux espèces a été analysée avec un chromatographe gazeux de type Shimadzu lié à un détecteur de masse sélectif de type Agilent 5975. La séparation des molécules lipophiles a été effectuée sur une colonne capillaire de type DB-5 J & W de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 μm d'épaisseur de film. L'hélium était utilisé comme gaz vecteur avec un débit constant réglé à 35 cm/s.

Afin de les rendre compatibles avec l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), les extraits chloroforme et éther de pétrole de *C. salviifolius* ainsi que l'extrait hexane de *S. hispidula* ont subi une étape de silylation.

La silylation est une étape cruciale de préparation des échantillons pour l'analyse GC-MS, car elle permet de rendre les analytes présents dans les extraits thermostables et volatils, conditions nécessaires à leur séparation et identification par cette technique analytique. Ainsi, 20 mg de chacun de ces extraits ont été délayés dans un mélange composé d'un volume de 250 μL de dichlorométhane, un volume de 250 μL de pyridine, un volume de 200 μL d'étalon interne, un volume 250 μL de BSTFA et enfin un volume 50 μL de TMSCl. le mélange final a été soumis à une incubation à 70°C pendant une durée optimale de 30 minutes avant d'être injecté dans l'appareil GC-MS.

III. Matériel & Méthodes

La confirmation de l'identité des composés lipophiles a reposé sur une comparaison minutieuse de leurs spectres de masse avec des spectres de référence issus de bibliothèques spécialisées (Wiley, NIST) et de publications scientifiques.

Pour la quantification des composés lipophiles, une gamme de standards d'étalonnage représentatifs a été employée : l'eicosane, l'acide palmitique, le tétradécanol, le D-(+)-mannose, le mannitol et le cholestanol.

Pour assurer la précision et la fiabilité des résultats de quantification, la méthode de l'étalonnage interne a été employée pour quantifier les composés identifiés. Cette méthode repose sur l'ajout d'une quantité connue d'un composé de référence, appelé étalon interne, à l'échantillon et aux solutions étalons. Pour chaque composé cible ou étalon, le rapport entre son aire de pic et celle de l'étalon interne a été calculé et utilisé pour l'élaboration d'une courbe d'étalonnage utilisée pour déterminer la concentration des composés identifiés.

III.7. Activité antioxydante

III.7.1. Détermination de l'activité de piégeage de radical DPPH

Le potentiel antioxydant des extraits des espèces *C. salviifolius* et *S. hispidula* a été testé en inhibant le radical DPPH[•], comme décrit par Blois, et al. [4]. En bref, 250 µL de solution DPPH ($8,66 \times 10^{-5}$ M) ont été mélangés à 50 µL de chaque concentration d'extrait. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance a ensuite été lue à 517nm. Le contrôle négatif a été réalisé en substituant l'extrait par son solvant. Le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit :

$$\text{Effet piégeur du DPPH} = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \%$$

Où l'absorbance du contrôle est représentée par A_c , et l'absorbance de l'échantillon est représentée par A_s .

La concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) de l'échantillon a été déterminée, puis comparée à celle de l'acide ascorbique utilisé comme étalon de référence.

III.7.2. Détermination de l'activité de piégeage du radical ABTS

Le potentiel antioxydant des deux espèces a été également déterminé en utilisant le test de décoloration de l'ABTS décrit par Re, et al. [5]. En bref, 250 µL d'une solution d'ABTS^{•+} ont été mélangés à un volume de 50 µL de chaque échantillon puis incubés à l'obscurité pendant 20 minutes avant que l'absorbance soit lue à 734 nm. Le pourcentage de piégeage de l'ABTS^{•+} a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Effet piégeur de l'ABTS}^{\bullet+} = (Ac-As) / Ac \times 100\%$$

Avec Ac l'absorbance du contrôle et As.l'absorbance de l'échantillon.

La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'échantillon a été déterminée, puis comparée à celle de l'acide ascorbique utilisé comme étalon de référence.

III.7.3. Dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

Le potentiel antioxydant des extraits des espèces *C. salviifolius* et *S. hispidula* a été également mesuré par le test FRAP selon la technique décrite par Catarino, et al. [6]. Dans un processus colorimétrique lié au rédox, le fer ferrique incolore (Fe³⁺) est réduit en fer ferreux bleu vif (Fe²⁺) en utilisant les antioxydants présents dans les échantillons comme réducteurs. Une quantité de 200 µL d'échantillon/standard et 200 µL de ferrocyanure de potassium (1% p/v) ont été combinés simultanément et incubés à 50 °C pendant 20 minutes, après quoi, 200 µL de TCA (10% p/v) ont été ajoutés.

Par la suite, 75 µL du mélange ont été prélevés et déposés dans une plaque à 96 puits. Simultanément, 75 µL d'eau déminéralisée et 15 µL de chlorure de fer à une concentration de 0,1% w/v ont été ajoutés. Suite à la réduction du fer ferrique, une couleur bleue mesurable par colorimétrie à 690 nm est apparue.

III.7.4. Test de la capacité réductrice des ions cuivrique (CUPRAC)

Le test CUPRAC a été réalisé comme décrit par Oyaizu, et al. [7]. Cette méthode repose sur la réduction du cuivre (II) en cuivre (I) par les composés antioxydants présents dans l'échantillon, suivie de la complexation du cuivre (I) avec la néocuproïne (2,2'-dipyridyl-bis(2-hydroxyméthyl) méthane), formant un complexe coloré. L'absorbance de ce complexe à 450 nm est proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon.

III. Matériel & Méthodes

Quarante μL de chaque extrait de *C. salviifolius*, préparés à différentes concentrations, ont été incorporés à une solution réactionnelle pré-mélangée contenant 50 μL de chlorure de cuivre dihydraté ($\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) à une concentration de 10 mM, 50 μL de néocuproïne à une concentration de 7,5 mM et 60 μL de tampon acétate d'ammonium à une concentration molaire de 1 (1 M) et un pH de 7,0. Les mélanges réactionnels ont ensuite été incubés à l'obscurité pendant une heure, puis l'absorbance a été mesurée à 450 nm.

Les absorbances moyennes ont été tracées en fonction des concentrations et la valeur $A_{0,5}$, qui est la concentration fournissant 0,5 d'absorbance, a été ensuite déterminée et comparée à celle de BHA.

III.7.5. Dosage du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur a été évalué selon la technique d'Oyaizu et al. [8] avec de légères modifications. En bref, 40 μL d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et 50 μL d'une solution de ferricyanure de potassium à 1% (obtenue par dissolution de 1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100 mL d'eau) ont été additionnés à 10 μL d'extrait à différentes dilutions. Le mélange réactionnel a ensuite été incubé à 50°C pendant 20 minutes. Par la suite, 50 μL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, 40 μL d'eau et 10 μL de FeCl_3 à 0,1% ont été ajoutés. L'absorbance de ce mélange à 450 nm est proportionnelle à la capacité réductrice de l'échantillon.

Les absorbances moyennes ont été tracées en fonction des concentrations et la valeur $A_{0,5}$, qui est la concentration fournissant 0,5 d'absorbance, a été ensuite déterminée et comparée à celle de BHA.

III.8. Activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire des extraits a été déterminé selon la méthode décrite précédemment par Afonso, et al. [9] dans laquelle la capacité des extraits de plantes à agir comme piègeurs du radical NO a été mesurée.

En bref, un aliquote de 100 μL de chaque échantillon a été ajouté à 100 μL d'une solution de nitroprussiate de sodium (3.33 mM) dans du PBS 0.1M (pH 7.4). Après 10 min d'incubation sous une lampe fluorescente, 100 μL de réactif de Griess (préparé en mélangeant deux volumes égaux d'une solution à 1% de sulfanilamide et d'une solution à 0,1 % de

III. Matériel & Méthodes

dichlorhydrate de naphtyléthylènediamine dans 2,5 % d'acide phosphorique) ont ensuite été ajoutés au premier mélange. La lecture de l'absorbance a été faite à 562 nm.

Le pourcentage du piégeage du NO^{*} a été calculée comme suit :

$$\text{Effet piégeur du NO}^* (\%) = (\text{Ac}-\text{As}) / \text{Ac} \times 100\%$$

Où Ac est l'absorbance du contrôle, et As l'absorbance de l'échantillon.

La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'échantillon a été déterminée, puis comparée à celle de l'acide ascorbique utilisé comme étalon de référence.

III.9. Inhibition enzymatique

III.9.1. Test de l'inhibition de l'enzyme α -glucosidase

Le test de l'inhibition de l'enzyme α -glucosidase par les extraits éthanol et aqueux de *S. hispidula* ainsi que l'extrait méthanol de *C. salviifolius* a été réalisé en utilisant une version légèrement modifiée de la technique rapportée par Neto, et al. [10]. L'extrait (50 μ L) a été combiné avec une solution de 50 μ L de PNPG. La réaction a ensuite été démarrée en ajoutant 100 μ L de la solution de l' α -glucosidase au mélange. À 37°C, l'absorbance a été lue à 405 nm toutes les minutes pendant 20 minutes. Le contrôle négatif était obtenu en substituant l'extrait par son solvant.

Pour calculer le pourcentage d'inhibition, nous avons utilisé la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'enzyme} = [(\text{Ac}-\text{As}) / \text{Ac}] \times 100$$

Où l'absorbance du contrôle est représentée par Ac, et l'absorbance de l'échantillon par As.

La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'échantillon a été déterminée, puis comparée à celle de l'acarbose utilisé comme étalon de référence.

III.9.2. Test de l'inhibition de l'enzyme α -amylase

Le test de l'inhibition de l'enzyme α -amylase par les extraits éthanol et aqueux de *S. hispidula* ainsi que l'extrait méthanol de *C. salviifolius* a été réalisé en utilisant la technique précédemment publiée par Wickramaratne, et al. [11] avec des modifications mineures. Une quantité de 200 μ L de chaque concentration d'extrait était combinée avec 400 μ L d'une

III. Matériel & Méthodes

solution aqueuse d'amidon à 0,8 % (p/v) et le mélange a été incubé pendant 5 min à une température de 37°C. La réaction était démarrée par l'ajout de 200 µL de l'α-amylase. Après cela, 200 µL du mélange ont été combinés avec 600 µL de réactif d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). Une deuxième aliquote de 200 µL du premier mélange a été prélevée et mélangée avec le réactif DNS environ 15 minutes plus tard. Ensuite, 250 µL de chaque combinaison ont été chauffés à 100°C pendant 10 min avant que l'absorbance soit lue à 450 nm.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'enzyme} = [(Ac-As) / Ac] \times 100$$

Où la différence de l'absorbance entre le premier et le deuxième aliquote du contrôle est représentée par Ac, la différence de l'absorbance entre le premier et le deuxième aliquote de l'échantillon est représenté par As.

La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'échantillon a été déterminée, puis comparée à celle de l'acarbose utilisé comme étalon de référence.

III.9.3. Inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE)

Le test de l'inhibition de l'AChE par les extraits éthanol et aqueux de *S. hispidula* et de l'extrait méthanol de *C. salviifolius* a été réalisé en utilisant la procédure d'Ellman et al. [12], avec de légères modifications.

En bref, 150 µL de solution d'AChE (0,025 U/mL) ont été additionnés à 50 µL de chaque extrait. Après 5 minutes d'incubation à 37°C, un mélange de 50 µL de DTNB (0.5 mM) et 50 µL d'iodure d'acétylthiocholine (2,5 mM) a été ajouté. L'absorbance a été lue à 415 nm pendant 5 minutes et ceci toutes les 150s.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'enzyme} = [(Ac-As) / Ac] \times 100$$

Où Ac désigne l'absorbance du contrôle, et As l'absorbance de l'échantillon.

La concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de l'échantillon a été déterminée, puis comparée à celle du donépézil utilisé comme étalon de référence.

III.10. Activité antibactérienne

III.10.1. Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des extraits chloroforme et ether de pétrole a été testée sur des souches bactériennes appartenant aux espèces Gram-positives et Gram-négatives isolées à partir d'échantillons cliniques collectés au CHU de Constantine.

III.10.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le pouvoir antibactérien a été évalué en fonction de sa concentration minimale inhibitrice (CMI) évalué en utilisant la méthode de dilution sur gélose en utilisant un protocole standard modifié [13]. La CMI a été exprimée en µg/mL.

Une série de différentes dilutions de chaque extrait allant de 200 µg/mL et 1000 µg/mL a été préparée. Les suspensions bactériennes ont été obtenues par suspensions directes de colonies dans un bouillon Mueller-Hinton. L'absorbance de 1 mL de l'inoculum a été lue à 625 nm par un spectrophotomètre. La suspension d'organismes bactériens a ensuite été diluée dans un bouillon de type Mueller-Hinton pour obtenir un inoculum final de 5×10^7 UFC/mL.

Un volume de 2 millilitres de chaque dilution a été additionné à 18 mL de gélose Mueller-Hinton fondue dans des boîtes de Pétri. Après solidification, chaque gélose a ensuite été inoculée comme suit : une anse d'inoculation stérile a été plongée dans la suspension bactérienne et des stries ont été effectuées sur la surface de gélose. Enfin, les boîtes de pétri étaient ensuite incubées dans une étuve réglée à 37°C pendant 24 h. Les CMI des extraits ont été déterminées. Plus la CMI est basse, plus l'activité antibactérienne de l'extrait est importante.

III.11. Activité cytotoxique

III.11.1. Culture cellulaire

Des lignées cellulaires humaines de carcinome gastrique (AGS; Sigma-Aldrich), de carcinome du poumon (A549; ECACC, Salisbury, Royaume-Uni) et de kératinocytes humains (HaCaT; ATCC, Rockville, MD, USA) étaient utilisées afin d'évaluer l'effet cytotoxique des

III. Matériel & Méthodes

extraits éthanol et aqueux de *S. hispidula* ainsi que de l'extrait méthanol de *C. salviifolius*. Les cellules ont été cultivées comme décrit précédemment par Reчек, et al. [14].

La culture des cellules a été effectuée en couche uniforme dans un incubateur humide contenant 5 % de dioxyde de carbone à 37 °C. Les cultures ont été réalisées dans un milieu DMEM enrichi en glutamine (Gibco) auquel ont été ajoutés 1% du mélange streptomycine et pénicilline et 10% de FBS (Gibco). Les passages cellulaires ont été effectués de la manière suivante : les cellules sont lavées au HBSS additionné d'une solution de trypsine-EDTA à 0.25% (Sigma-Aldrich) pendant 3 minutes à 37 °C, remises en suspension avec 5 mL de milieu de culture et centrifugés à 1300 tours par min en attendant 3 minutes. Le culot cellulaire obtenu par centrifugation a été resuspendu dans le milieu de culture initial afin de permettre la poursuite de la culture cellulaire.

III.11.2. Évaluation de la viabilité des cellules

La viabilité des cellules AGS, A549 et HaCaT a été évaluée par une méthode utilisant la résazurine, décrite par Reчек, et al. [14]. Des cellules non traitées ont servi de contrôle négatif.

Une méthode à base de la résazurine a été choisie afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Les cellules AGS et HaCaT, et la lignée cellulaire ont été incubées pendant 24 h avant d'être exposées aux extraits de plantes pendant 24 h. Ensuite, la résazurine a été ajoutée et les plaques étaient encore incubées pendant 30 minutes. Le suivi de la fluorescence a été effectué à 560/590 nm dans un lecteur de microplaques de type Cytation™ 3 (BioTek, Winooski, VT, US).

III.12. Docking moléculaire

Afin de comprendre le mécanisme d'interaction entre la quercétine et la casticine, les deux principaux composés de l'extrait méthanol de *C. salviifolius*, et le site actif de l'enzyme α -glucosidase, une étude par docking moléculaire a été menée.

III.12.1. Préparation de l' α -glucosidase et des ligands pour le docking moléculaire

Tous les calculs du docking moléculaire ont été effectués avec les logiciels Autodock Vina et Chimera. La structure cristalline de l' α -glucosidase a été téléchargée de la banque de données sur les protéines (PDB : 3W37) [15]. Le programme Chimera a été utilisé pour la préparation

III. Matériel & Méthodes

de la protéine cible. Tous les résidus non standards, à l'exception du ligand co-cristallisé, l'acarbose, ont été récupérés. La molécule d'acarbose a été séparée de la structure protéique native pour la validation du protocole du docking. Toutes les molécules utilisées pour le docking ont été extraites de Pubchem ([//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)); Quercétine ID : 5280343 et Casticine ID : 5315263.

III.12.2. Validation Docking

Pour valider la simulation du docking avec AutodockVina, un redocking est nécessaire, qui consiste à ré-ancrer le ligand co-cristallisé (Acarbose) dans l' α -glucosidase. L'écart quadratique moyen (RMSD) quantifie l'écart entre la coordonnée atomique du co-cristal et la meilleure pose du docking générée par AutodockVina. Le protocole est validé avec une valeur RMSD inférieure à 2Å. La pose avec le score Vina le plus bas a été sélectionnée comme modèle de liaison le plus approprié entre le ligand et l' α -glucosidase. Tous les ligands ont été ancrés individuellement dans le fichier pdb de la protéine. Le site actif a été défini avec le logiciel Chimera comme une boîte centrée avec les coordonnées suivantes : center_x=-0.23, center_y=-1.51 et center_z=-22.47.

III.13. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel MINITAB version 16 (State College, PA, USA). Les résultats de trois tests indépendants ont été présentés sous forme de moyenne \pm écart type ($m \pm SD$). Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur les données, exprimées en moyenne \pm écart type ($m \pm SD$). Un test post hoc de différence honnêtement significative (HSD) de Tukey a ensuite été réalisé pour identifier les différences significatives entre les groupes, toujours avec un seuil de signification statistique de $p < 0.05$.

Références bibliographiques

1. Teles, S., Pereira, J. A., Santos, C. H. B., Menezes, R. V., Malheiro, R., Lucchese, A. M., and Silva, F. (2012). Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E Brown. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 247-252.
2. Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press.
3. Türkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., and Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(2), 267–273.
4. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26(1199-1200).
5. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
6. Catarino, M. D., Silva, A. M. S., Cruz, M. T., and Cardoso, S. M. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food Function*, 8(12), 3355–3365.
7. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of Japanese Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315.
8. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
9. Afonso, A.F., Pereira, O.R., Válega, M., Silva, A.M.S., and Cardoso, S.M. (2018). Metabolites and biological activities of *Thymus zygis*, *Thymus pulegioides*, and *Thymus fragrantissimus* grown under organic cultivation. *Molecules*, 23(7), 1514.

10. Neto, R. T., Marçal, C., Queirós, A. S., Abreu, H., Silva, A. M. S., and Cardoso, S. M. (2018). Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria* sp., *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as functional ingredients. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2987.
11. Wickramaratne, M. N., Punchihewa, J. C., and Wickramaratne, D. B. M. (2016). In-vitro alpha amylase inhibitory activity of the leaf extracts of *Adenanthera pavonina*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 466.
12. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(88-90).
13. EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing). (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Journal of Microbiology and Infection*, 6(1), 9-15.
14. Rechek, H., Haouat, A., Hamaidia, K., Allal, H., Boudiar, T., Pinto, D. C. G. A., Cardoso, S. M., Bensouici, C., Soltani, N., and Silva, A. M. S. (2021). Chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activities of an endemic species from Southern Algeria: *Warionia saharae*. *Molecules*, 26(17), 5257.
15. Tagami, T., Yamashita, K., Okuyama, M., Mori, H., Yao, M., and Kimura, A. (2013). Molecular Basis for the Recognition of Long-chain Substrates by Plant α -Glucosidases. *J. Biol. Chem.* 288, 19296.

Résultats & Discussion



IV. Résultats & Discussion

IV.1. L'espèce *C. salviifolius*

IV.1.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes

La teneur en polyphénols (TP) de l'extrait méthanol de *C. salviifolius* s'est avérée être égale à 110.09 ± 4.2 mg EAG/g d'extrait. La quantité de TP était significativement supérieure à celle de l'extrait chloroforme (56.90 ± 1.35 mg EAG/g d'extrait). Cependant, dans la teneur totale en flavonoïdes (TF), l'extrait chloroforme (47.49 ± 1.12 mg EQ/g d'extrait) a montré les meilleurs résultats, suivi par l'extrait méthanol (30.09 ± 0.25 mg EQ/g d'extrait).

De manière générale, les résultats des TP et des TF semblent être meilleurs que ceux trouvés par Mahmoudi, et al. [1], mais nettement inférieures à celles d'El Euch, et al. [2] et Sayah, et al. [3]. La méthode d'extraction, la zone et la période de collecte sont les principaux facteurs influençant les quantités de TP et de TF.

IV.1.2. Composition phénolique de l'extrait méthanol de *C. salviifolius*

La caractérisation des constituants phénoliques présents dans l'extrait méthanol de *C. salviifolius* a été réalisée par analyse UHPLC-DAD-ESI-MSn. La figure 3 montre le chromatogramme de l'échantillon analysé et enregistré en mode ion négatif à 280 nm. Le tableau 3 regroupe l'ensemble des informations essentielles pour l'identification et la quantification des composés analysés, incluant le temps de rétention, l'ion pseudomoléculaire, les fragments MS² les plus significatifs et les valeurs de quantification. Les composés détectés ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention et de leurs données de spectrométrie de masse avec des étalons de référence analysés dans des conditions identiques ou en les confrontant à des données MS et UV publiées dans la littérature.

Au total, vingt et un composés phénoliques, dont un ellagitanin, trois dérivés d'acide phénolique et dix-sept dérivés de flavonoïdes étaient détectés dans l'extrait méthanol de *C. salviifolius* (Tableau 3).

Tableau 3. Composition phénolique de l'extrait méthanol de *C. salviifolius* par UHPLC-DAD-ESI/MS.

Pic	TR (min)	λ_{\max}	[M-H] ⁻	MS ²	Composé identifié	Conc. Moy. ($\mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait)
1	3,43	206, 256	315	153	Gentiside d'hexoside	Tr
2	6,11	203, 264	285	153	Urallénoside	1,25±0,24
3	7,61	216, 259	1083	601, 781	Punicalagine	NQ
4	8,96	195, 217, 268	327	165	3,4-Dihydroxypropiophénone-3- β -D-hexoside	NQ
5	10,65	207, 259, 356	479	316, 317	Myricétine-3-O- β -D-galactopyranoside	3,93±1,55
6	11,70	207, 261, 350	463	301	Quercétine-hexoside	2,61±0,21
7	13,04	204, 223, 252, 346	447	301	Quercitrine (Quercétine-rhamnoside)	0,87±0,02
8	14,17	208, 225, 268, 311	625	479, 317	Myricétine-O-rhamnoside-O-hexoside	2,99±0,17
9	15,12	231, 267	609	463, 301	Quercétine-O-hexoside-O-rhamnoside	0,47±0,06
10	15,93	204, 225, 256, 363	301	179, 151, 257	Quercétine	4,86±0,15
11	16,90	275, 238	345	330, 331	Axillarine	1,53±0,07
12	17,66	236, 268	269	225, 149, 201	Apigénine	0,98±0,05
13	18,00	238, 268	299	284	Chrysoeriol	0,41±0,15
14	18,36	240, 263, 354	315	300, 301	Isorhamnétine	1,08±0,19
15	19,05	246, 354	329	314	Cirsiliol (6-méthoxylutéoline-7-méthyl éther)	1,09±0,04

Tableau 3. Composition phénolique de l'extrait méthanol de *C. salviifolius* par UHPLC-DAD-ESI/MS (Suite).

Pic	Rt (min)	λ_{\max}	[M-H] ⁻	MS ²	Composé identifié	Conc. Moy. ($\mu\text{g}/\text{mgd}'\text{extrait}$)
16	19,54	235, 266, 341	359	344, 329, 345	5,7,3-trihydroxy-6,4,5-triméthoxyflavone	1,40±0,05
17	19,97	237, 368	315	165, 193	Rhamnétine	0,58±0,01
18	20,09	235, 308, 270	739	285, 453, 593	Robinine 1	1,10±0,17
19	20,26	235, 355	739	285, 453, 593	Robinine 2	1,16±0,14
20	20,73	286, 239	255	213, 211, 151	Pinocembrine	NQ
21	21,07	263, 346	373	358	Castichine	4,00±0,01

Temps de Rétention (TR), ion pseudomoléculaire ([M-H]⁻), non quantifié (NQ), traces (Tr).

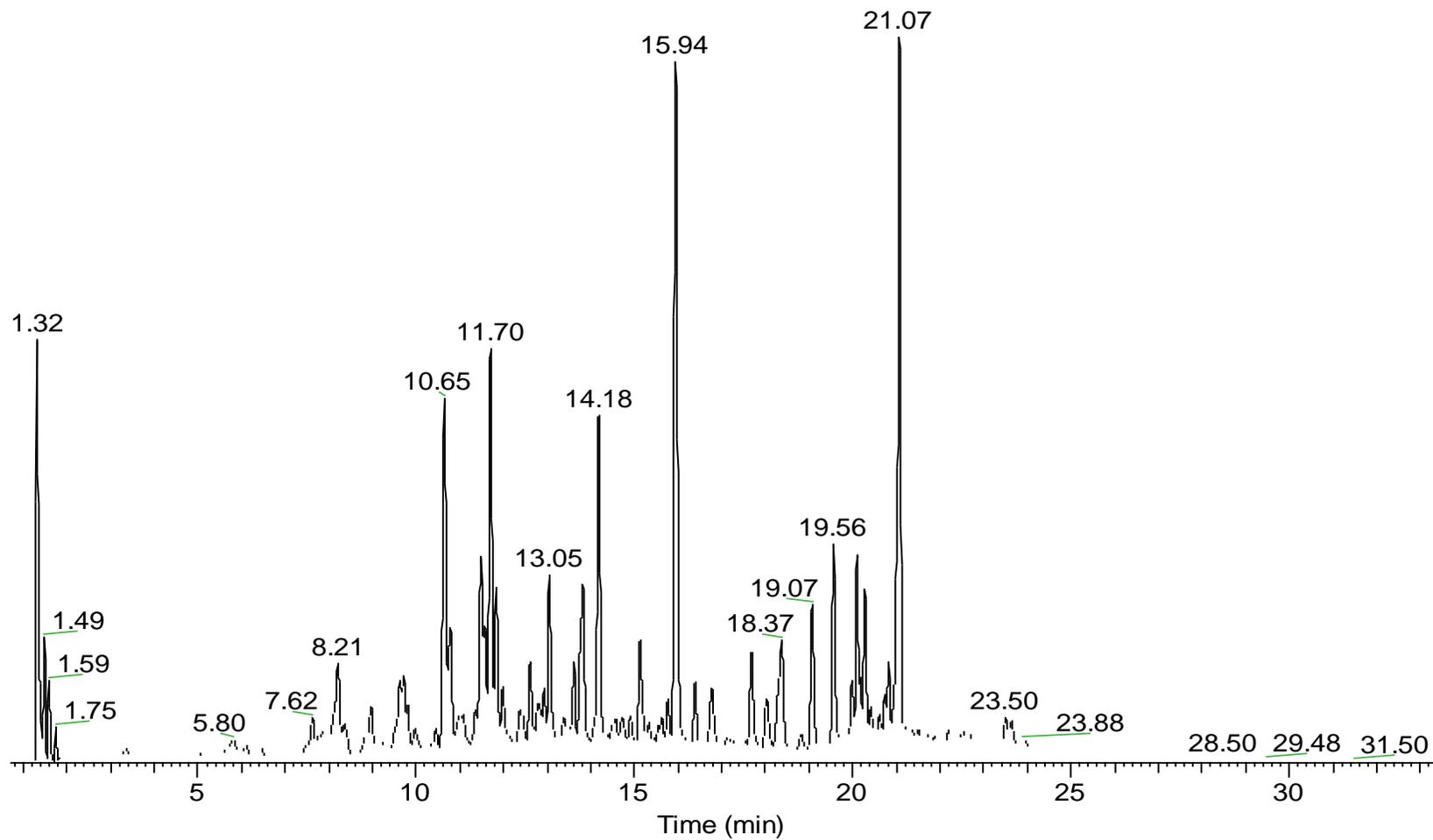


Fig. 3. Chromatogramme UHPLC de l'extrait méthanol de *C. salviifolius* enregistré à 280 nm.

Le pic 3 a été attribué à la punicaline sur la base de son schéma de fragmentation, montrant un ion $[M-H]^-$ à m/z 1083 et en le comparant avec les données précédemment rapportées par Seeram, et al. [4] et Fernández-Arroyo et al. [5].

Sur la base de leur schéma de fragmentation, trois dérivés de l'acide phénolique (pics 1, 2 et 4) ont été également identifiés. Le pic 1 présentait un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 315, libérant un fragment MS^2 à m/z 153 ($[M-162]^-$) en raison de la perte d'un fragment hexosyle, et a été attribué au glucoside de gentisoyl [5, 7]. Le composé 2 avec un ion $[M-H]^-$ à m/z 285 produisant deux ions fragments à m/z 153 et 109 résultant de la perte de l'unité acide hydroxybenzoïque et du groupe CO_2 du fragment acide carboxylique, respectivement, a été attribué à l'uralénoside comme précédemment rapporté par Yu, et al. [6]. Le pic 4 ($[M-H]^-$ à m/z 327) a été attribué au composé 3,4'-dihydroxypropiophénone-3- β -D-glucoside comme indiqué précédemment par Fernández-Arroyo et al. [5] et Barros, et al. [7].

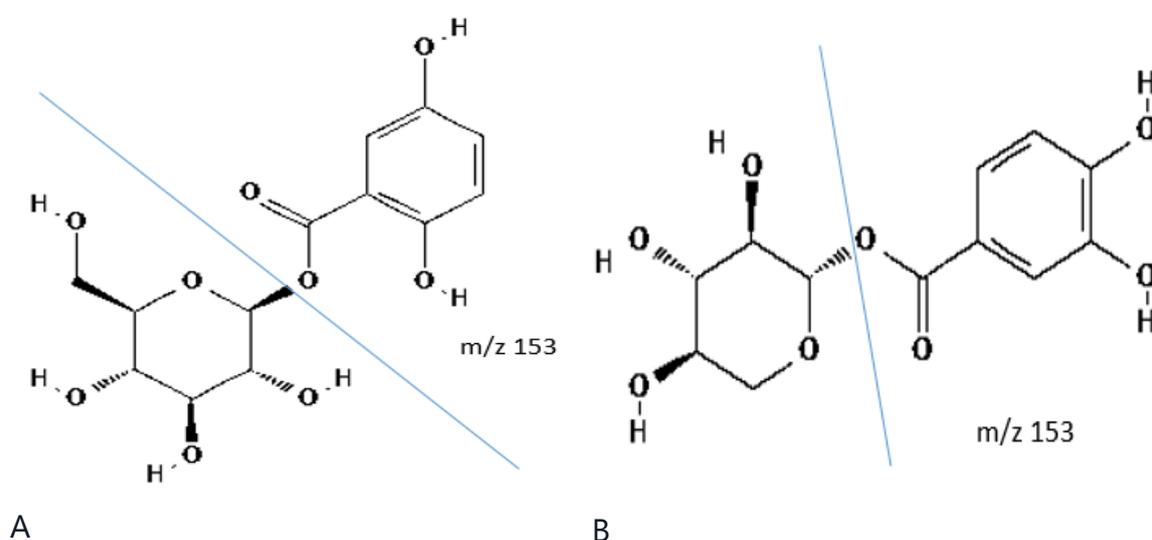


Fig. 4. Principaux fragments du Gentisoyl glucoside m/z 315 (A) et de l'Uralénoside m/z 285 (B)

Des flavonoïdes (pics 5 à 21), dont une flavanone (pic 20) et trois flavones (pics 11, 13 et 15), ont été également détectés dans l'échantillon étudié. Le pic 5 montrait un ion $[M-H]^-$ à m/z 479 et était attribué à la myricétine-*O*-galactopyranoside [8]. Cet ion a subi une

fragmentation en perdant le fragment hexosyle, produisant un pic à m/z 317 typique de la myricétine. Le pic 6 a été attribué à une flavone, la quercétine-*O*-hexoside ($[M-H]^-$ à m/z 463), libérant un fragment MS^2 à m/z 301 ($[M-H-162]^-$, quercétine, perte d'un fragment hexosyle) [7]. Le composé 7 présentait un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 447, libérant un fragment MS^2 à m/z 301 ($[M-146]^-$ résultant de la perte d'un fragment rhamnosyle (désoxyhexosyle)), correspondant à la quercétine, ce qui a permis l'identification du composé sous forme de quercitrine (quercétine-rhamnoside) [8, 9]. Le pic 8 présentait l'ion $[M-H]^-$ à m/z 625 produisant des fragments à m/z 301 ($[M-H-146]^-$ résultant de la perte du fragment rhamnosyle) et 479 ($[M-H-308]^-$ résultant de la perte du fragment rutinoside), conduisant à l'identification du composé comme étant la myricétine-*O*-rutinoside [10]. Le composé 9 a montré un ion $[M-H]^-$ à m/z 609 produisant de deux ions fragments, un à m/z 301 ($[M-H-146]^-$ résultant de la perte du fragment rhamnosyle) et l'autre à m/z 463 ($[M-H-146-162]^-$ résultant de la perte successive d'un résidu rhamnosyle et d'un hexose). Ce composé a été attribué à la quercétine-*O*-hexoside-*O*-rhamnoside [10-13]. Le pic 10 a été identifié comme étant la quercétine en raison de son spectre UV caractéristique et de son ion $[M-H]^-$ détecté à m/z 301, ainsi que des ions fragments typiques détectés à m/z 179 et 151.

Le pic 11 a été attribué à l'axillarine, qui présentait des ions $[M-H]^-$ à m/z 345 et des pics de base à m/z 330 résultant de la perte du groupe méthyle [14-15]. Le pic 12 a produit un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 269 et un fragment typique à m/z 225 et a été identifié comme étant de l'apigénine par comparaison de son schéma de fragmentation avec celui de l'étalon standard injecté dans les mêmes conditions. Le composé 13, présentant un ion $[M-H]^-$ à m/z 299, a été identifié comme étant du chrysoriol, donnant le pic de base à m/z 285 typique de la molécule déprotonée de la lutéoline [16]. Le composé 14 a été identifié comme étant l'isorhamnétine en comparant son spectre UV et son temps de rétention avec ceux d'un étalon commercial et avec des données de la littérature [17-18]. Le composé 15 présentait un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 329 libérant un fragment MS^2 à m/z 314 ($[M-H-15]^-$ par perte du fragment méthyle) a été identifié comme cirsiol (6-méthoxylutéoline-7-méthyléther) [14-15, 19]. Le pic 16 montrant un ion $[M-H]^-$ à m/z 359 et des fragments à m/z 344 et m/z 329 a été attribué au composé 5,7, 3'-trihydroxy-6, 4', 5'-triméthoxyflavone [17]. Le composé 17 montrant un ion $[M-H]^-$ à m/z 315 et un pic de

base à m/z 165 a été identifié comme étant la rhamnétine [20-21]. Sur la base de leur schéma de fragmentation MS et de la littérature rapportée, les pics 18 et 19 possédant tous les deux le même ion $[M-H]^-$ à m/z 373 mais élués à des temps de rétentions différents, ont été caractérisés comme étant des isomères de la robinine (kaempférol 3-*O*-robinobioside-7-*O*-rhamnoside), dans lesquels les fragments 593 ($[M-H-146]^-$, perte du fragment rhamnosyle) et 285 ($[M-H-146-308]^-$, perte des fragments rhamnosyl et robinobioside) peut être observée [22]. Le pic 20 a été attribué à la pinocembrine sur la base de son schéma de fragmentation montrant l'ion $[M-H]^-$ à m/z 255 et un pic de base à m/z 213 résultant de la perte de CH_2CO [15, 23]. Le pic 21 caractérisé par $[M-H]^-$ à m/z 373 et des fragments à m/z 358, 343, 328 et 313 résultant de la perte successive de quatre groupes méthoxy a été attribué à la casticine, une tétraméthoxyflavone [15].

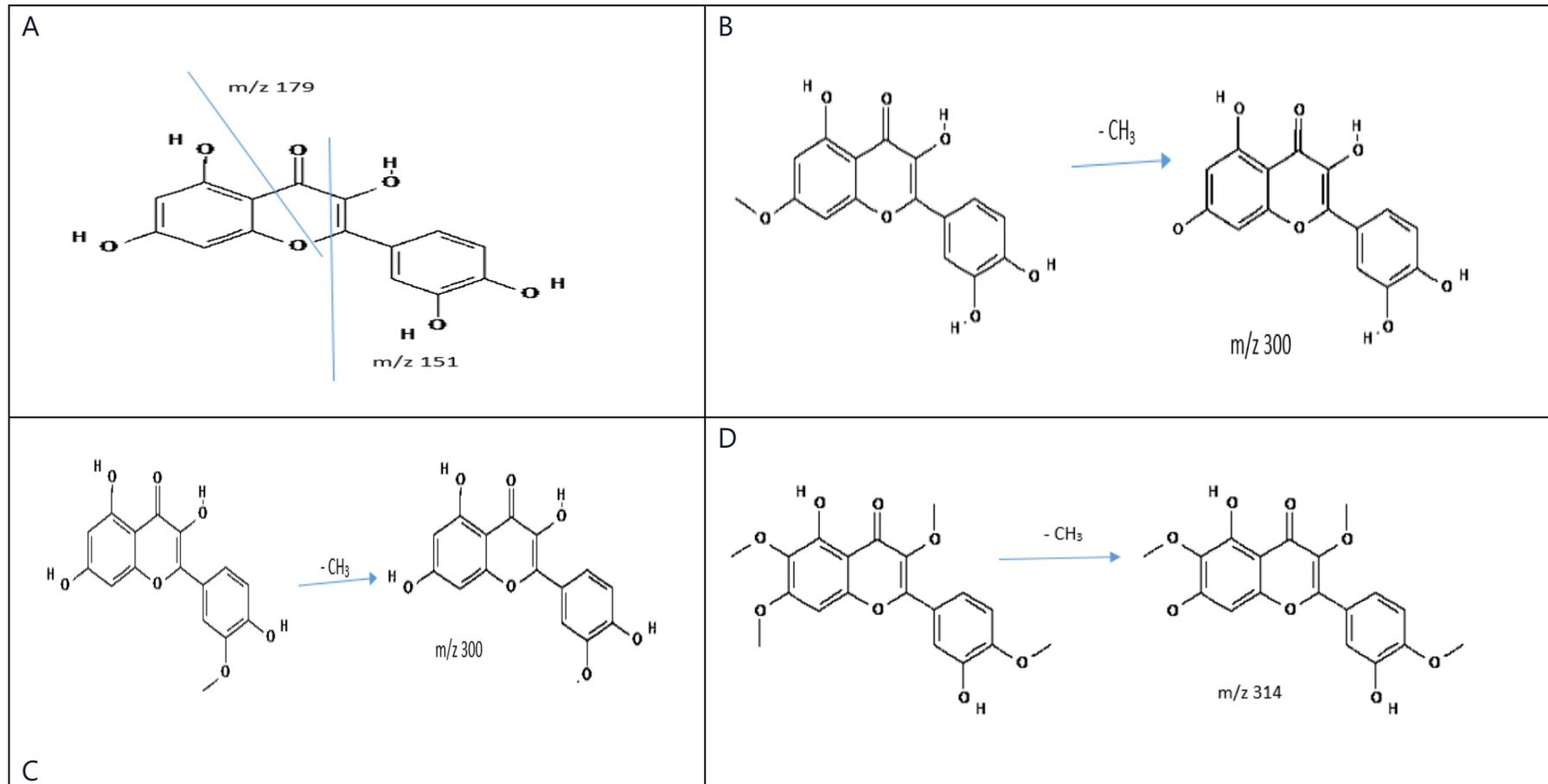


Fig. 5. Principaux fragments des flavonols aglycones : Quercétine m/z 315 (A), Rhamnetine m/z 315 (C), et isorhamnetine m/z 315 (D), et Castinine et m/z 373 (F)

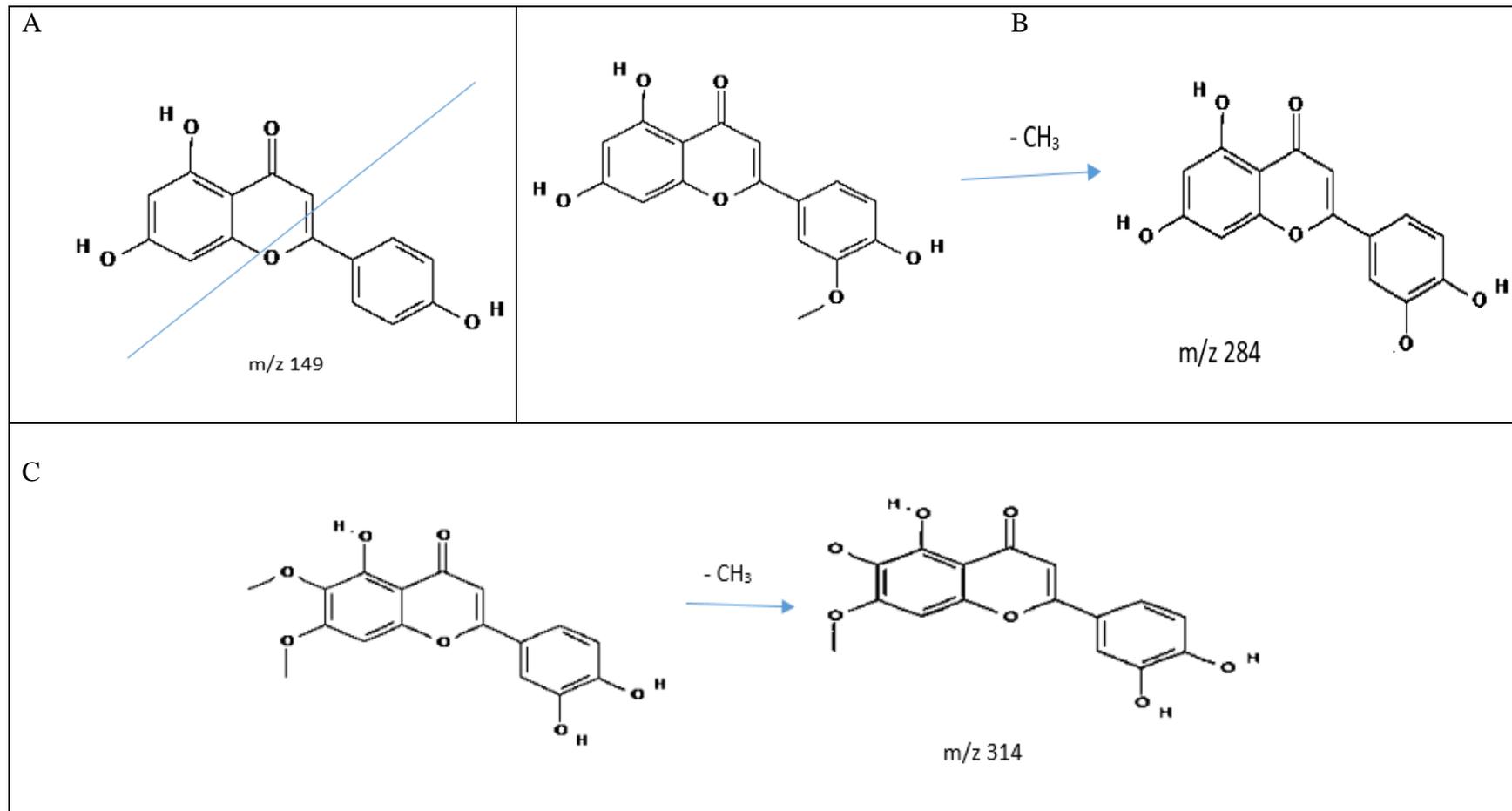


Fig.6. Principaux fragments des flavones aglycones : Apigénine m/z 315 (A), Chryseriol m/z 299(B), et cirsiol m/z 329 (C)

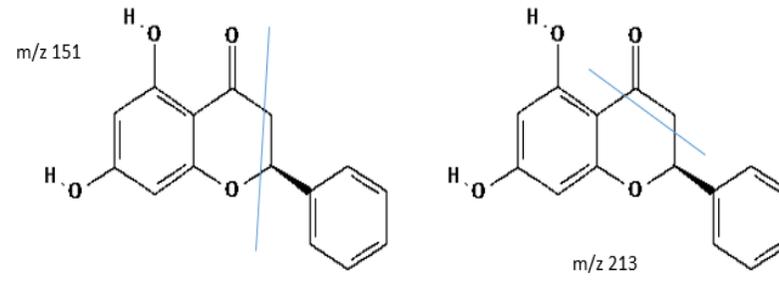


Fig. 7. Principaux fragments de flavanone aglycone : Pinocembrine m/z 255

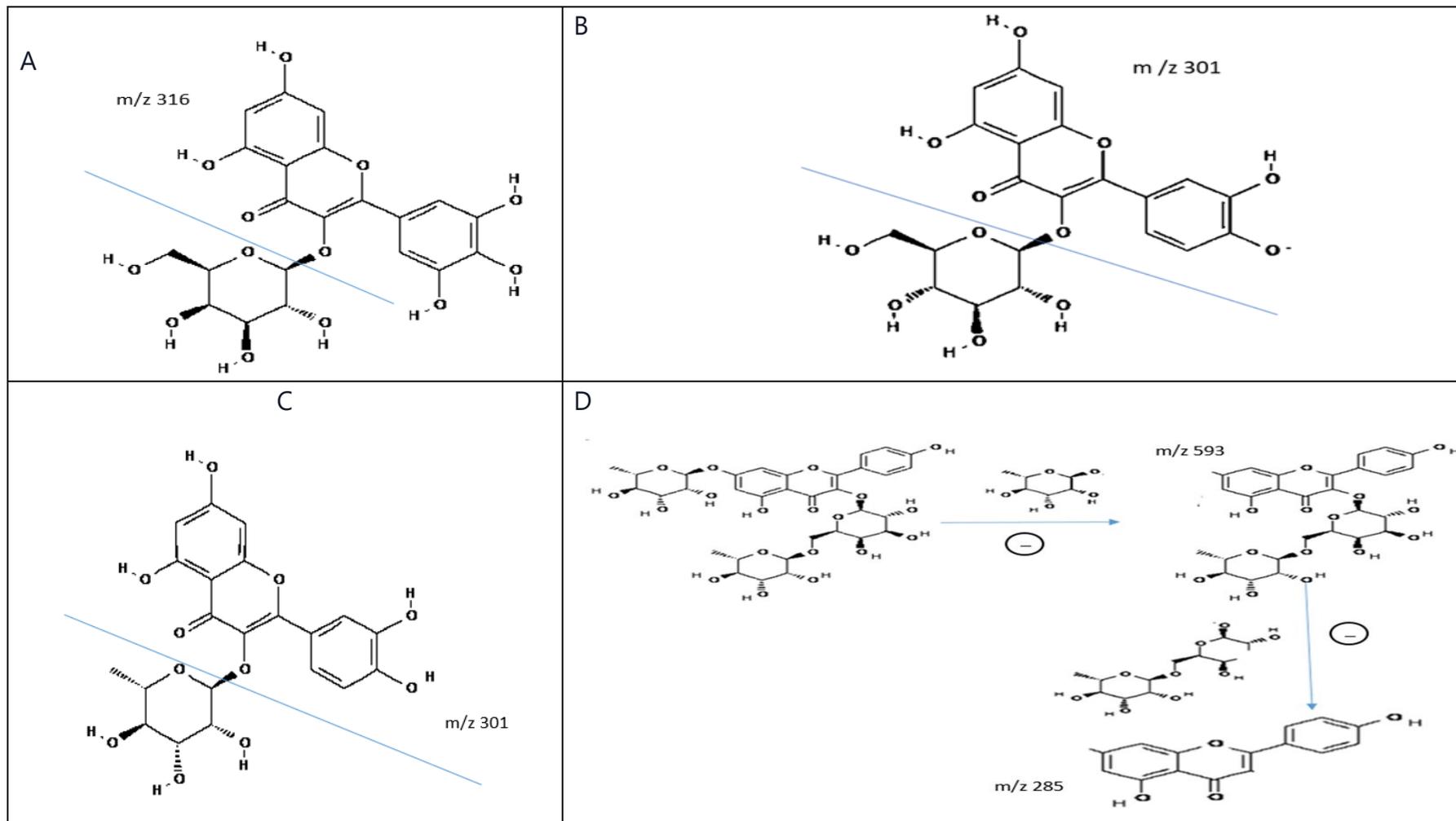


Fig.8. Principaux fragments des flavonols aglycones : Myricétine 3-O-beta-D-galactopyranoside m/z 479 (A), Quercétine hexosidem/z 463 (B), Quercitrine m/z 463 (C), et Robinine m/z 739 (D)

Les extraits de plantes recèlent une large palette de composés phénoliques présentant une diversité structurale remarquable. Les flavonoïdes étaient majoritaires dans l'extrait méthanolique de *C. salviifolius*. Il est bien connu que ces composés agissent comme antioxydants, notamment pour leur capacité à donner de l'hydrogène ou des électrons, inhibant l'action des ROS et les réactions de peroxydation lipidique [24]. Ils sont également dotés de nombreux autres effets pharmacologiques, notamment l'activités protectrice contre les maladies cardiovasculaires, hépatoprotectrice, anticancéreuse, inflammatoire et antivirale [25-26].

IV.I.3. Caractérisation par GC-MS

IV.I.3.1. Huile essentielle de *C. salviifolius*

L'hydrodistillation des parties aériennes de *C. salviifolius* a donné une huile de couleur légèrement jaunâtre. Les composés volatils de cette huile essentielle étaient identifiés par GC-MS (Figure9). Le tableau 4 présente une liste détaillée des composés identifiés, accompagnés de leurs temps de rétention respectifs (Tr)

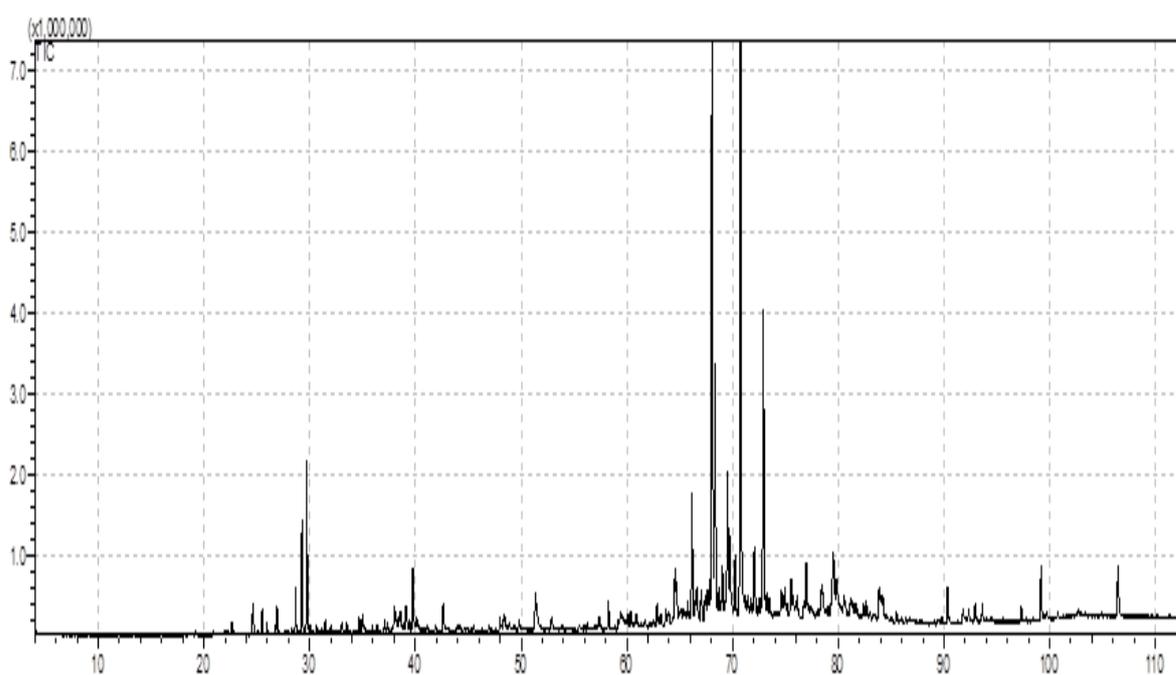


Fig. 9. Chromatogramme ionique total (TIC) de l'huile essentielle de *C. salviifolius*.

L'analyse chimique de l'HE de l'espèce *C. salviifolius* a permis l'identification de 100 composés, répartis en monoterpènes oxygénés (1,20%), sesquiterpènes non oxygénés (8,96%), sesquiterpènes oxygénés (3,93%), diterpènes (30,21%), les diterpènes oxygénés (24,73 %), les alcools (8,70 %), les cétones (4,98), les alcanes (3,44 %) et les acides gras (1,00 %) (Tableau 4), avec une nette prédominance des terpènes. Les principaux composants identifiés dans l'huile essentielle de *C. salviifolius* étaient l'oxyde de (-)-ent-13-épi-manoyle (15,85 %) et le géranyl-p-cymène (15,43 %) (Tableau 4).

Tableau 4. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *C. salviifolius*.

N	Composé identifié	TR	% A (\pm SD)
1	2-Adamantanol	22,63	0,15 \pm 0,01
2	Safranal	24,63	0,44 \pm 0,05
3	p-Menthone	25,52	0,31 \pm 0,03
4	5,8-Décadien-2-one (isomère 1)	26,92	0,30 \pm 0,05
5	1-Méthyl-trans-décahydroquinol-4(axial)-ol (isomère 1)	28,67	0,57 \pm 0,06
6	1-Méthyl-trans-décahydroquinol-4(axial)-ol (isomère 2)	29,27	1,55 \pm 0,18
7	Vitispirane	29,73	2,52 \pm 0,24
8	Cyclohexén-1-ol	31,467	0,16 \pm 0,00
9	(E)-1-(2,3,6-Triméthylphényl)buta-1,3-diène	34,680	0,30 \pm 0,02
10	6,8-Nonadién-2-one (isomère 1)	34,994	0,28 \pm 0,03
11	6,8-Nonadién-2-one (isomère 2)	37,105	0,16 \pm 0,01
12	Benzènebutanal	38,024	0,45 \pm 0,04
13	Dihydro- α -ionone	38,506	0,22 \pm 0,02
14	2-Butanone, 4-(2,6-triméthyl-2-cyclohexén-1-yl)	38,640	0,21 \pm 0,01
15	α -Ionone	39,133	0,46 \pm 0,07
16	Ylangal	39,490	0,14 \pm 0,00
17	6-Méthyl-5-(1-méthylidèneéthyl)-6,8-nanodién-2-one	39,773	1,08 \pm 0,14
18	1-Cycloheptène, 1,4-diméthyl-3-(2-méthyl-1-propényl)-4-vinyl-	40,130	0,33 \pm 0,05

19	3-Butèn-2-one	42,640	0,46±0,09
20	3-((3R)-2,3-Diméthyltricyclo[2.2.1.0 ²⁶]heptan-3-yl)propanal	48,012	0,15±0,00
21	Isospathuléol	48,302	0,13±0,00
22	Dihydro-Néoclovène-(I)	48,458	0,24±0,02
23	1-[2,3-Diméthyl-3-(4-méthylphényl)butan-2-yl]-4-méthylbenzène	51,383	0,94±0,13
24	Neointermédiol	52,929	0,29±0,08
25	Inconnu	57,413	0,21±0,05
26	Naphtho[2,1-b]furane	58,277	0,41±0,04
27	4-Hexén-1-ol	60,125	0,19±0,02
28	Ambrial	60,390	0,29±0,03
29	4-Ethenyl-1,4-diméthyl-3-(2-méthylprop-1-enyl)cycloheptene	60,870	0,19±0,01
30	2-Pentadécane	62,849	0,34±0,03
31	Farnésol	63,022	0,04±0,08
32	Acide myristique	63,231	0,26±0,09
33	Inconnu	63,697	0,22±0,01
34	(E)-1-(6,10-Diméthylundéc-5-én-2-yl)-4-méthylbenzène	63,913	0,26±0,03
35	1-Éthyl-5,5-diméthylcyclopenta-1,3-diène	64,022	0,20±0,02
36	Sclaréoloxyde	64,552	1,07±0,19
37	(S,Z)-2-Méthyl-6-(p-tolyl)hept-2-én-1-ol	64,711	0,68±0,06
38	6-Éthényl-6-méthyl-3-méthylidène-7-prop-1-én-2-yl-4,5,7,7a-tétrahydro-3aH-1-benzofuran-2-one	65,155	0,16±0,02

39	3-Acétoxy-7,8-époxy lanostan-11-ol	65,783	0,23±0,03
40	(3E,6E,10E)-3,7,11,15-Tétraméthylhexadéca-1,3,6,10,14-pentaène	66,168	2,30±0,18
41	(1R,3S)-1-Méthyl-3-prop-1-énylcyclohexane	66,514	0,43±0,08
42	cis-A/B-Sclaréoloxyde	66,636	0,55±0,06
43	Acide chrysanthémique	67,042	0,66±0,09
44	Dicumène	67,368	0,33±0,04
45	Dihydro- α -ionone	67,528	0,49±0,02
46	cis-3,14-Clerodadiène-13-ol	67,695	0,52±0,01
47	13-Epimanol	67,864	0,74±0,05
48	Geranyl-p-cymène	68,088	15,43±0,55
49	Thunbergol	68,352	5,50±0,13
50	(E)-1-(6,10-Diméthylundéc-5-én-2-yl)-4-méthylbenzène	68,712	0,66±0,01
51	(E,E)-7,11,15-Triméthyl-3-méthylène-hexadéca-1,6,10,14-tétraène	68,888	0,24±0,04
52	Longifolène	69,017	1,21±0,04
53	Acide palmitique	69,315	0,34±0,10
54	(E,E,E)-3,7,11,15-Tétraméthylhexadéca-1,3,6,10,14-pentaène	69,540	3,27±0,22
55	Oxyde de manoylène	69,752	1,71±0,09
56	Longipinocarvone	69,908	0,17±0,16
57	Geranyl- α -terpinène	70,237	1,23±0,15
58	13-épi-Oxyde de manoylène	70,761	15,85±1,01

59	2,2,4-Triméthyl-3-(3,8,12,16-tétraméthyl-heptadeca-3,7,11,15-tétraényl)-cyclohexanol	71,442	0,26±0,01
60	Bicyclo[4.4.0]déc-2-ène-4-ol	71,711	0,23±0,02
61	Kaur-16-ène	72,068	1,48±0,09
62	1-Butén-1-ol	72,572	0,24±0,06
63	α-Sélinène	72,917	6,62±0,06
64	Curcumène	73,244	0,52±0,09
65	Duvatriendiol	73,472	0,43±0,12
66	(E)-1-(6,10-Diméthylundéc-5-én-2-yl)-4-méthylbenzène	74,615	0,65±0,13
67	Androstane-17-one	74,951	0,89±0,01
68	Eicosane	75,188	0,27±0,10
69	2-Awidométhyl-cyclohexène	75,539	0,94±0,03
70	(Z)-3-Méthyl-6-(2-méthylphényl)-2-heptène	75,709	0,53±0,07
71	(E)-1-(6,10-Diméthylundeca-5,9-dièn-2-yl)-4-méthylbenzène	76,130	0,90±0,07
72	Cyclohexane, 1,1-diméthyl-2,4-bis(1-méthyléthényl)	76,753	0,37±0,03
73	Cédren-13-ol	76,992	1,42±0,15
74	Kauren-19-yl-acétate	78,465	1,23±0,19
75	[2,6,6-Triméthyl-4-(3-méthyl-2-butényl)-1-cyclohexén-1-yl]méthanol	79,057	0,23±0,12
76	4-Hexén-1-ol	79,535	2,55±0,05
77	(S)-Éthyle 3-méthyl-5-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tétraméthyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphtalène-1-yl)pentanoat,	79,843	1,35±0,07

78	Inconnu	80,148	0,32±0,14
79	6-(3-Hydroxy-4-méthylphényl)-2-méthylhept-2-én-4-one	80,362	0,21±0,05
80	3-Hexén-1-ol	80,546	0,46±0,08
81	Acide linoléique	80,695	0,29±0,10
82	(7a-Isopropényl-4,5-diméthyl-octahydroindène-4-yl)méthanol	81,166	0,47±0,16
83	13-Épimanol	81,344	0,50±0,06
84	4a,7,7,10a-Tétraméthyl-dodécahydro-benzo[f]chromène-3-one	81,658	0,30±0,04
85	Acide undéc-10-yne	81,802	0,11±0,11
86	1,1,6-triméthyl-3-méthylène-2-(3,6,9,13-tétraméthyl-6-éthényl-10,14-diméthylène-pentadéc-4-ényl)cyclohexane	82,385	0,31±0,06
87	Rétinal	82,665	0,38±0,01
88	2(3H)-Naphtal-1(2H)-one,4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a-méthyl-	82,995	0,04±0,08
89	(S)-Éthyle 3-méthyl-5-((1S,4aS,8aS)-5,5,8a-triméthyl-2-méthylène-décahydronaphtalène-1-yl)pentanoate	83,894	0,95±0,06
90	3-Hexén-1-ol	84,082	0,41±0,02
91	1-(23-Éthényl)-dotriacontan-2-one	84,223	0,48±0,02
92	Cétone d'Eremophila	85,502	0,19±0,01
93	1-(7-Hydroxy-7a-méthyl-2,2,6-triméthyl-4,4,7-tétrahydro-1H-indényl)-2,2,6-triméthylbicyclo[4.3.0]nonan-1-ol	90,328	0,78±0,02
94	Éther nonyl-hexacosyle / 1-nonyloxyhexacosane	91,792	0,40±0,01
95	2,4-Dihydroxyéicosane	92,346	0,35±0,05

96	Longifolénaldéhyde	92,957	0,39±0,05
97	Docosanol	93,629	0,38±0,15
98	Acétate de kolavénol	97,310	0,28±0,02
99	Tétrapentacontane	99,178	0,99±0,04
100	Hexatriacontane	106,455	1,12±0,09
	TOTAL		99,43
	Composés terpéniques		69,03
	<i>Monoterpènes oxygénés</i>		1,20
	<i>Sesquiterpènes oxygénés</i>		8,96
	<i>Sesquiterpènes non oxygénés</i>		3,93
	<i>Diterpènes</i>		30,21
	<i>Diterpènes oxygénés</i>		24,73
	Composés non terpéniques		30,40
	<i>Les acides gras</i>		1,0
	<i>Alcools</i>		8,70
	<i>Cétones</i>		4,98
	<i>Alcanes</i>		3,44
	<i>Acides carboxyliques et esters</i>		2,96
	<i>Stéroïdes et stérols</i>		1,21
	<i>Autres composés</i>		8,2

SD : écart type, TR: temps de rétention. NQ : non quantifié,A : surface du pic. les composés ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques spectrales GC-MS NIST14.lib et WILEY229. lib.

Les terpènes sont appelés insecticides naturels et cette classe comprend plusieurs composés jouant un rôle dans la protection des espèces végétales contre les insectes. Il a été démontré que les terpènes sont doués de plusieurs propriétés antimicrobiennes, antivirales, hypoglycémiantes, anti-inflammatoires, et anticancéreuses [27]. L'oxyde de (-) -Ent-13-épi-manoylé, composé majeur de *C. salviifolius*, est un diterpène doté d'activités anticancéreuses et antimicrobiennes [28, 29]. Ce dernier a été déjà identifié chez d'autres espèces du genre *Cistus* [30, 31].

L'analyse par GC-MS de l'HE de *C. salviifolius* a montré que le profil obtenu est en accord avec celui publié dans la littérature par Mastino, et al. [30], où il a été observé que les composants majeurs de l'huile essentielle de l'espèce *C. salviifolius* originaire de Sardaigne étaient l'oxyde de manoylé et le géranyl-p-cymène. Cependant, cela diffère assez des autres rapports retrouvés dans la littérature. Ainsi, Morales-Soto, et al. [32] en étudiant la composition chimique du *C. salviifolius* originaire de l'Espagne a rapporté la forte présence de camphre (43,86 %), de caryophyllène (19,26 %) et d'eucalyptol (19,14 %), des composés qui n'ont pas été détectés dans cette étude. En revanche, Politeo, et al. [33] ont analysé l'HE de *C. salviifolius* de la Croatie et ont pu identifier 59 composés, dont les plus importants étaient l'acide pentadécanoïque (18,1 %) et l'acide hexadécanoïque (14,1 %). Les principaux constituants de l'HE de *C. salviifolius* de l'Arabie Saoudite sont le (E)-éthylcinnamate (17,5%), l'oxyde de manoylé (13,2%), l'abiétatriène (12,3%), le (Z)-éthylcinnamate (11,3%), et carvenone (11,2 %) [31]. Alors que l'étude réalisée par Loizzo, et al. [34] a révélé que le germacrène D et l'oxyde de caryophyllène étaient les principaux composés de l'HE de *C. salviifolius* de Sicile (Italie).

La variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de *C. salviifolius* mise en évidence dans notre étude, comparée aux données de la littérature, est attendue car la synthèse des huiles essentielles est soumise à l'influence de multiples facteurs inhérents à la plante et à son environnement. Ainsi, le moment de la récolte, les conditions climatiques, l'interaction plante-plante, l'âge et le stade de développement de la plante, les périodes de floraison et de fructification, le sol et d'autres facteurs découlant de l'environnement dans lequel la plante est cultivée, peuvent réorienter les voies métaboliques, et interférer avec la biosynthèse des différents composés [35-40]. Il a été

également rapporté que l'heure de la collecte dans le même jour influence fortement la production de l'huile essentielle. Il est recommandé de collecter les plantes utilisées pour produire des huiles essentielles et même des métabolites secondaires le matin lorsque la concentration en huiles essentielles est maximale [41]. De plus, Barros, et al. [7] affirment que les plantes, grâce à des mécanismes de contrôle de leurs voies biosynthétiques, favorisent la production de certains constituants, en fonction de leurs besoins.

Ces facteurs influencent mutuellement sur la nature des composés et les quantités dans lesquelles ils sont présents, ce qui entraîne une variabilité chimique importante au sein d'une même espèce.

IV.1.3.2. Composition de l'extrait chloroforme de *C. salviifolius* par GC-MS

Le présent travail est la première contribution sur la composition lipophile de l'espèce *C. salviifolius*.

Le tableau 5 présente la composition de l'extrait chloroformique de *C. salviifolius*. Ce dernier contient une variété de composés, notamment des terpènes, des acides carboxyliques et des acides gras, ainsi que d'autres composés. Les composés majeurs de cet extrait sont le cycloarténol, l'isomère 2 de l'acide colavénique et l'isomère 4 de l'acide colavénique.

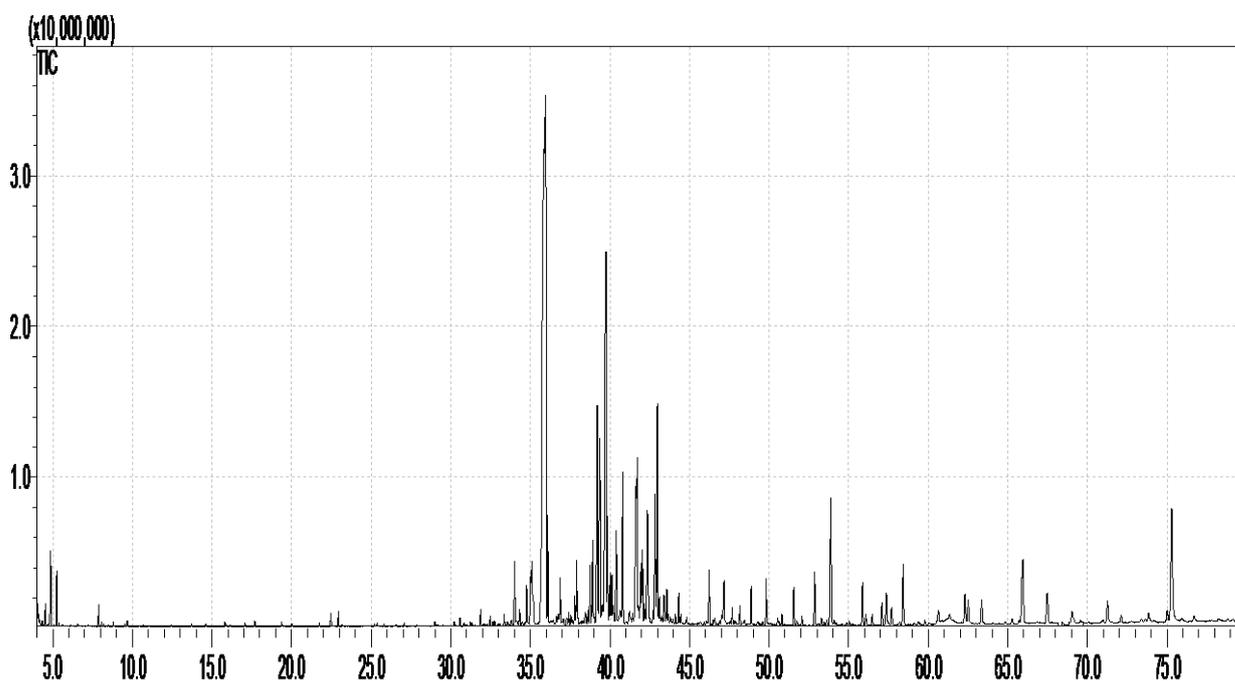


Fig. 10. Chromatogramme ionique total (TIC) de l'extrait chloroformique de *C. salviifolius*.

Terpènes et stéroïdes

Les terpènes représentaient 97,8 % du total des molécules identifiées dans l'extrait chloroformique des parties aériennes de *C. salviifolius*. Le Cycloarténol (pic 13), un triterpénoïde naturellement présent dans les plantes [42, 43] était le composé lipophile le plus abondant parmi tous les composés identifiés dans l'extrait chloroformique de *C. salviifolius*.

Acides carboxyliques et Acides gras

Les acides carboxyliques et les acides gras étaient également détectés dans l'extrait chloroformique de *C. salviifolius* et représentaient 1,2 % du total des composés identifiés, dont l'acide 10,12-docosadiynoïque (pic 36) était le plus abondant.

Tableau 5. Composition lipophile de l'extrait chloroforme de *C. salviifolius* (Données exprimées en µg composé/mg d'extrait)

No	TR (min)	Composé identifié	Concentration Moyenne (µg/mg d'extrait)
<i>Terpènes et stéroïdes</i>			
1	33,226	Pinitol	1,14±1,88
2	33,978	Neophytadine	0,78±0,02
3	42,027	Phytol	3,08±2,14
4	42,782	Épicholestérol	0,55±1,09
5	44,553	Isomère 1 de l'acide kolavénique	0,97±1,30
6	47,211	Isomère 1 de la 17b-hydroxy-(1a,17a)-diméthyl-5a-androstane-3-one-méthoxime	1,50±6,50
7	47,558	Isomère 2 de la 17b-hydroxy-(1a,17a)-diméthyl-5a-androstane-3-one-méthoxime	25,57±9,52
8	47,993	Longifolénaldéhyde	2,30±0,48
9	48,131	Isomère 1 du Lup-20(29)-en-28-al	12,54±5,59
10	48,529	Isomère 2 du Lup-20(29)-en-28-al	45,02±16,80
11	48,949	Isomère 3 de la 17b-hydroxy-(1a,17a)-diméthyl-5a-androstane-3-one-méthoxime	5,34±3,23
12	49,437	Parkéol	3,06±2,72
13	49,677	Cycloarténol	65,34±0,49
14	49,744	Farnésol	6,38±3,52
15	49,888	γ-Sélinène	6,79±3,40

16	49,976	Isomère 3 du Lup-20(29)-en-28-al	4,46±2,44
17	50,182	Isomère 2 de l'acidekolavénique	60,66±22,37
18	50,263	Acétate de kolavénol	4,51±0,15
19	50,838	Prostaglandine f1	3,64±0,05
20	50,957	Isomère 4 du Lup-20(29)-en-28-al	0,64±1,01
21	51,110	9,19-Cyclolanost-24-én-3-ol	12,64±5,27
22	51,292	Isomère 4 de la 17b-hydroxy-(1a,17a)-diméthyl 5a-androstane-3-one-méthoxime	28,15±11,05
23	51,598	Docosa-8,14-diyne-1,22-diol	0,31±0,73
24	51,763	Isomère 3 de l'acidekolavénique	2,40±1,64
25	51,976	Isomère 4 de l'acidekolavénique	38,87±14,86
26	52,066	Isomère 1 de la calustérone	6,92±3,50
27	52,679	Farnésol	1,87±1,69
28	52,938	Vitamine A	10,73±5,58
29	53,663	Isomère 2 de la calustérone	15,62±7,27
30	53,924	Isomère 5 du Lup-20(29)-en-28-al	1,11±0,90
31	67,479	3-β-Stigmast-5-ène	0,31±0,94
<hr/>			
<i>Acides carboxyliques et acides gras</i>			
32	25,812	Acide cinnamique	2,68±0,29
33	39,132	Acide palmitique	Tr
34	40,304	Isomère 1 de l'acide linoléique	Tr

35	42,928	Isomère 2 de l'acide linoléique	0,17±1,75
36	49,247	Acide docosadiynedioïque-10,12	1,89±0,05
<hr/> <i>Autres composés</i>			
37	51,432	Turanose	Tr
38	54,087	1-Linoléoylglycérol	NQ
39	57,366	Tétracontane	3,95±2,98

SD : écart type, TR : temps de rétention. NQ : non quantifié, Tr : traces,

IV.1.3.3. Composition lipophile de l'extrait éther de pétrole de *C. salviifolius* par GC-MS

La GC-MS a permis d'identifier et de quantifier 47 composés dont des acides carboxyliques et des acides gras, des terpènes et des stéroïdes, ainsi que des alcanes (Tableau 6).

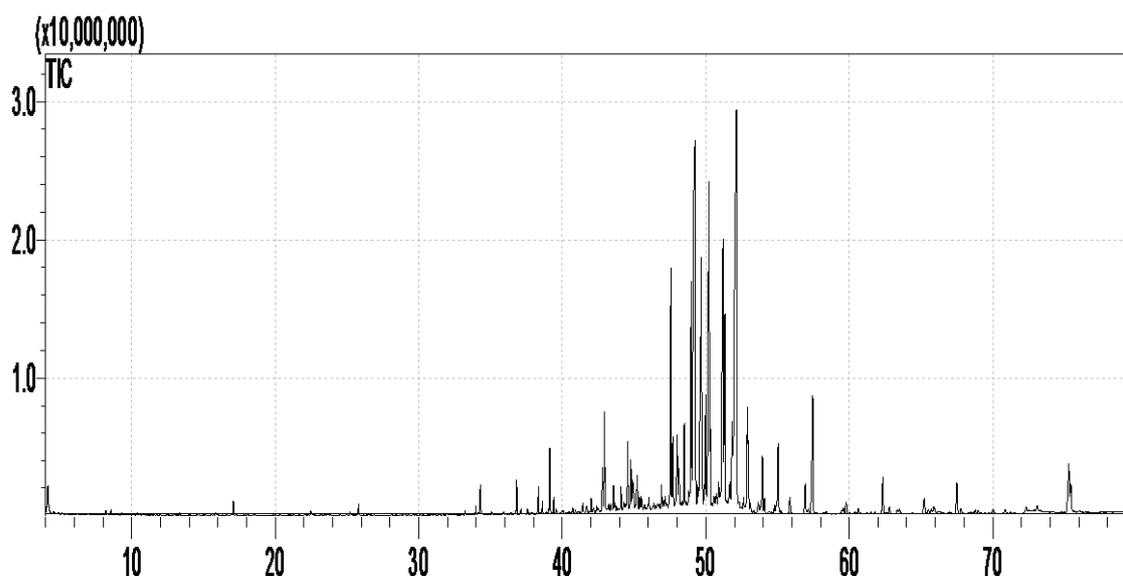


Fig. 11. Chromatogramme ionique total (TIC) de l'extrait éther de pétrole de *C. salviifolius*.

Terpènes et stéroïdes

Les terpènes et les stéroïdes constituent les groupes les plus importants de l'extrait éther de pétrole de *C. salviifolius*. L'acide kolavenique (3), un diterpène de clérodane naturellement présent dans les plantes, était le composé le plus abondant, représentant 34,61 % du total des terpènes identifiés. Vingt et un autres terpènes et stéroïdes ont été également identifiés (Tableau 6). On cite le penténylcurcumène (1), l'oxyde de manoyle (2), B-4,8,13-duvatriène-1,3-diol (4), le Cyclohexen-1-ol (5), lethunbergol (6), le phytol (7), le farnésol (8), le lup-20(29)-ène-28-alisomère 1 (9), le Cyclohexen-1-ol (10), le Cyclohexen-1-ol (11), l'isomère 1 du cycloarténol (12), l'isomère 2 du lup-20(29)-en-28-al (13), l'isomère 2 de l'acide kolavenique (14), l'isomère 1 de l'acétate de kolavenol (15), l'isomère 3 de l'acide kolavenique. (16), l'isomère 2 du cycloartanol (17), l'ylangenal, (1. alpha, 5.alpha,

17.beta) - isomère 3 (18), l'isomère 2 de l'acétate de kolavenol (19), l'isomère 4 de l'acide kolavenique (20), l'épiméthendiol (21), le stigmast-5-ène, 3.beta (25), l'isomère 1 de l'acide ursolique (26), l'isomère 2 de l'acide ursolique (27), l'isomère 3 de l'acide ursolique (28). Dans cette étude, tous ces composés ont été identifiés pour la première fois comme composants de l'espèce de *C. salviifolius*. Les terpènes sont généralement présents dans les différents organes des plantes et sont associés à des effets anti-inflammatoires, antimicrobiens, hypoglycémians et anticancéreux [44].

Alcanes

Les alcanes étaient la deuxième famille la plus importante détectée dans l'extrait éther de pétrole de *C. salviifolius* et étaient représentés par : le docosane (38), le 1-chloro-2,2-diméthylcyclopropane (39), le tétracontane (40), le 1-chloro-octadécane (41), dotriacontane (42), hexatriacontane (43).

Acides carboxyliques et acides gras

Vingt acides gras ont été détectés dans l'extrait éther de pétrole de *C. salviifolius* : l'acide myristique (29), l'acide palmitique (30), l'acide 9,12-octadécadiénoïque (31), l'acide alpha-linolénique (32), l'acide stéarique (33), l'acide labd-8-en-15-oïque (34), l'acide arachidique (35), l'acide tétracosanoïque (36), et l'acide benzoïque (37).

Autres composés

Cinq autres composés (tableau 6) ont été aussi identifiés dans l'extrait éther de pétrole de *C. salviifolius*, à savoir : la trifluorométhyl-bis (triméthylsilyl) méthyl cétone (44), l'éthanamine (45), le longifolenaldéhyde (46) et le 1-linolénoylglycérol (47).

Tableau 6. Composition lipophile de l'extrait éther de pétrole de *C. salviifolius* (Données exprimées en µg composé/mg d'extrait)

No	TR (min)	Composé identifié	Concentration moyenne (µg/mg d'extrait)
<i>Terpèneset stéroïdes</i>			
1	36,822	Penténylcurcumène	1,42±1,56
2	38,338	Oxyde de manoyle	0,85±1,17
3	44,560	Acidekolavéniqueisomère 1	5,52±3,92
4	44,924	B-4,8,13-Duvatriène-1,3-diol	Tr
5	45,229	5-(7a-Isopropényl-4,5-diméthyl-octahydroindèn-4-yl)-3-méthylpent-2-én-1-ol	1,07±0,12
6	46,927	Thunbergol	0,16±0,00
7	47,563	Phytol	27,84±1,85
8	48,129	Farnésol	5,15±2,35
9	48,506	Lup-20(29)-ène-28-al isomère 1	8,03±0,10
10	48,990	Androstan-3-one, isomère 1	42,12±14,23
11	49,221	Androstan-3-one, isomère 2	131,54±46,95
12	49,661	Cycloarténol isomère 1	71,92±24,23
13	49,987	Lup-20(29)-ène-28-al isomère 2	15,59±6,51
14	50,214	Acidekolavénique isomère 2	80,71±26,61
15	50,291	Acétate de kolavénol isomère 1	10,02±3,83

16	50,894	Acide kolavénique isomère 3	0,85±0,06
17	51,190	Cycloarténol isomère 2	65,50±21,88
18	51,313	Androstan-3-one	28,80±8,99
19	51,831	Acétate de kolavénol isomère 2	15,44±6,37
20	52,126	Acide kolavénique isomère 4	123,92±47,2
21	53,660	Epiméthendiol	1,46±0,23
22	53,955	Acide kolavénique isomère 5	14,95±0,10
23	56,933	Acide kolavénique isomère 6	7,41±0,96
24	59,596	Acide kolavénique isomère 7	1,76±0,24
25	67,501	Stigmast-5-ène, 3-bêta	8,94±0,60
26	72,346	Acide ursolique isomère 1	Tr
27	73,103	Acide ursolique isomère 2	Tr
28	75,430	Acide ursolique isomère 3	8,19±0,69
<i>Acides carboxyliques et acides gras</i>			
29	34,299	Acide myristique	1,38±0,90
30	39,137	Acide palmitique	6,81±2,45
31	42,811	Acide octadécadiénoïque-9,12	4,42±2,18
32	42,945	Acide α -linoléinique	13,58±4,83
33	43,577	Acide stéarique	Tr
34	44,778	Acide labd-8-en-15-oïque	3,01±0,50

35	47,690	Acide arachidique	10,19±4,05
36	55,879	Acide tétracosanoïque	2,13±0,51
37	65,892	Acide benzoïque	0,20±0,00
<i>Alcanes</i>			
38	52,895	Docosane	26,07±9,76
39	55,037	1-chloro-2,2-diméthylcyclopropane	20,87±2,76
40	57,442	Tétracontane	39,06±0,89
41	59,789	1-chloro-octadécane	2,25±0,42
42	62,328	Dotriacontane	10,31±0,43
<i>Autrescomposés</i>			
44	4,889	Trifluorométhyl-bis-(triméthylsilyl)méthyl cétone	NQ
45	5,248	Éthanamine	NQ
46	48,001	Longifolénaldéhyde	9,40±2,68
47	54,090	1-Linoléoylglycérol	NQ

SD : écart type, TR: temps de rétention. NQ : non quantifié, Tr : traces, les composés ont été identifiés par comparaison avec les bibliothèques spectrales GC-MS NIST14.lib et WILEY229.lib.

IV.1.4. Activité antioxydante

L'effet antioxydant des extraits de *C. salviifolius* a été évalué en termes de leur capacité à sequestrer les radicaux DPPH et ABTS et leur capacité réductrices des ions ferriques et les ions cuivre dans les tests de pouvoir réducteur et CUPRAC, respectivement. Les résultats exprimés en IC₅₀ ou A_{0,5} sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7. Activité antioxydante (IC₅₀, µg/mL) des extraits de *C. salviifolius*

	<i>C. salviifolius</i> <i>EM</i>	<i>C. salviifolius</i> <i>EC</i>	<i>C. salviifolius</i> <i>EEP</i>	BHA
DPPH (IC ₅₀ µg/mL)	21,79±0,83	61,38±1,28	53,37±1,68	5,73±0,41
ABTS (IC ₅₀ µg/mL)	11,18±0,15	23,07±2,88	20,09±2,61	1,81±0,10
Pouvoir réducteur (A _{0,5} µg/mL)	23,47±0,40	15,79±1,05	175,95±3,55	8,41±0,67
CUPRAC (A _{0,5} µg/mL)	17,96±1,10	70,46±2,28	79,63±1,09	5,35±0,71

(EM) : Extrait méthanolique, (EC) : Extrait chloroformique, (EEP) : Extrait éther de pétrole. Les valeurs IC₅₀ et A_{0,5} correspondent respectivement à la concentration fournissant un pourcentage d'inhibition de 50 % et à la concentration fournissant une absorbance de 0.5.

L'extrait méthanolique de *C. salviifolius* a montré un potentiel antioxydant prometteur dans les tests DPPH et ABTS^{•+} ainsi que dans les tests du pouvoir réducteur et CUPRAC. Cet extrait s'est avéré posséder une activité de piégeage des radicaux ABTS et DPPH prometteuse avec des valeurs IC₅₀ égales à 21,79 ± 0,83 et 11,18 ± 0,15 µg/mL respectivement, correspondant à environ quatre et six fois les valeurs du BHA, utilisé comme référence. L'extrait méthanolique de *C. salviifolius* a également présenté une bonne activité dans les tests de pouvoir réducteur et CUPRAC, avec une A_{0,5} correspondant à environ trois fois celle du BHA (Tableau 7).

Bien que moins efficaces par rapport à l'extrait méthanolique, les extraits chloroformique et éther de pétrole de *C. salviifolius* ont dévoilé un bon effet antioxydant dans les tests DPPH et ABTS, avec des IC₅₀ environ neuf à douze fois respectivement supérieur à ceux du BHA utilisé comme référence.

Les extraits chloroformique ont montré des capacités réductrices inférieures en termes de pouvoir réducteur et du test CUPRAC, car leurs valeurs $A_{0,5}$ étaient 19 à 20 fois plus élevées par rapport à celles de l'étalon de référence BHA (Tableau 7).

L'activité antioxydante de certains extraits de *C. salviifolius* a déjà été décrite dans la littérature. Les résultats du test d'ABTS sont cohérents avec les études précédentes sur les espèces Tunisienne [1, 2] et Marocaine [3] de *C. salviifolius*. Cependant, les résultats du DPPH étaient différents de ceux rapportés par les mêmes auteurs. Les divergences entre nos résultats et ceux de la littérature pourraient s'expliquer par des variations conjointes de la période de récolte et de la région de croissance de la plante.

Les activités piègeuses de radicaux libres (RL) observées dans la présente étude indiquent la capacité des extraits à céder des électrons, contribuant ainsi à stabiliser les RL. Cette capacité est importante car l'accumulation excessive de radicaux libres est un facteur majeur dans le développement et l'aggravation de pathologies telles que le cancer [43], et le diabète [45]. Cette activité antioxydante potentielle de l'extrait de *C. salviifolius* peut s'expliquer par sa richesse en flavonoïdes, révélée par analyse LC-MS. Les flavonoïdes peuvent agir comme un singulet réducteur d'oxygène, agissant dans les réactions d'oxydation des lipides ou même dans la chélation des métaux [46]. La propriété antioxydante de la quercétine, le composé majoritaire de l'extrait méthanolique de *C. salviifolius*, a été démontrée dans plusieurs études précédentes notamment celle réalisée par (Ozgen, S et Al) [46].

IV.1.5. Activité anti-inflammatoire

La capacité des extraits de *C. salviifolius* à s'opposer aux événements inflammatoires a été estimée par la méthode de piégeage du NO^{\bullet} . Les résultats présentés en IC_{50} et sont illustrés dans le tableau 8.

Tableau 8. Activité de piégeage de NO (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$) des extraits de *C. salviifolius*

	<i>C. salviifolius</i> EM	<i>C. salviifolius</i> EC	<i>C. salviifolius</i> EEP	Acide ascorbique
NO activity (IC_{50} $\mu\text{g} / \text{mL}$)	97,33±6,80	267,66±29,16	598,00±105,27	144,58±7,03

(EM) : Extrait méthanolique, (EC) : Extrait chloroformique, (EEP) : Extrait éther de pétrole.

NO est un médiateur chimique impliqué dans la réponse inflammatoire en tant que vasodilatateur. Comme le montre le tableau 8, l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* ($IC_{50} = 97,33 \pm 6,80 \mu\text{g/mL}$) a présenté une activité de piégeage du NO plus puissante que les extraits chloroformique et éther de pétrole. Ce composé exhibe une activité notablement supérieure à celle de l'acide ascorbique ($IC_{50}=144.58\pm7.03\mu\text{g/mL}$), qui sert de référence dans cette étude. Par conséquent, nos résultats suggèrent que le bon effet de piégeage du NO par *C. salviifolius* pourrait expliquer son utilisation traditionnelle comme remède anti-inflammatoire.

Des travaux antérieurs de (López-López, G et Al) [47] ont mis en évidence l'activité de capture du radical NO par la quercétine. La présence de cette molécule en quantité importante dans l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* pourrait expliquer l'efficacité de cette espèce à piéger le NO, comme observé dans la présente étude.

IV.1.5. Inhibition des enzymes

L'aptitude de l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* et des inhibiteurs standards à inhiber l'activité enzymatique de l' α -glucosidase, l' α -amylase et l'acétylcholinestérase a été évaluée. Les résultats exprimés en IC_{50} ou en % d'inhibition sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9. Résultats de l'inhibition des enzymes α -glucosidase, α -amylase et acétylcholinestérase par l'extrait méthanolique de *C. salviifolius*

	<i>C. salviifolius</i>	Standard ^A
α -Glucosidase IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	37,65 \pm 6,54	405,77 \pm 34,83
α -Amylase (% inhibition)	39,15% ^B	ND
Acetylcholinestérase IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	210,80 \pm 21,58	5,06 \pm 0,51

^(A)L'acarbose : standard utilisé dans le test d'inhibition de l' α -amylase et de l' α -glucosidase. Donépézil : standard utilisé dans le test d'inhibition de l'acétylcholinestérase. ^(B)déterminé aux concentrations de 2.5 mg/mL de l'extrait. La valeur IC_{50} correspondait à la concentration de 50 % de pourcentages d'inhibition

Les propriétés antidiabétiques de l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* ont été déterminées *in vitro* par inhibition des enzymes digestives α -glucosidase et α -amylase

(Tableau 9). L'extrait a dévoilé une forte capacité d'inhibition de l' α -glucosidase ($IC_{50}=37,65\pm 6,54 \mu\text{g/mL}$) significativement supérieure à celle de l'acarbose ($IC_{50}=405,77\pm 34,83\mu\text{g/mL}$) utilisé comme référence.

En revanche, l'activité inhibitrice contre l' α -amylase était faible puisqu'elle ne présente que 39,15% d'inhibition déterminée à la concentration de 2.5 mg/mL de l'extrait. En raison des concentrations très élevées requises pour produire des inhibitions plus fortes, il n'a pas été possible de déterminer la valeur IC_{50} .

L' α -amylase est une enzyme digestive sécrétée par la salive et le pancréas. L' α -glucosidase est aussi une enzyme digestive intestinale. Ces deux enzymes ont pour rôle de décomposer les sucres composés en glucose. Ce sucre est ensuite absorbé dans le sang au niveau des cellules intestinales. L'inhibition de ces enzymes ralentit donc l'absorption du glucose, ce qui présente un intérêt pour les personnes souffrant de diabète. En effet, le diabète est une pathologie chronique caractérisée par une hyperglycémie. Ainsi, l'inhibition de l'absorption du glucose peut aider à maintenir la glycémie à un niveau plus stable. Il existe déjà sur le marché des médicaments hypoglycémisants à base d'inhibiteurs de ces enzymes tel que le miglitol et l'acarbose. Cependant, l'utilisation de ces médicaments a été associée à l'apparition d'une multitude d'effets indésirables comme les diarrhées et les douleurs abdominales. Compte tenu des résultats prometteurs obtenus dans cette étude, *C. salviifolius* pourrait constituer une source de molécules bioactives pour le développement de remèdes antidiabétiques.

Les études menées sur l'inhibition des enzymes α -glucosidase et α -amylase par *C. salviifolius* font encore défaut et un seul article de recherche a pu être trouvé dans la littérature. Les résultats actuels sont en partie conformes à la recherche menée par (Sayah, K et Al)[3] indiquant que les extraits aqueux et méthanoliques de *C. salviifolius* Marocaine ont un fort effet inhibiteur sur l' α -glucosidase (les valeurs IC_{50} étaient respectivement deux à dix-huit fois inférieures à celles de l'acarbose). Cependant, contrairement à nos résultats, les mêmes auteurs ont rapporté que les extraits aqueux et méthanoliques de *C. salviifolius* présentaient un bon effet inhibiteur de l'enzyme α -amylase.

L'effet inhibiteur de l' α -glucosidase par l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* pourrait s'expliquer par sa richesse en quercétine présente comme composé majoritaire. Les chercheurs ont rapporté que la quercétine a des effets hypoglycémiantes prometteurs chez les animaux diabétiques, vu qu'elle possède un effet inhibiteur élevé contre la glucosidase intestinale du rat [48-49].

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase a été également évaluée. Il a été observé que l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* inhibe l'enzyme acétylcholinestérase avec une IC_{50} de $210,80 \pm 21,58 \mu\text{g/mL}$. Néanmoins, cette activité inhibitrice était inférieure à celle obtenue avec le donépézil, l'inhibiteur de référence ($IC_{50} = 5,06 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$).

La maladie d'Alzheimer est associée à la perte des neurones cholinergiques qui produisent l'acétylcholine, entraînant une diminution des niveaux de neurotransmetteurs au niveau de la synapse. L'enzyme acétylcholinestérase décompose l'acétylcholine en sa forme inactive. Les inhibiteurs de l'AChE sont utilisés dans le traitement de cette maladie et agissent en bloquant l'action de cette enzyme, contribuant ainsi à prévenir les lésions nerveuses.

L'activité inhibitrice de l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* peut également être attribuée à la quercétine. Ce composé a déjà été signalé comme inhibiteur potentiel de l'AChE dans des modèles *in vitro* [50-52].

IV.1.6. Activité antibactérienne

La sensibilité de souches bactériennes sélectionnées aux extraits chloroformique et éther de pétrole de *C. salviifolius* a été déterminée. Les valeurs de CMI ($\mu\text{g/mL}$), reflétant la concentration minimale inhibitrice, sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 10. Les valeurs moyennes de CMI exprimées en $\mu\text{g/mL}$ des extraits chloroformiques et éther de pétrole de *C. salviifolius* contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

Souches bactériennes	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
	EC	EEP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	828 \pm 20,78	>900
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	585 \pm 63,64	756 \pm 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	814,5 \pm 6,36	873 \pm 0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	733,5 \pm 19,09	378 \pm 25.45
<i>Acinetobacter baumannii</i>	777 \pm 4,24	459 \pm 12.73
<i>Morganella morganii</i>	900<	720 \pm 0

EC : extrait chloroformique ; EEP : extrait éther de pétrole
 EC : extrait chloroformique ; EEP : extrait éther de pétrole

Les propriétés antibactériennes des extraits chloroformiques et éther de pétrole de *C. salviifolius* ont été déterminées contre des souches de bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives (Tableau 10) sélectionnées pour leur capacité à survivre dans des conditions difficiles et leurs multiples habitats environnementaux. Ces souches représentent la principale cause d'intoxications et d'infections graves dans l'organisme humain.

L'extrait éther de pétrole a démontré une très forte activité inhibitrice contre les souches pathogènes testées. Les effets antibactériens les plus forts ont été observés contre *Salmonella* Typhimurium (378 \pm 25,45 $\mu\text{g/mL}$) et *Acinetobacter baumannii* (459 \pm 12,73 $\mu\text{g/mL}$) (Tableau 10).

L'extrait chloroformique a démontré aussi une bonne activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes testées. Le pouvoir antibactérien le plus fort a été enregistré contre *Pseudomonas aeruginosa* (585 \pm 63,64 $\mu\text{g/mL}$) (Tableau 10).

Au meilleur de nos connaissances, l'effet antibactérien des extraits lipophiles de l'espèce *C. salviifolius* a été évaluée pour la première fois dans la présente étude. L'activité antibactérienne était bien meilleure que celle décrite dans un rapport précédent réalisé sur différents extraits d'espèces de *Cistusvillosus* et de *Cistusmonspeliensis* (CMI entre 0,78 et 6,25 mg/mL) [53].

La forte activité antibactérienne des extraits de *C. salviifolius* notamment celle de l'éther de pétrole contre les souches pathogènes sélectionnées pourrait être attribuée à sa richesse en acide kolavenique, un diterpène de clérodane qui possède une activité antimicrobienne. En effet, le clérodane a été précédemment isolé de l'extrait de l'éther de pétrole de la graine de *Polyalthialongifolia* et a présenté une forte activité contre la plupart des bactéries testées [54]. Il s'est également révélé très actif contre *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) [55-56].

IV.1.7. Activité cytotoxique

Le pouvoir cytotoxique de l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* a été testé pour la première fois contre des lignées cellulaires humaines de carcinome gastrique (AGS) et de carcinome du poumon (A549).

D'après nos données, l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* a provoqué une baisse modérée de la viabilité cellulaire comparativement au témoin, comme le montre la figure 12. En effet, cet extrait a engendré une perte de viabilité de 25,95% et de 22,0% dans les lignées cellulaires AGS et A549, respectivement.

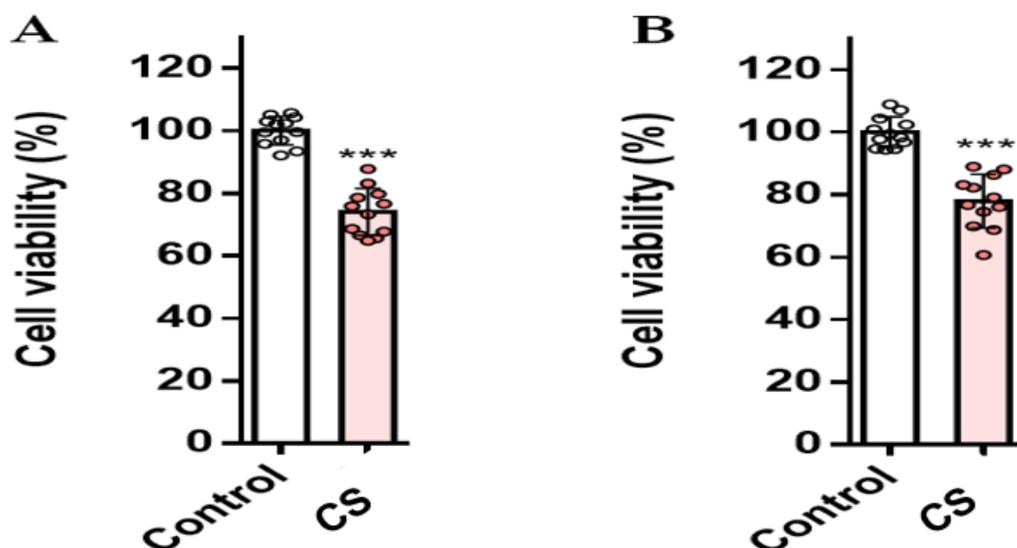


Fig. 12. Viabilité des cellules AGS et A549 exposées à l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* (250 µg/mL) ou au milieu (témoin).

Des chercheurs ont précédemment évalué l'activité cytotoxique des feuilles et des boutons floraux de *C. salviifolius* Tunisienne contre les lignées cellulaires cancéreuses OVCAR et MCF-7, en utilisant le test MTT. Ces chercheurs ont rapporté que l'extrait de boutons floraux provoquait une cytotoxicité modérée envers les deux lignées cellulaires tandis que l'extrait de feuilles était totalement inactif.

IV.1.8. Etude docking moléculaire

Le docking moléculaire est une méthode de modélisation informatique qui prédit la structure tridimensionnelle des complexes protéine-ligand. Cette technique est largement utilisée pour étudier les interactions biomoléculaires des médicaments et ainsi guider la conception rationnelle de nouveaux candidats thérapeutiques potentiels [57].

Le ré-amarrage du ligand natif acarbose en α -glucosidase a été réalisé afin de valider le protocole du docking. L'énergie de liaison de l'acarbose à la protéine cible s'est avérée être de 7,7 Kcal/mol. L'écart quadratique moyen entre l'acarbose aux rayons X et la meilleure pose de ligand amarré a été calculé avec Dock RMSD [57] et s'est avéré être de 1,455 Å. Ce résultat montre clairement que le protocole choisi est fiable et peut être utilisé pour déterminer la conformation optimale et l'énergie de liaison des molécules étudiées au

site actif de l' α -glucosidase. La figure 13 montre la superposition de l'acarbose co-cristallisé et de la meilleure pose d'amarrage.

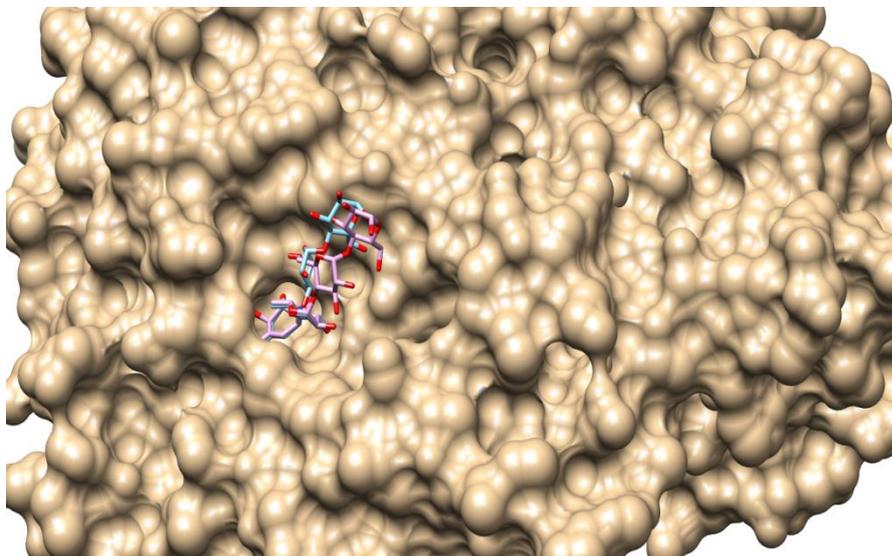


Fig. 13. Superposition d'acarbose aux rayons X et meilleure pose d'amarrage dans le site actif de l' α -glucosidase.

Les énergies du docking des molécules étudiées sont rapportées dans le tableau 11. Les figures 14 et 15 montrent des cartes 2D de différentes interactions entre les molécules de quercétine et de casticine.

Tableau 11. Énergies d'amarrage moléculaire de la quercétine et de la casticine

	Acarbose	Quercétine	Casticine
ΔG Kcal / mol	-7,7	-7,6	-7,0

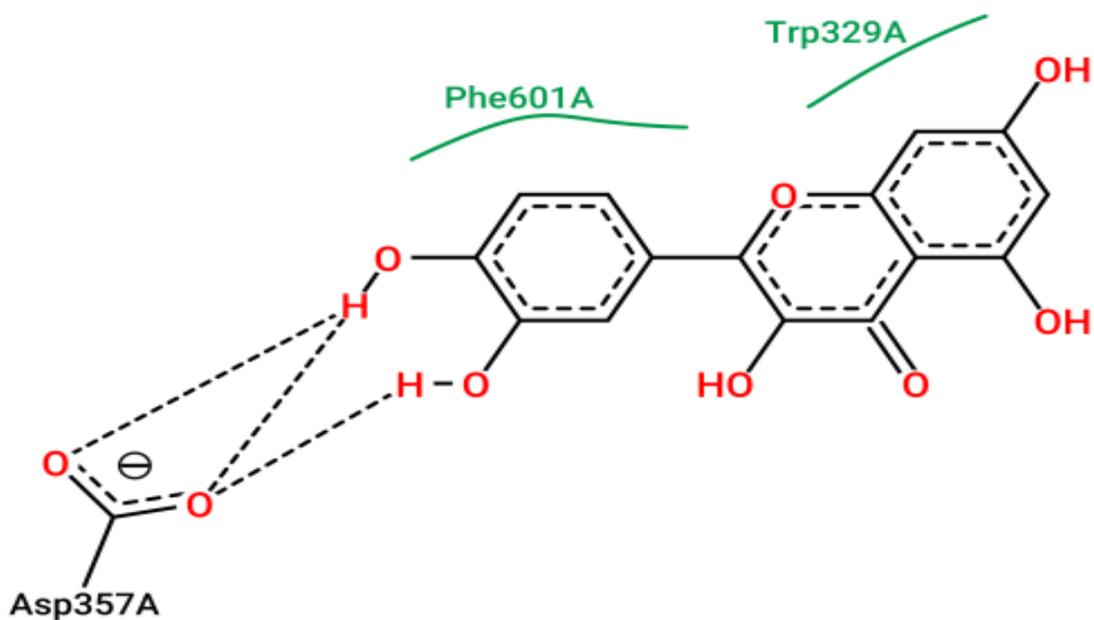


Fig. 14. Représentation 2D des interactions de la quercétine avec l' α -glucosidase

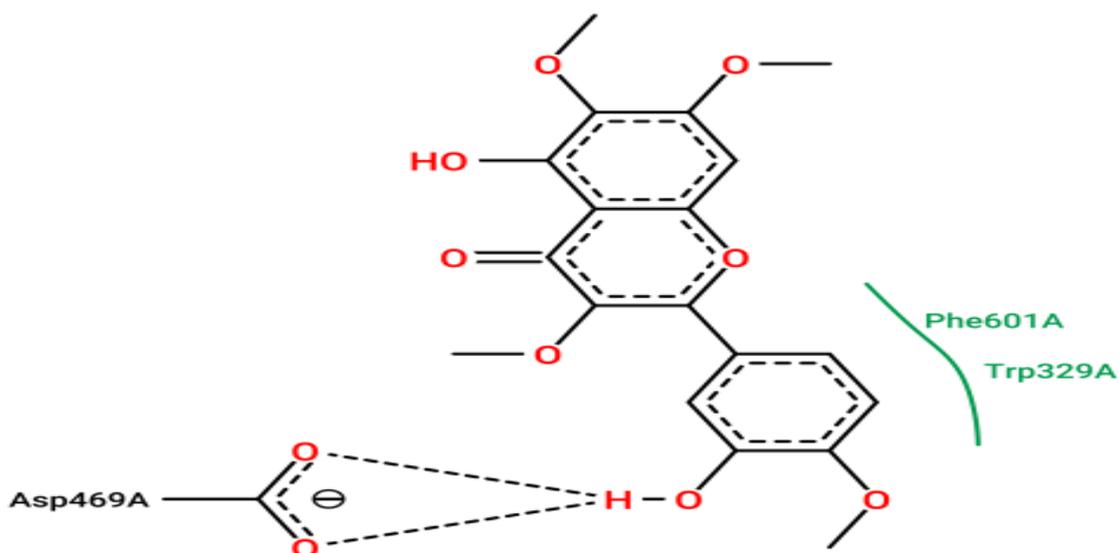


Fig.15. Représentation 2D des interactions de la casticine avec l' α -glucosidase

Sur la base des données d'interaction du test du docking, il est clair que la quercétine possède la meilleure affinité de liaison (faible énergie de liaison égale à -7,8 kcal/mol)

pour le site actif de l'enzyme α -glucosidase. La casticine s'est avérée avoir une énergie de liaison plus faible avec la cible. Ces résultats de l'étude *in silico* sont en accord avec la forte inhibition de l'activité α -glucosidase enregistrée dans la présente étude avec l'extrait méthanolique de *C. salviifolius* dans lequel la quercétine et la casticine étaient les composés les plus abondants.

La quercétine interagit avec l' α -glucosidase, engageant différents acides aminés (Fig. 14) en formant des liaisons hydrogène via les deux hydroxyles du cycle B avec le groupe carboxylique d'Asp357. Ce résidu a été trouvé en interaction avec l'unité Valienamine (cycle A) de l'acarbose, qui est située dans les sous-sites (-1) et (+1) [58]. (Alasmary, F. A. S et Al) [59] ont précédemment signalé que la quercétine était capable de réaliser trois liaisons hydrogène avec le même résidu Asp357. La casticine a interagi avec l' α -glucosidase en formant des liaisons hydrogène au moyen d'un groupe hydroxyle dans le cycle B avec Asp469. Asp469 est un résidu acide catalytique situé dans les boucles $\beta \rightarrow \alpha$ 4 de l' α -glucosidase [58].

Pour les inhibiteurs de la quercétine et de la casticine, les interactions hydrophobes étaient localisées au niveau des résidus Phe601 et Trp329 (Figures 14 et 15). (Tagami, T et Al) [58] ont rapporté que Trp329, IL358, Trp432, Phe476 et Phe601 sont situés à l'entrée de la poche du site actif et semblent former une barrière hydrophobe. Ceci est cohérent avec les modes d'interactions de quercétine et casticine décrits ci-dessus.

Le mode de liaison de la quercétine et de la casticine est en concordance avec l'étude cinétique rapportée par (Li, Y. Q et Al) [60] dans laquelle les modes de liaison de la quercétine et de la casticine à l'enzyme α -glucosidase se sont révélés régis par des interactions hydrophobes.

Références bibliographiques

1. Mahmoudi, H., Aouadhi, C., Kaddour, R., Gruber, M., Zargouni, H., Zaouali, W., Hamida, N. B., Nasri, M. B., Ouerghi, Z., and Hosni, K. (2016). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *Biosci. J.*, 32(2), 226–237.
2. El Euch, S. K., Bouajila, J., and Bouzouita, N. (2015). Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Industrial Crops and Products*, 76, 1100-1105.
3. Sayah, K., Marmouzi, I., Naceiri Mrabti, H., Cherrah, Y., and Faouzi, M. E. A., (2017). Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia. *BioMed Res. Int.* 2017, 1-7.
4. Seeram, N., Adams, L., Henning, S., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M., and Heber, D. (2005). In vitro and in vivo antiperoxidant activities of phenolic compounds from cranberry extracts. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360.
5. Fernández-Arroyo, S., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2010). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. *Phytochemical Analysis*, 21(6), 622-632.
6. Yu, D. Q., Chen, Y., and Liang, X. T. (2000). Étude de l'interaction entre la protéine p53 et la protéine hsp70 dans les cellules HeLa après irradiation aux rayons UV: [URL non valide supprimée]. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 108(3-4), 393-436.
7. Barros, L., Dueñas, M., Alves, C. T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. F. R. (2013). Chemical characterization of different apple varieties: A comprehensive study of polyphenolic profiles and antioxidant activity. *Industrial Crops & Products*, 41, 41.

8. Saldanha, L., Vilegas, W., and Dokkedal, A. (2013). Caractérisation des flavonoïdes et des acides phénoliques dans *Myrcia bella* Cambess. par FIA-ESI-IT-MSn et HPLC-PAD-ESI-IT-MS combinés à la RMN. *Molecules*, 18(7), 8402-8416.
9. Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. F. R. (2013). Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141(4), 3721.
10. Llorent-Martínez, E. J., Ortega-Barrales, P., Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Guler, G. O., Mocan, A., and Aktumsek, A. (2016). *Lathyrus aureus* and *Lathyrus pratensis*: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities†. *RSC Advances*, 6(92), 88996-89006.
11. Simirgiotis, M. J., Schmeda-Hirschmann, G., Bórquez, J., and Kennelly, E. J. (2013). The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: A source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. *Molecules*, 18(2), 1672-1685.
12. Brito, A., Ramirez, J. E., Areche, C., Sepúlveda, B., and Simirgiotis, M. J. (2014). HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three *Citrus* species consumed in Northern Chile. *Molecules*, 19(11), 17400.
13. Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A., Alonso-Villaverde, C., and Menéndez, J. A. (2014). Bioactive food components and health-promoting effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(9), 985-1005.
14. Olennikov, D.N., Chirikova, N.K., Kashchenko, N.I., Nikolaev, V.M., Kim, S.W., and Vennos, C. (2018). Bioactive phenolics of the genus *Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the Siberian species and their inhibitory potential against α -amylase and α -glucosidase. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 756.
15. Boukhalkhal, S., Gourine, N., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S., and Yousfi, M. (2020). UHPLC-DAD-ESI-MSn profiling variability of the phenolic constituents of *Artemisia campestris* L. populations growing in Algeria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101483.
16. Rechek, H., Haouat, A., Hamaidia, K., Allal, H., Boudiar, T., Pinto, D. C. G. A., Cardoso, S. M., Bensouici, C., Soltani, N., and Silva, A. M. S. (2021). Chemical

- composition and antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activities of an endemic species from Southern Algeria: *Warionia saharae*. *Molecules*, 26(17), 5257.
17. Lin, L.-Z. and Harnly, J.M. (2010). Identification of the phenolic components of Chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*, 120(2), 319-326.
18. Santos, S.A.O., Freire, C.S.R., Domingues, M.R.M., Silvestre, A.J.D., & Neto, C.P. (2011). Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 59(17), 9386-9393.
19. Mitreski I., Stanoeva J.P., Stefova M., Stefkov G., and Kulevanova S. (2014). Polyphenols in Representative Teucrium Species in the Flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MSn Profile and Content. *Nat. Prod. Commun.* 9: 175–180.
20. Falcão SI, Vale N, Gomes P, Domingues MRM, Freire C, Cardoso SM, and Vilas-Boas M. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochem Anal.* 24(4): 309-318.
21. Šibul, F., Orčić, D., Berežni, S., Anačkov, G., and Mimica-Dukić, N. (2019). HPLC–MS/MS profiling of wild-growing scentless chamomile. *Acta Chromatographica*, 32(2), 1-9.
22. Zhao, H., Wang, J., Xie, C., Song, S., Bai, G., and Luo, G. (2013). Study on fingerprints of different organs of *Arabidopsis thaliana* by using UPLC/ESI-Q-TOF MS. *Asian Journal of Chemistry*, 25(6), 3023-3029.
23. Saraf, I., Marsh, K. J., Vir, S., Foley, W. J., and Singh, I. P. (2010). Quantitative analysis of various unsubstituted and B-ring-substituted flavonoids in ten Australian *Eucalyptus* species. *Communications in Natural Products*, 12(11), 1695-1699.
24. H de Groot, U Rauen. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 24. 1169-1175.
25. Atmani, D., Chaher, N., Atmani, D., Berboucha, M., Debbache, N., and Boudaoud, H. (2009). Effet de la nature des glucides sur la composition lipidique du plasma chez le rat Wistar. *Current Nutrition and Food Science*, 5(3), 225-230.

26. Jucá, M.M., Cysne Filho, F.M.S., Almeida, J.C. de., Mesquita, D. da S., Barriga, J.R.de M., Dias, K.C.F., Barbosa, T.M., Vasconcelos, L.C., Leal, L.K.A.M., Ribeiro, J.E., and Vasconcelos, S.M.M. (2020). Flavonoïdes : activités biologiques et potentiel thérapeutique. *Natural Product Research*, 34(6), 692.
27. Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., and Yu, X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Products Communications*, 15, Issue 3.1934578X2090355.
28. Angelopoulou D, Démétzos C, Dimas C, Perdetzoglou D, and Loukis A. Huiles essentielles et extraits hexaniques de feuilles et de fruits de *Cistus monspeliensis*. Activité cytotoxique de l'oxyde d'ent-13-épi-manoyle et de ses isomères. *Planta Med.* 2001;67(3):252-256.
29. Demetzos, C., Angelopoulou, D., and Perdetzoglou, D. (2002). Une étude comparative de l'huile essentielle de *Cistus salviifolius* dans plusieurs populations de Crète (Grèce). *Biochem. Syst. Ecol.*, 30, 651-658.
30. Mastino, P. M., Marchetti, M., Costa, J., and Juliano, C. C. (2018). Analysis And Potential Antimicrobial Activity Of Phenolic Compounds In Extracts Of *Cistus creticus* Subspecies From Sardinia. 31, 299.
31. Abu-Orabi, S. T., Al-Qudah, M. A., Saleh, N. R., Bataineh, T. T., Obeidat, S. M., Al-Sheraideh, M. S., Al-Jaber, H. I., Tashtoush, H. I., and Lahham, J. N. (2020). Antioxidant activity of crude extracts and essential oils from flower buds and leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salviifolius*. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(6), 6256.
32. Morales-Soto, A., Oruna-Concha, M. J., Elmore, J. S., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Roldán, C., and Segura-Carretero, A. (2015). Volatile profile of Spanish *Cistus* plants as sources of antimicrobials for industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 74, 425-433.
33. Politeo, O., Maravić, A., Burčul, F., Carev, I., and Kamenjarin, J. (2018). Composition phytochimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'espèces de cistes sauvages en Croatie. *Natural Product Communications*, 13(6), 771-774.
34. Loizzo, M. R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., and Tundis, R. (2013). Composition, antioxidant and biological activities of the essential oil of

- Thymus capitatus* L. (Lamiaceae) from Tunisia. *Food Chemistry and Toxicology*, 59, 586-594.
35. Silva, MG de Vasconcelos, Craveiro, AA, Matos, FJA, et al. (1999). Variation diurne des constituants de l'huile essentielle des feuilles d'*Ocimum gratissimum*. *Fitoterapia*, 70(6), 563-570.
36. Sousa, E. O., Viana, A. C., Rodrigues, F. F. G., Campos, A. R., Lima, S. G., and Costa, J. G. M. (2010). Effect of collection time on essential oil composition of *Lantana camara* Linn (Verbenaceae) growing in Brazil Northeastern. *Records of Natural Products*, 4(1), 31-37.
37. Yavari, A., Nazeri, V., Sefidkon, F., and Hassani, M. E. (2010). Influence of some environmental factors on the essential oil variability of *Thymus migricus*. *Journal of Essential Oil Research*, 22(3), 288-291.
38. KpadonouKpoviessi, B.G.H., Ladekan, E.Y., Kpoviessi, D.S.S., Gbaguidi, F., Yehouenou, B., Quetin-Leclercq, J., Figueredo, G., Moudachirou, M., and Accrombessi, G.C. (2012). Diversité chimique des huiles essentielles de *Xylopieae burnensis* A. Chev. (Annonaceae) de deux provenances du Bénin. *Chemosystematics, Biodiversity and Evolution*, 9(1), 139.
39. Flamini, G., Smaili, T., Zellagui, A., Gherraf, N., and Cioni, P. L. (2013). Effect of growth stage on essential-oil yield and composition of *Daucus sahariensis*. *Chemie & Biodiversität*, 10(11), 2057-2064.
40. Ložienė, K., Vaičiulytė, V., and Maždzierienė, R. (2021). Influence of different light spectra on the growth and photosynthetic characteristics of lettuce. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(1), 27.
41. Da Silva, E. A. J., Da Silva, V. P., Alves, C. C. F., Alves, J. M., Souchie, E. L., and Barbosa, L. C. A. (2016). Harvest time on the content and chemical composition of essential oil from leaves of *guava*. *Ciência Rural*, 46(10), 1771-1776.
42. Gas-Pascual, E., Berna, A., Bach, T. J., and Schaller, H. (2014). Plant oxidosqualene metabolism: Cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 9(10), e109156.
43. Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signaling*, 19(9), 1807-1819.

44. Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., and Yu, X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Journal of Natural Products Communications*, 15(1), 1-13.
45. Singh, R., Devi, S., and Gollen, R. (2015). Rôle des radicaux libres dans l'athérosclérose, le diabète et la dyslipidémie : plus grands que nature. *Diabetes & Metabolic Research Reviews*, 31(1), 113-127.
46. Ozgen, S., Kivilcim Kilinc, O., and Selamoglu, Z. (2020). Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review. *Molecules*, 25(10), 2489.
47. López-López, G., Moreno, L., Cogolludo, A., Galisteo, M., Ibarra, M., Duarte, J., Lodi, F., Tamargo, J., and Perez-Vizcaino, F. (2004). Nitric oxide (NO) scavenging and NO-protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, 65(4), 851-857.
48. Kim, J. H., Kang, M. J., Choi, H. N., Jeong, S. M., Lee, Y. M., and Kim, J. I. (2011). Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice*, 5(2), 107-111.
49. Shi, G.-J., Li, Y., Cao, Q.-H., Wu, H.-X., Tang, X.-Y., Gao, X.-H., Yu, J.-Q., Chen, Z., and Yang, Y. (2018). In vitro and in vivo evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1585-1599.
50. Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., and Sugimoto, H. (2008). Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and *in silico* studies reveal novel pharmacophore features. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(8), 819-825.
51. Khan, M.T.H., Orhan, I., Şenol, F.S., Kartal, M., Şener, B., Dvorská, M., Šmejkal, K., and Šlapetová, T. (2009). Effets antioxydants et protecteurs du foie du composé 2-(4-hydroxyphényl)-1,3-benzothiadiazole sur les dommages hépatiques induits par le tétrachlorure de carbone chez le rat. *Chemico-Biological Interactions*, 181, 383.
52. Abdalla, F. H., Schmatz, R., Cardoso, A. M., Carvalho, F. B., Baldissarelli, J., de Oliveira, J. S., and Mazzanti, C. M. (2014). Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: Possible

- involvement of the acetylcholinesterase and Na(+),K(+)-ATPase activities. *Physiology & Behavior*, 135, 152-167.
53. Bouamama, H., Noël, T., Villard, J., Benharref, A., and Jana, M. (2005). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2), 104-107.
54. Islam, A., Sayeed, A., Sadik, G., Rahman, M. M., and Khan, G. R. M. A. (2001). Antimicrobial activity and cytotoxicity of clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia* seed. *Journal of Medical Sciences*, 1, 320-323.
55. Zhang, J., Jain, S., Jacob, M., Tekwani, B., Hufford, C. D., and Ilias, M. (2013). Antileishmanial and antimicrobial clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia*. *Planta Medica*, 79(05), P88.
56. Barbosa, A. L. P., Wenzel-Storjohann, A., Barbosa, J. D., Zidorn, C., Peifer, C., Tasdemir, D., and Çiçek, S. S. (2019). Antimicrobial and cytotoxic properties of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its major diterpene acids. *Journal of Plant Medicine*, 85(1-2), 94-100.
57. Dar, A. M., and Mir, S. (2017). Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 8(1), 356.
58. Tagami, T., Yamashita, K., Okuyama, M., Mori, H., Yao, M., and Kimura, A. (2013). Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant α -glucosidases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 19296-19303.
59. Alasmary, F. A. S., Alnahdi, F. S., Ben Bacha, A., El-Araby, A. M., Moubayed, N., and Alafeefy, A. M. (2017). New quinoxalinone inhibitors targeting secreted phospholipase A2 and α -glucosidase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 25(18), 1143-1151.
60. Zhou, F. C., Gao, F., Bian, J. S., and Shan, F. (2009). Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), 11463-11468.

IV.2. L'espèce *S. hispidula*

IV.2.1. Teneur en molécules bioactives

Le tableau 12 présente les valeurs obtenues pour les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes.

Tableau 12. Teneur en polyphénols et flavonoïdes des extraits de *S. hispidula*.

Sample	TPC (mg EAG /g extrait)	TFC (mg EQ /g extrait)
<i>S. hispidula</i> EE	85,7±0,46	22,9±0,21
<i>S. hispidula</i> EA	131,24±0,81	22,5±1,55
<i>S. hispidula</i> EH	0,95±0,30	1,60±0,03

TP : polyphénols totaux, TF : flavonoïdes totaux, EAG : équivalent d'acide gallique EQ : équivalent de quercétine, EE : extrait éthanolique ; EA : extrait aqueux, EH : extrait hexanique

La teneur en polyphénol totaux (TP) de l'extrait aqueux de *S. hispidula* était de $131,24 \pm 0,81$ mg d'EAG/g d'extrait. Les niveaux de TP étaient nettement supérieurs à ceux de l'extrait éthanolique ($85,7 \pm 0,46$ EAG/g d'extrait). L'extrait hexanique de *S. hispidula* possède la teneur totale en polyphénols la plus faible, avec une valeur moyenne de $0,95 \pm 0,30$ mg EAG/g d'extrait. Cependant, en termes de teneur totale en flavonoïdes (TF), aucune différence significative n'a été observée entre l'extrait éthanolique ($22,9 \pm 0,21$ mg EQ/g d'extrait) et l'extrait aqueux ($22,5 \pm 1,55$ mg EQ/g d'extrait). Encore une fois, L'extrait hexanique de *S. hispidula* avec une quantité totale de flavonoïdes plus faible, avec une valeur maximale de $1,60 \pm 0,03$ mg EQ/g d'extrait.

Les résultats exposés dans le tableau 12 suggèrent que les extraits de *S. hispidula* sont une source importante de polyphénols et de flavonoïdes. Il est bien connu que ces composés possèdent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antitumorales.

IV.2.2. Caractérisation par UHPLC-DAD-ESI/MS des extraits de *S. hispidula*

La teneur phénolique des extraits éthanoliques et aqueux de *S. Hispidula* a été analysée à l'aide de la technique UHPLC-ESI-MS/MS (Figure 16 et 17). Comme indiqué dans le tableau 13, un total de 29 et 19 composés phénoliques ont été détectés pour la première fois dans les extraits éthanoliques et aqueux de *S. hispidula*, respectivement.

Dans l'ensemble, les deux chromatogrammes ont été caractérisés par la présence de plusieurs acides phénoliques et de plusieurs flavonoïdes identifiés sur la base de leurs schémas de fragmentation et des données rapportées dans le tableau 13. L'analyse UHPLC-ESI-MS/MS des extraits éthanoliques et aqueux de *S. hispidula* a mis en lumière une composition phénolique distincte entre les deux types d'extraits, l'acide 5-*O*-caféoylquinique demeurant néanmoins le composé majoritaire dans les deux cas.

Tableau 13. Composition phénolique des extraits éthanoliques et aqueux de *S. hispidula* par UHPLC-DAD-ESI/MS.

N°	TR (min)	[M-H] ⁻	MS ² fragments	Composé identifié	Quantification (µg/ mg d'extrait)	
					EE	AE
1	5,32	353	191, 179, 135	3-O-CQA	4,54±0,49	13,39±2,39
2	7,85	353	191, 179, 135, 173	Isomère 1 de 5-O-CQA	3,02±0,00	26,05±4,89
3	8,08	353	191, 179, 135, 173	Isomère 2 de 5-O-CQA	9,85±2,04	/
4	8,33	353	173, 179, 191	Isomère 1 de 4-O-CQA	1,46±0,60	13,97±2,52
5	8,52	353	173, 179, 191	Isomère 2 de 4-O-CQA	6,32±1,14	/
6	8,85	179	135	Acide caféique	0,55±0,04	/
7	9,12	225	97	Inconnu	NQ	NQ
8	9,34	609	447, 285	Kaempférol-O-dihexoside	0,69±0,23	1,91±0,65
9	9,58	353	191, 179, 173, 135	1-O-CQA	NQ	NQ
10	9,64	667	505, 463, 301	Quercétine 7-O-hexoside 3-O-(malonylhexoside)	2,84±0,28	/
11	9,77	593	473, 503, 353, 575	Apigénine 6,8 di-C-hexoside	1,59±0,17	4,44±0,78
12	10,54	651	489, 285, 447, 531	Kaempférol (6"-acétylglucoside) glucoside	4,05±0,40	5,11±1,57
13	11,63	609	301, 343	Rutin	0,52±0,13	2,21±0,80
14	12,03	463	301	Quercétine-hexoside	1,07±0,20	3,38±0,93
15	12,15	461	285	Lutéoine-7-O-glucuronide	/	6,27±0,75
16	12,19	447	284, 285, 327, 255, 151	Lutéoine-7-O-glucoside	2,12±0,30	/
17	12,57	505	301, 463	Isomère 1 de Quercétine-O-Acétyl Glucoside	0,38±0,16	3,44±1,01
18	12,97	515	353, 299, 203, 317	4,5-O-di CQA	/	0,98±0,05

19	13,03	447	285	Kaempférol-O-hexoside	9,06±0,79	/
20	13,34	505	301, 463	Isomère 2 de Quercétine-O-Acétyl Glucoside	5,34±0,53	/
21	13,49	445	269, 175	Apigénine 7-O-glucuronide	1,20±0,37	19,47±4,09
22	13,66	515	353, 299, 203, 317	4,5-O-diCQA	2,37±0,18	4,91±0,94
23	13,85	359	161, 179, 197, 223	Acide rosmarinic	2,73±0,29	2,18±0,49
24	14,53	489	284, 285, 327, 255	Lutéoline-O-acétylhexoside	1,43±0,19	068±0,27
25	14,89	537	519, 357	2,8''-Biapigénine	/	0,05±0,09
26	17,77	359	344	Isomère 1 d'Ophiopogonanone E	NQ	NQ
27	19,15	329	314	Diméthylquercétine	2,72±0,27	/
28	19,53	359	344	Isomère 2 d'Ophiopogonanone E	NQ	/
29	19,97	309	291, 171, 251, 237	Acide oxodihydroxyoctadécénoïque	NQ	NQ
30	20,39	329	311, 171, 201, 293	Acide trihydroxyoctadécénoïque	NQ	/
31	20,5	343	328	5,2'-Dihydroxy-7,8,6'-triméthoxyflavone	NQ	/
32	21,09	311	293, 223, 275	Acide dihydroxyoctadécadiénoïque	NQ	/
33	23,68	339	339, 183, 275	Inconnu	NQ	/

Temps de rétention (RT), ion pseudomoléculaire ([M-H]⁻), Extrait éthanolique (EE), Extrait aqueux (EA), non quantifié (NQ), traces (Tr), Acide caféoylquinique (CQA)

RT: 0.00 - 34.00

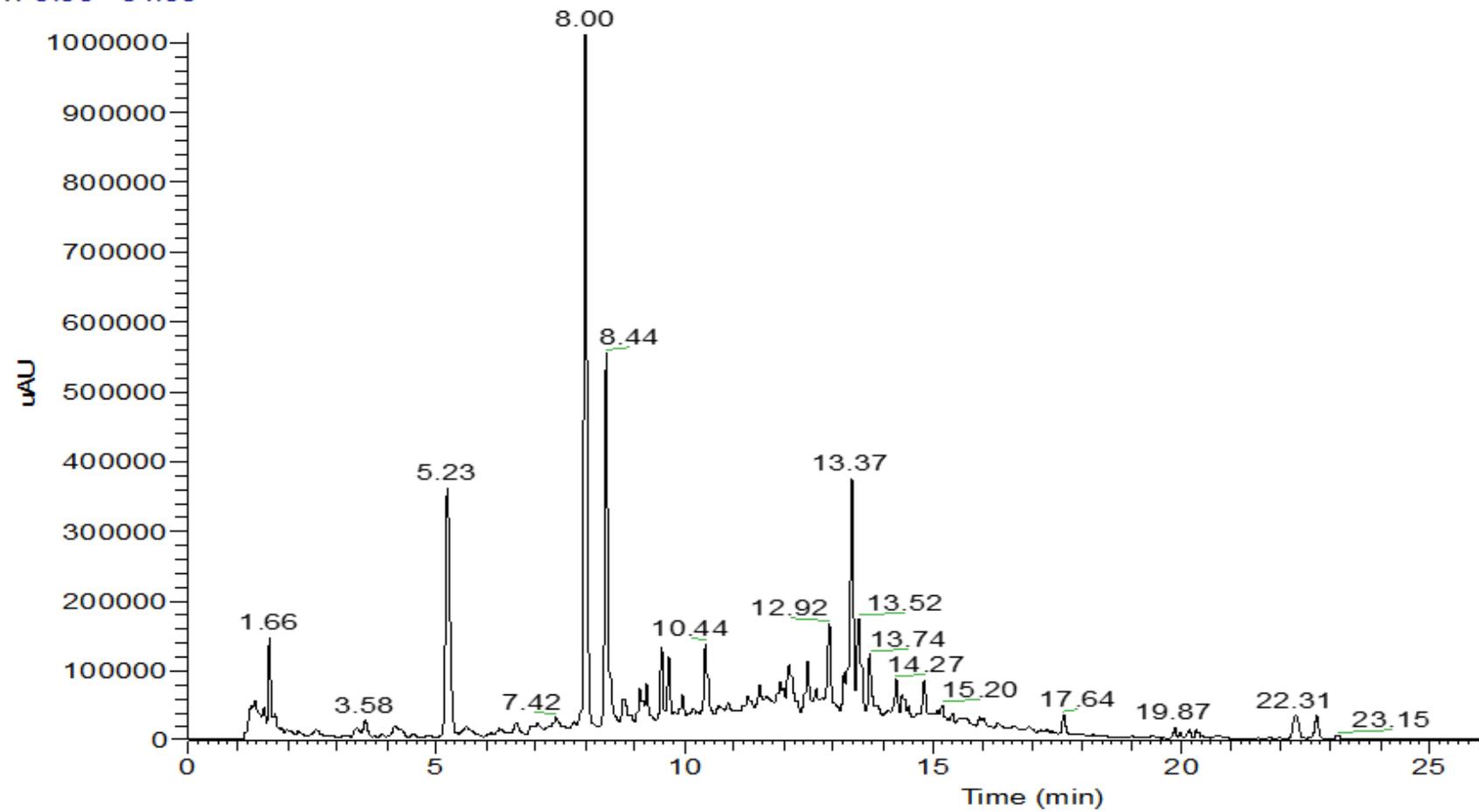


Fig. 16. Chromatogramme UHPLC des extraits éthanolique de *S. hispidula* enregistré à 280 nm.

RT: 0.00 - 34.00

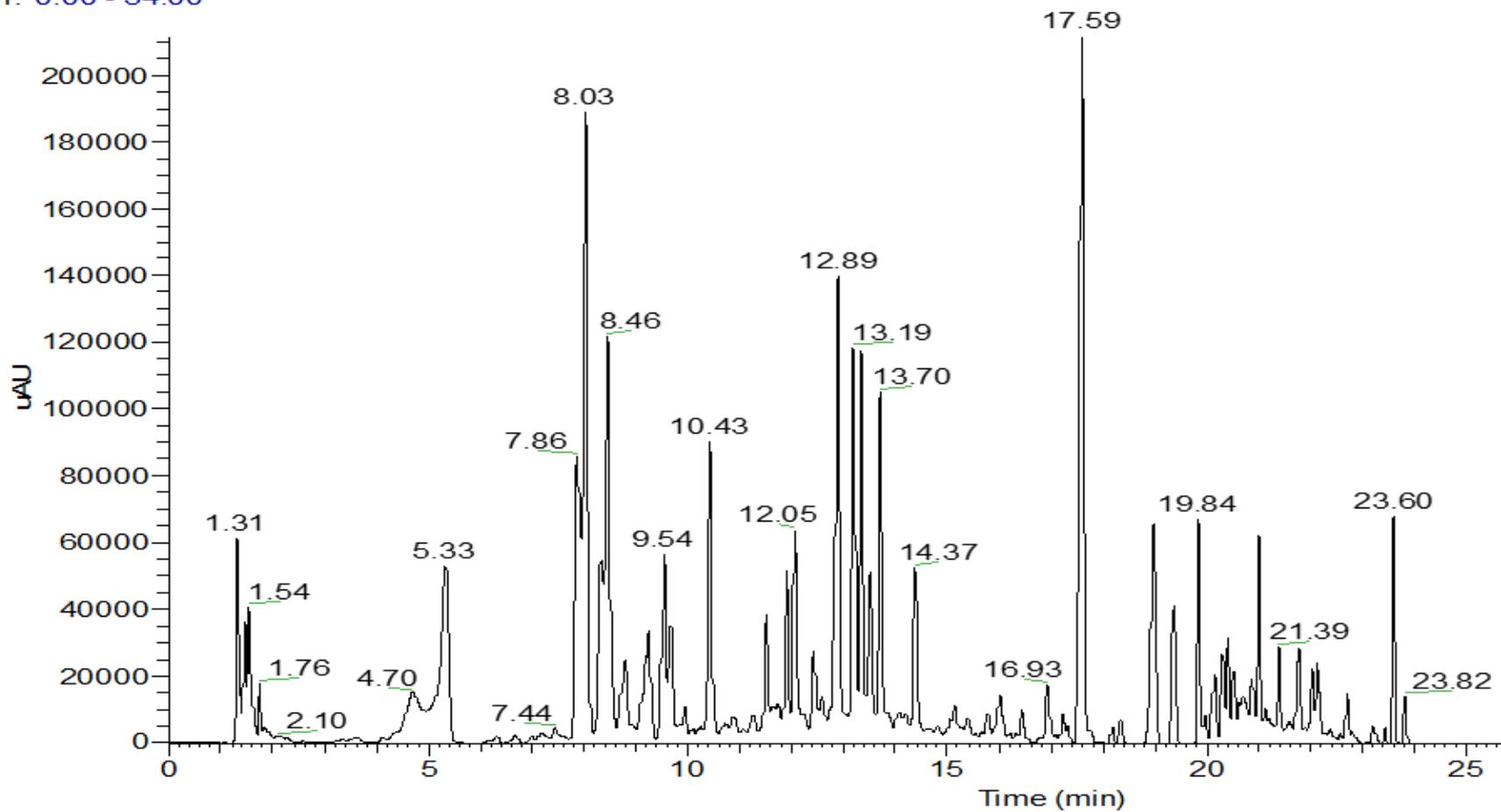


Fig. 17. Chromatogramme UHPLC des extraits éthanolique (a) et aqueux (b) de *S. hispidula* enregistré à 280 nm.

Huit dérivés de l'acide phénolique (pics 1 à 5, 9, 18 et 22) ont été identifiés sur la base de leurs schémas de fragmentation. Les pics 1 à 5 et 9 présentaient le même ion $[M-H]^-$ à m/z 353, libérant un fragment d'ion MS^2 à m/z 191 ($[M-162]^-$) en raison de la perte d'un fragment caféoylé, ont été identifiés comme des isomères de l'acide caféoylquinique (CQA). Sur la base de leurs temps de rétention et de leurs schémas de fragmentation, ces composés ont été attribués aux 3-*O*-CQA, 5-*O*-CQA, 1,5-*O*-CQA, 1,4-*O*-CQA, isomère 2 de 1,4-*O*-CQA et 1-*O*-CQA, respectivement [1-2]. Le pic 6 a été attribué à l'acide caféique par comparaison avec l'étalon pur injecté dans les mêmes conditions. Les pics 18 et 22 avec un ion $[M-H]^-$ à m/z 515, ont été attribués aux isomères de l'acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique. Ces composés produisaient des ions fragments à m/z 353, 191 et 179 caractéristiques des fragments de l'acide monocaféoylquinique, de l'acide quinique et de l'acide caféique respectivement [1].

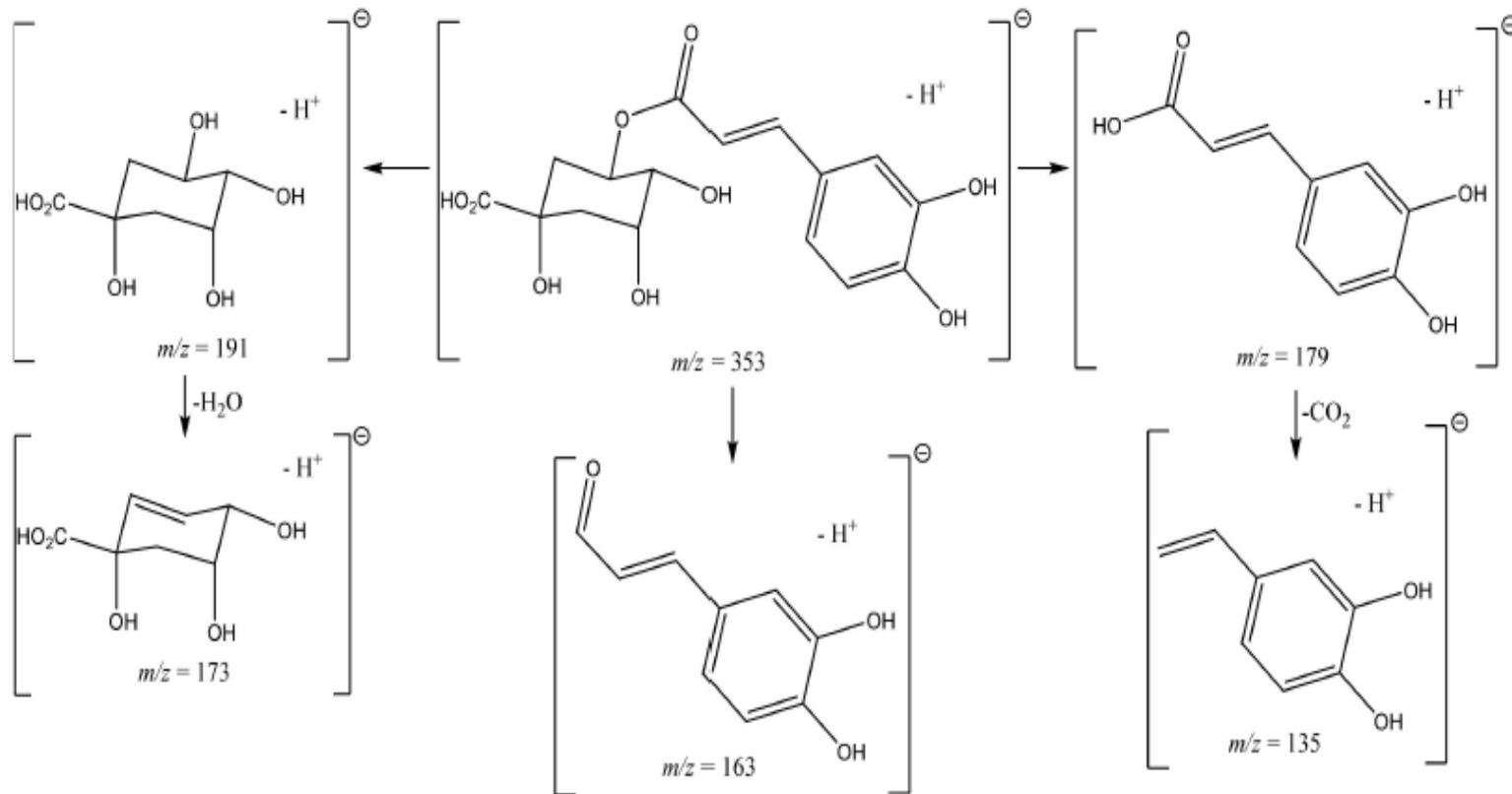
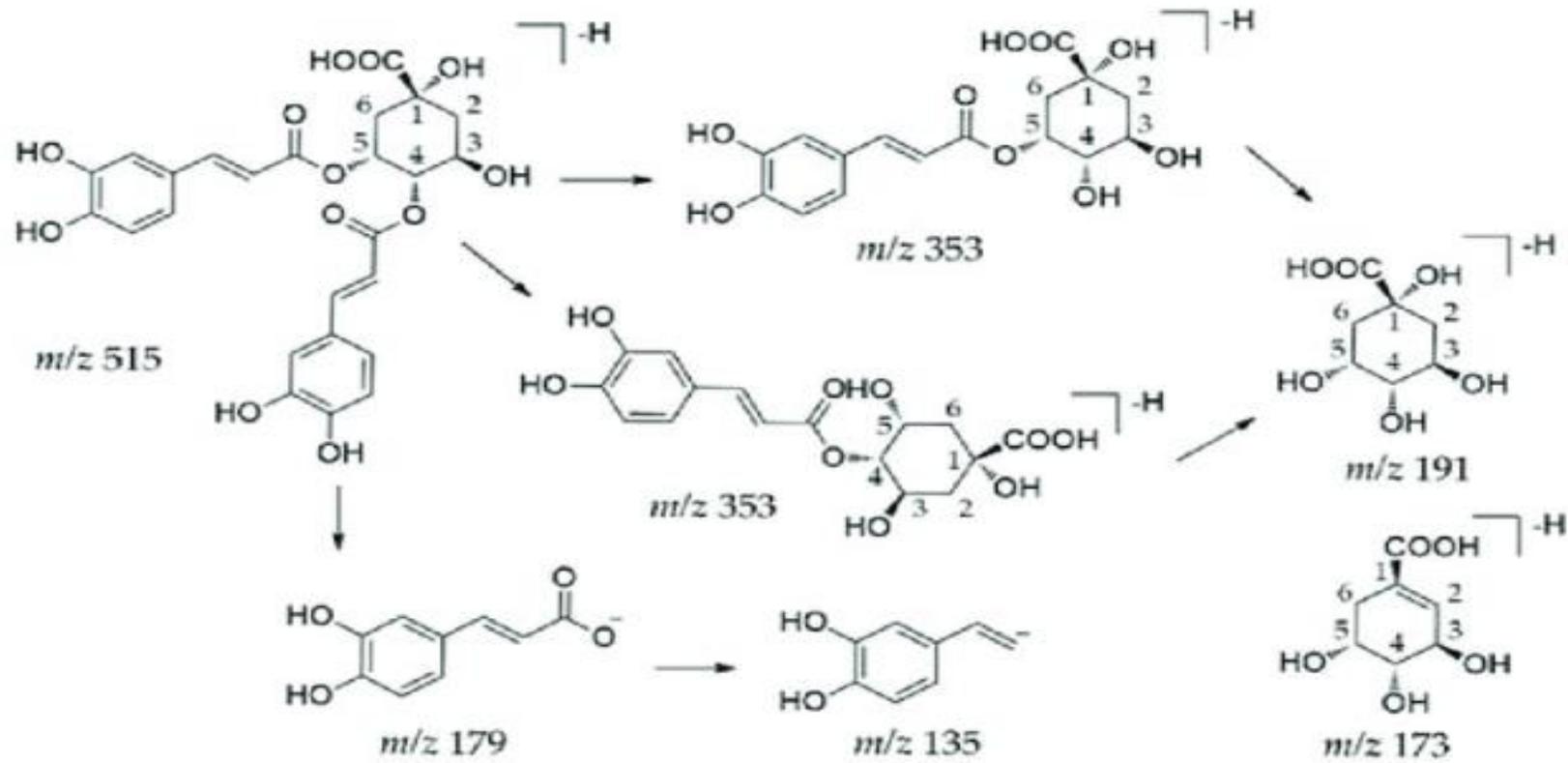


Fig.18. Principaux fragments du 5-O-CQA m/z 353, composé majoritaire des extraits aqueux et éthanolique de *S. hispidula*

**Fig.19.** Principaux fragments du 4,5-O-diCQA m/z 515

Vingt flavonoïdes, dont quatorze glycosides de flavonoïdes (pics 8, 10-17, 19-21, 24) et sept flavonoïdes aglycones (pics 23, 25, 26, 27, 28, 31 et 33), ont été également trouvés dans les deux extraits analysés. Le pic 8 montrait un ion $[M-H]^-$ à m/z 609 et était attribué au kaempférol-*O*-dihexoside. Cet ion a subi une fragmentation successive en perdant deux fragments hexosyle, produisant un pic à m/z 447 et un autre pic à m/z 289 typique du kaempférol. Sur la base des données de la littérature et de son profil MS^2 affichant un ion $[M-H]^-$ à m/z 667 et libérant des ions fragments MS^2 à m/z 505, 463, 301, le pic 10 a été attribué, à la quercétine 7-*O*-hexoside 3-*O*-(malonylhexoside) [3]. Le pic 11 présentait un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 593 et des pics principaux à m/z 473 $[M-H-120]$ et m/z 353 $[M-H-120+120]$, révélant un schéma de fragmentation de flavone di-*C*-glycoside. Ce composé a été attribué à l'apigénine-6,8-di-*C*-hexoside selon les données de la littérature MS [4]. Le pic 12 a été attribué au glucoside de kaempférol (6"-acétylglucoside) sur la base de son ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ se produisant à m/z 651 et libérant un fragment principal à m/z 489, qui correspond au kaempférol-(6"-hexoside) et un autre fragment typique en 285 correspondant au kaempférol [5]. Le pic 13 avec $[M-H]^-$ à m/z 609 a généré des fragments à m/z 343 et 301. Ce composé a été attribué à la rutine sur la base de son schéma de fragmentation et des données de la littérature [6]. Le composé 14 présentait un ion pseudo moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 463, libérant un fragment MS^2 à m/z 301 ($[M-162]^-$, perte d'un fragment hexose) correspondant à la quercétine, ce qui a permis l'identification de le composé sous forme de quercétine-hexoside [5, 7]. Le pic 15 présentant un ion ($[M-H]^-$ à m/z 461 et le fragment principal MS^2 à m/z 285 ($[M-H-176]^-$ en raison de la perte du fragment glucuronyle a été identifié comme étant de la lutéoline-7-*O*-glucuronide [8]. Le pic 16 montrant un ion pseudomoléculaire à m/z 447 a été identifié comme étant le lutéoline-7-*O*-glucoside en comparant son temps de rétention et son profil MS avec l'étalon commercial injecté dans les mêmes conditions chromatographiques.

Pics 17 et 20 montrant des schémas de fragmentation similaires avec des ions $[M-H]^-$ à m/z 505 et des fragments MS^2 à m/z 463 $[M-H-42]^-$ et 301 $[M-H-162+42]^-$, en raison de la perte des groupes d'acétyle et d'acétyl-*O*-glucoside, respectivement. Ces pics ont été attribués à des isomères de la quercétine-*O*-acétylglucoside. Le pic 19 a présenté un ion $[M-H]^-$ à m/z 447 et un fragment principal MS^2 à m/z 285 $[M-H-162]^-$ résultant de la perte d'un

fragment hexosyle. Ainsi, sur la base de ce schéma de fragmentation et de son spectre UV, ce composé a été attribué au kaempférol-*O*-glucoside [7].

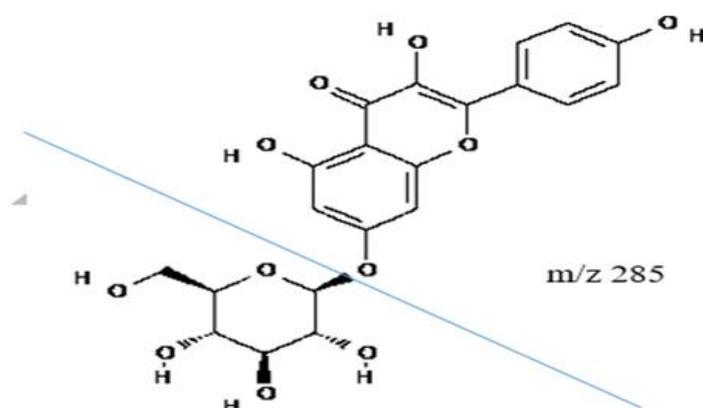


Fig. 20. Principaux fragments du Kaempferol-*O*-glucoside m/z 447

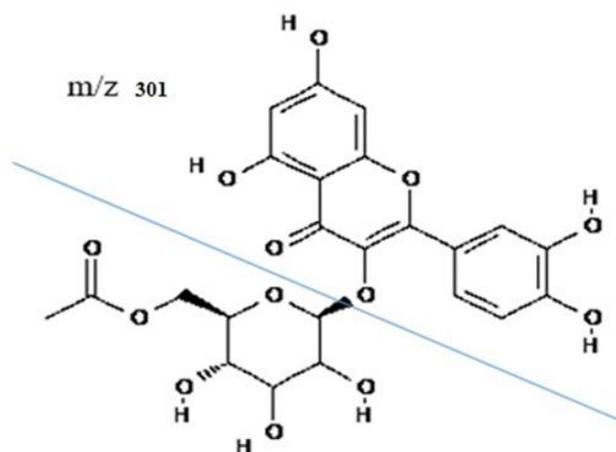


Fig.21.Principaux fragments du Quercétine-*O*-acetyl glucoside m/z 505

Le pic 21 montrait un ion $[M - H]^-$ à m/z 445 et un fragment principal à m/z 269, en raison de la perte d'une unité glycuronyle. Ainsi, ce composé a été attribué à l'apigénine-7-*O*-glycuronide [9]. Le pic 23 montrant un ion pseudomoléculaire à m/z 359 a été identifié comme étant de l'acide rosmarinique en comparant son temps de rétention et son profil MS avec un standard pur injecté dans les mêmes conditions chromatographiques.

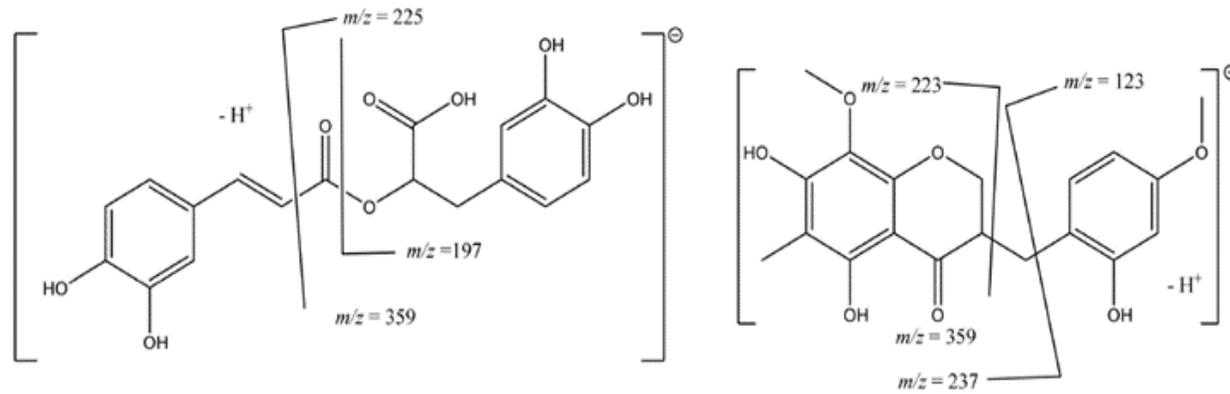


Fig. 22. Fragments principaux de l'acide rosmarinique m/z 359 et de l'Ophiopogonanone m/z 359

Pic 24 avec un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 489 et des fragments MS^2 à m/z 327 $[M-H-120]^-$ et à m/z 285 $[M-H-162+42]^-$, en raison de la perte de fragments acétyle et acétyl-*O*-glucoside, respectivement. Ce composé a été attribué à la lutéoline-*O*-acétylglucoside. Le pic 25 présentant l'ion $[M-H]^-$ à m/z 537 produisant un fragment principal à m/z 519 $[M-H-H_2O]^-$, et un autre ion fragment à m/z 357 $[M-H-162]^-$ pourrait être attribué à la biapigénine liée en C-C (2,8''-biapigénine) [10]. Les pics 26 et 28 présentaient un schéma de fragmentation similaire avec l'ion $[M-H]^-$ à m/z 359 produisaient le même fragment principal à m/z 344 $[M-H-15]^-$. Sur la base d'une recherche documentaire, ces composés ont été provisoirement identifiés comme étant deux isomères du flavonoïde ophiopogonanone E [11]. Le pic 27 a été identifié comme étant de la diméthylquercétine sur la base de son schéma de fragmentation présentant un ion $[M-H]^-$ à m/z 329 et des ions fragmentés à m/z 314 ($[M-H-15]^-$) et m/z 299 ($[M-H-15+15]^-$) résultant de la perte successive d'un et deux groupes méthyle respectivement [12]. Le pic 31 présentait un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 343 produisant un fragment principal à m/z 328 $[M-H-15+15+15]^-$ résultant de la perte de trois groupes méthyle de l'ion à m/z 343. Compte tenu de cela et en s'appuyant sur des données de la littérature, ce composé a été attribué à la 5,2'-dihydroxy-7,8,6'-triméthoxyflavone [13].

Les composés suivants : l'acide 3-*O*-cafféoylquinique (1), l'acide 5-*O*-cafféoylquinique (2), l'acide 4-*O*-cafféoylquinique (3), le kaempférol-*O*-dihexoside (8), l'apigénine-6,8-di-*C*-hexoside (11), le kaempférol (6''-acétylglucoside)glucoside (12), la rutine (13), la quercétine-hexoside (14), l'apigénine-7-*O*-glycuronide (21), l'acide 4,5-*O*-dicafféoylquinique (22), l'acide rosmarinique (23), la lutéoline-*O*-acétylhexoside (24), l'ophiopogonanone E (26), l'acide oxodihydroxyoctadécénoïque (29) ont également été détectés simultanément dans les extraits aqueux et éthanoliques.

Il est important de souligner que l'extrait aqueux présente une teneur en acides caféoylquiniques particulièrement élevée par rapport à l'extrait éthanolique. De plus, l'extrait aqueux présente également des teneurs en glycosides flavonoïdes plus élevées (46,92 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait) que l'extrait éthanolique (30,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait).

D'autres composés étaient également présents dans l'extrait éthanolique, bien qu'en concentrations moindres, à savoir l'acide oxodihydroxyoctadécénoïque, l'acide trihydroxyoctadécénoïque et l'acide dihydroxyoctadécénoïque.

IV.2.3. Caractérisation par GC-MS de l'espèce *S. hispidula*

IV.2.3.1. Huile essentielle de *S. hispidula*

Le profil chimique de l'HE de *S. hispidula* ont été identifiés par analyse GC-MS (Figure 23). Les composés identifiés avec leur temps de rétention (Rt) sont présentés dans le tableau 14.

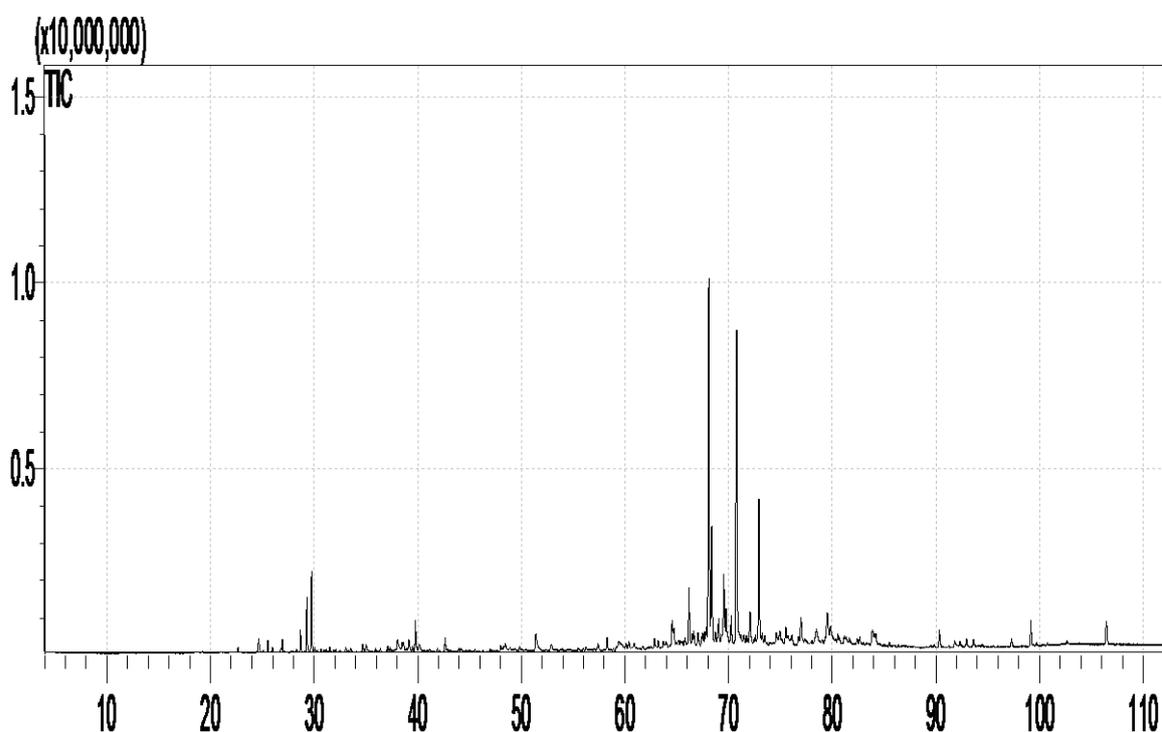


Fig. 23. Chromatogramme ionique total (TIC) de l'huile essentielle de *S. hispidula*.

L'analyse chimique de l'huile essentielle de l'espèce *S. hispidula* a permis l'identification de 83 composés, répartis en plusieurs classes. Les composés identifiés étaient principalement des monoterpènes, des sesquiterpènes et des esters. Les monoterpènes représentent la classe la plus abondante et étaient représentés par le menthone (43,79 %), le pulégone (23,52 %) et la pipéritone (1,92 %). Les sesquiterpènes les plus abondants étaient le caryophyllène (0,66 %), le germacrène-D (1,82 %) et l'alpha-humulène (0,16 %). Les esters les plus abondants étaient l'acétate de terpinène-4-ol (0,53 %), l'acétate d'isopulégol (0,24 %) et l'acétate d'alpha-terpinényle (0,25 %) (Tableau 14).

Les terpènes sont un groupe de composés organiques volatils qui sont naturellement présents dans de nombreuses plantes. Les terpènes ont une variété de fonctions dans les plantes, notamment la protection contre les insectes, les maladies et les prédateurs. Ils possèdent également des vertus anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales, antidiabétiques et anticancéreuses [14]. Le menthone, composé majoritaire de *S. hispidula*, est un monoterpène doté d'activités antibactérienne, antifongique, antibiofilm, et anti-inflammatoire [15-17].

L'étude du profil de l'HE de *S. hispidula* a montré que le profil obtenu est en accord avec les résultats obtenus par [18] qui ont rapporté que l'huile essentielle de *S. hispidula* est constituée principalement de menthone (33,59 %), d'oxyde de pipéritone (24,72 %), de pulégone (12,75 %) et de cyclohexanone, 2-(1-méthyléthylidène) (9,77 %).

Nos résultats sont aussi en accord avec ceux obtenus avec une espèce du même genre, *Saturejababorensis* (*Calamintababorensis*). Ainsi, [19] ont rapporté que les constituants majeurs de l'huile de cette espèce étaient l'isomenthone (67,44 %), la pulégone (15,07 %) et l'oxyde de pipéritone (6,53 %).

La composition des HE des plantes est sous la dépendance de nombreux facteurs, tels que le moment de la récolte, les conditions climatiques, l'âge de la plante, le sol, etc. [20-22]. Ces facteurs peuvent influencer les voies métaboliques de la plante et la production de différents composés.

La période de la récolte a un impact significatif sur la composition chimique de l'essence. En général, la concentration en huile essentielle est maximale le matin, lorsque la plante est encore fraîche [23].

Des études ont également montré que les huiles essentielles des plantes jeunes sont généralement plus riches en composés terpéniques, tandis que celles des plantes matures sont plus riches en composés oxygénés.

Tableau 14. Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *S. hispidula*

N°	Composé identifié	TR	% A±SD
1	2-Hexanal	5,380	0,01±0
2	Alpha-Pinène	8,448	0,06±0,01
3	Sabinène	10,398	0,10±0,01
4	Beta-Pinène	10,602	0,14±0,01
5	1-Octen-3-ol	10,901	0,08±0
6	Myrcène	11,381	0,19±0,01
7	3-Octanol (CAS) N-Octan-3-ol	11,854	0,77±0,02
8	Alpha-Terpinène	12,838	0,06±0,01
9	D-Limonène	13,559	1,17±0,02
10	Eucalyptol (1,8-Cineole)	13,701	0,04±0
11	Cis-Ocimène	14,118	0,09±0,01
12	Phénylacétaldéhyde	14,394	0,05±0
13	Gamma-Terpinène	15,346	0,14±0,02
14	Trans-Sabinène Hydrate	16,111	0,78±0,01
15	Terpinolène	17,033	0,05±0
16	4-Isopropyl-1-Méthylcyclohex-2-énol	18,062	0,09±0,01

17	Linalol	18,178	0,15±0,01
18	2-Cyclohexén-1-ol,	19,454	0,13±0,01
19	Acide cyclobutanecarboxylique,	19,581	0,08±0,01
20	P-Mentha-E-2,8(9)-Dién-1-ol	20,479	0,06±0,01
21	Isomenthone	21,635	0,37±0,02
22	Menthone	22,495	43,79±0,19
23	Cyclohexanol	22,603	0,04±0,01
24	Bornéol L	22,722	0,11±0,02
25	Cis-Isopulégone	22,929	1,06±0,03
26	Cyclohexanol	23,095	0,05±0,01
27	Terpinèn-4-ol	23,280	0,87±0,01
28	Acide 9-Décénoïque	23,518	0,04±0
29	2-Hydroxyméthyl-2-Méthylbrétrandane	23,823	0,06±0
30	L-Alpha-Terpineol	24,311	0,29±0,01
31	2-Cyclohexén-1-ol,	24,608	0,10±0,01
32	3a,6-Méthano-3aH-indène-5(4H)-one, Hexahydro-	25,158	0,04±0
33	5-Éthyl-6-undécanone	25,522	0,03±0
34	Cyclohexanone, 2-Isopropyl-2,5-diméthyl-	25,641	0,06±0
35	8,9-Déhydrothymol	25,847	0,11±0
36	Pulégone	27,305	23,52±0,11

37	7-Oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one,	28,118	7,55±0,1
38	Pipéritone	28,229	1,92±0,05
39	Cis-Dihydrocarvone	28,531	0,03±0
40	Cyclohexène	28,991	0,11±0,02
41	Isopipéritenone	29,103	0,18±0,01
42	7-Octén-3-ol, 2,3,6-triméthyl-	29,497	0,02±0
43	P-Menth-8-én-3-ol, Acétate	30,092	0,25±0,01
44	Endobornyl Acétate	30,242	0,03±0,01
45	Bicyclo[3.2.0]heptan-2-one	30,412	0,38±0,02
46	2H-1-Benzopyrane	30,682	0,03±0
47	8-Oxabicyclo[5.1.0]oct-2-ène-4-one	30,836	0,05±0
48	Alpha.-Iso-Méthyl Ionone	30,977	0,16±0,01
49	6-Hydroxycarvotanacétone	31,262	0,25±0,1
50	Isopulegyl Acétate	31,846	0,24±0,02
51	1-Hydroxy-P-Menth-3-one	32,340	0,36±0,01
52	Pipéritenone	33,564	1,34±0,02
53	Alpha.-Terpinenyl Acétate	34,358	0,53±0,01
54	Eugénol	34,656	0,10±0,01
55	Pipéritenone Oxyde	35,177	4,94±0,02
56	Alpha.-Copaène	36,002	0,04±0

57	Beta. Bourbonène	36,448	0,06±0
58	Butyl 4,7,10,13,16,19-Docosahexaénoate	36,786	0,11±0,01
59	Beta. Elémène	36,988	0,03±0
60	2-Cyclopentén-1-one,	37,223	0,06±0
61	2-Butanone,	38,370	0,05±0
62	Caryophyllène	38,642	0,66±0,01
63	Alpha.-Humulène	40,854	0,16±0,02
64	Alloaromadendrène	41,095	0,07±0,01
65	(E)-Beta.-Famsène	41,226	0,14±0,01
66	(Z)-4-Chloro-2,3-Diméthyl-1,3-Hexadiène	41,587	0,04±0,01
67	Germacrene D	42,472	1,82±0,01
68	Undéca-2,6-diène	43,347	0,91±0,01
69	Bêta-Elémène	43,999	0,04±0
70	Delta-Cadinène	44,854	0,06±0
71	Spathulénol	48,081	0,13±0,01
72	Oxyde de Caryophyllène	48,308	0,03±0
73	Isospathulénol	51,324	0,03±0
74	Alpha-Cadinol	52,616	0,04±0
75	2-Pentadécanone	63,014	0,06±0
76	Acide N-Hexadécanoïque	69,103	0,76±0,01

77	Acide Palmitique	73,091	0,09±0
78	Phytol	75,778	0,27±0,01
79	Acide 9,12-Octadécadiénoïque	76,682	0,09±0
80	Acide 9,12,15-Octadécatriénoïque	76,954	0,63±0,01
81	Eicosane	92,249	0,07±0
82	Dotriacontane	99,689	0,15±0,01
83	Hexatriacontane	107,156	0,15±0,01

SD : écart type, TR : temps de rétention. NQ : non quantifié, Tr : traces, A : surface du pic.

3.3.2. Composition lipophile de l'extrait hexanique de *S. hispidula*

Le tableau 15 met en évidence la composition lipophile de l'extrait hexanique de *S. hispidula*. L'analyse révèle la présence d'une diversité de composés, comprenant des terpènes, des acides gras, des acides carboxyliques et des alcanes.

Acides carboxyliques et acides gras

Les acides carboxyliques ainsi que les acides gras étaient les plus abondants dans l'extrait hexanique de *S. hispidula* et ont été représentés notamment par l'acide oléique 1 (21) ($179,07 \pm 48,48$ µg/mg d'extrait), l'acide palmitique (19) ($95,15 \pm 27,76$ µg/mg d'extrait) et l'acide 9,12-octadécadiénoïque (20) ($80,49 \pm 23,17$ µg/mg d'extrait). Les autres acides gras et acides carboxyliques détectés dans l'extrait de *S. hispidula* sont : l'acide myristique (16), l'acide 9-hexadécénoïque (17), l'acide 3-octénoïque (18), l'acide oléique 2 (22), l'acide stéarique (23) et l'acide α -linoléique (24), l'acide arachidique (25), l'acide béhénique (26), et l'acide lignocérique (27) et l'acide phosphorique (15).

Terpènes et stéroïdes

L'extrait hexanique de *S. hispidula* contient une variété de terpènes et de stéroïdes, notamment le 3-octène-2-ol (1), l'épiméthendiol (2), le néophytadiène 1 et 2 (3, 4), le phytol (5), la prostaglandine E2 (6), la 17 α -hydroxyprégnénolone (7), le 1-hexacosanol (8), le stigmasterol (9), la β -amyrine (10), le lup-20(29)-en.-3-ol (11), l'acide ursolique (12), le lup-20(29)-en-28-al (13) et l'isomère 2 de l'acide ursolique (14). Parmi les composés identifiés, l'acide ursolique isomère 1 et 2 se distingue comme élément majoritaire, avec des concentrations respectives de $13,90 \pm 7,93$ et $5,77 \pm 4,84$ µg/mg d'extrait. Ce triterpénoïde pentacyclique est naturellement présent dans une multitude de plantes, dont *Mimus opscaffra*, *Ilex para guariensis* et *Glechoma hederacea*, qui sont reconnues comme sources majeures de ce composé. L'identification d'acide ursolique dans *S. hispidula* laisse entrevoir un éventail de propriétés biologiques prometteuses, notamment anti-inflammatoires, anticancéreuses, antidiabétiques, antioxydantes et antibactériennes, comme le confirment des études [24-25].

Alcanes

L'extrait hexanique de *S. hispidula* contient également une variété d'alcanes, notamment le 2-méthyltétracosane (28), le pentacosane (29), le dotriacontane (30), l'hexacosane (31), le

2-méthyl-octacosane (32), l'hexatriacontane (33), le nonacosane (34), l'hexatriacontane (35), le dotriacontane (36), l'hexacosane (37), le tétracontane (38), l'octacosane (39), l'octadécane (40), le pentatriacontane¹ et 2 (41, 42) et l'hexacosane (43). L'octadécane ($54.15 \pm 20.47 \mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait) était le plus abondant parmi les composés de cette classe.

Tableau 15. Composition chimique de l'extrait hexanique de *S. hispidula* (Données exprimées en µg composé/mg d'extrait)

No	TR (min)	Composé identifié	Concentration moyenne (µg/mg d'extrait)
<i>Terpènes et steroids</i>			
1	22,424	3-Octén-2-ol	2,53±1,22
2	29,314	Épiméthendiol	0,75±0,0
3	33,984	Néophytadièneisomère 1	7,68±2,78
4	35,063	Néophytadièneisomère 2	1,21±0,90
5	42,028	Phytol	3,56±1,52
6	47,684	Prostaglandine E2	4,66±0,29
7	48,871	17 α -hydroxyprégnénone	1,42±1,08
8	58,403	1-Hexacosanol	1,11±1,14
9	65,934	Stigmastérol	3,11±1,86
10	67,792	β -Amyrine	1,21±1,84
11	69,014	Lup-20(29)-ène-3-ol	2,42±1,49
12	73,127	Acideursoliqueisomère 1	13,90±7,93
13	73,674	Lup-20(29)-ène-28-al	4,59±3,52
14	74,381	Acideursoliqueisomère 2	5,77±4,84
<i>Acides carboxyliques et acides gras</i>			

15	16,894	Acide phosphorique	2,93±0,84
16	34,291	Acide myristique	Tr
17	38,595	Acide hexadécénoïque-9	2,26±1,53
18	38,894	Acide octénoïque-3	1,14±1,29
19	39,218	Acide palmitique	95,15±27,76
20	42,878	Acide octadécadiénoïque-9,12	80,49±23,17
21	43,092	Acide oléique isomère 1	179,07±48,48
22	43,158	Acide oléique isomère 2	1,20±0,22
23	43,602	Acide stéarique	18,55±7,95
24	47,172	Acide α -linoléinique	10,12±0
25	47,994	Acide arachidique	3,23±2,42
26	51,554	Acide béhénique	1,84±1,93
27	55,855	Acide lignocérique	0,19±0,84
<i>Alcanes</i>			
28	46,580	2-Méthyltétracosane	1,29±0
29	50,696	Pentacosane	1,09±0,52
30	52,863	Dotriacontane	7,45±3,31
31	55,043	Hexacosane	0,75±0,78
32	56,485	Octacosane, 2-Méthyle	2,46±1,41
33	57,394	Hexatriacontane	17,72±7,20

34	59,128	Nonacosane	1,15±0,58
35	59,785	Hexatriacontane	0,83±0,65
36	61,349	Dotriacontane	3,02±1,81
37	62,318	Hexacosane	16,26±6,64
38	64,876	Tétracontane	2,66±1,48
39	66,503	Octacosane,	4,15±2,40
40	67,505	Octadécane,	54,15±20,47
41	69,378	Pentatriacontane	0,83±0,40
42	70,064	Pentatriacontane	2,14±0,91
43	72,663	Hexacosane	0,91±0,66

SD : écart type, TR : temps de rétention. NQ : non quantifié, Tr : traces

IV.2.4. Activité antioxydante

Le puissance antioxydante des extraits éthanoliques, aqueux et hexanique de *S. hispidula* a été évaluée au moyen de trois tests antioxydants différents (DPPH•, ABTS^{•+} et FRAP) (Tableau16).

Le terme "stress oxydatif" désigne un phénomène silencieux mais redoutable qui se déroule au cœur de nos cellules. Il s'agit d'une agression sournoise orchestrée par des molécules instables appelées "espèces réactives de l'oxygène" (ROS), également connues sous le nom de radicaux libres (RL).

Ces ROS, produits naturellement par l'organisme en faible quantité, jouent un rôle crucial dans divers processus biologiques. Cependant, lorsque leur production devient excessive ou que les mécanismes de défense antioxydants s'avèrent insuffisants, un déséquilibre s'installe, conduisant à un état délétère pour nos cellules : le stress oxydatif.

Lorsque les ROS s'accumulent dans la cellule, elles peuvent être neutralisées par des antioxydants. Il existe deux types d'antioxydants : naturels et synthétiques. Ces derniers ont été associés à de nombreux effets secondaires nocifs. Ainsi, la recherche de composés antioxydants naturels non toxiques s'est récemment intensifiée. Les plantes sont une source importante d'antioxydants naturels en raison des métabolites secondaires qu'elles contiennent. Ces plantes peuvent être criblées en évaluant leur activité antioxydante à l'aide de divers tests.

Étant donné la multiplicité des processus impliqués dans la neutralisation des radicaux libres, l'évaluation du potentiel antioxydant total par un seul test s'avère insuffisante [26]. En conséquence, les extraits de *S. hispidula* étudiés ici ont été soumis à trois tests distincts (DPPH, ABTS et FRAP) afin d'obtenir une mesure plus complète de leur capacité antioxydante globale.

Tableau 16. Activité antioxydante des extraits de *S. hispidula* par les tests : DPPH[•], ABTS⁺ et FRAP.

Sample	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	FRAP
	IC ₅₀ (µg/mL)		A _{0,5}
<i>S. hispidula</i> EE	5,67±0,07	5,95±0,82	10,77±0,12
<i>S. hispidula</i> AE	2,43±0,11	2,16±0,1	5,82±0,17
<i>S. hispidula</i> EH	557,79±38,46	641,37±30,6	757,35±33,13
Acide ascorbique	3,86±0,23	4,01±0,09	10,03±0,22

Les valeurs IC₅₀ et A_{0,50} correspondent respectivement à la concentration à 50 % d'inhibition et à la concentration à 0,5 absorbance. EE : extrait éthanolique ; EA : extrait aqueux, EH : extrait hexanique

L'extrait aqueux s'avèrent posséder les activités de piégeage de DPPH et d'ABTS les plus élevées par rapport aux extraits éthanolique et hexanique. Les IC₅₀ du DPPH et de l'ABTS de l'extrait aqueux étaient respectivement de 2,43 ± 0,11 et 2,16 ± 0,1 µg/mL et étaient plus de 1,5 fois supérieures à celles de l'acide ascorbique standard utilisé comme référence (IC₅₀ = 3,86 ± 0,23 et 4,01 ± 0,09 µg /mL respectivement dans les tests DPPH et ABTS). Bien que son activité soit inférieure à celle de l'extrait aqueux, l'extrait éthanolique a montré une très bonne activité antioxydante révélée par les tests DPPH et ABTS avec des valeurs IC₅₀ de 5,67±0,07 et 5,95±0,82 µg/mL respectivement. D'autre part, la même tendance a également été observée dans le test FRAP dans lequel l'extrait aqueux (A_{0,5} = 5,82 ± 0,17 µg/mL) a montré une meilleure activité que l'extrait éthanolique (A_{0,5} = 10,77 ± 0,12 µg/mL) et l'acide ascorbique standard (A_{0,5} = 10,03 ± 0,22 µg/mL). Dans les trois tests antioxydants utilisés, l'extrait hexanique a montré les activités les plus faibles (Tableau 16)

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits aqueux et éthanoliques des espèces de *S. hispidula* pourraient être liés à leur teneur élevée en acides hydroxycinnamiques, puisqu'il a été précédemment rapporté que ces substances présentaient de fortes activités antioxydantes [27-29].

Ces résultats suggèrent que les extraits de *S. hispidula* pourraient être utilisés comme antioxydants ou comme agents protecteurs contre les dommages causés par les RL lesquels

sont impliquées dans le développement de nombreuses maladies, notamment le cancer et les maladies cardiovasculaires.

La comparaison des résultats obtenus avec la littérature n'a pas été possible en raison de l'absence d'informations sur l'activité biologique de *S. hispidula* dans la littérature scientifique. Ce travail constitue donc la première contribution à l'étude du potentiel biologique de cette plante.

IV.2.5. Activité Anti-inflammatoire

La capacité de *S. hispidula* à contrecarrer l'inflammation a été déterminée par la méthode de piégeage du NO[•]. Les résultats sont exprimés en IC₅₀ et sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17. Activités de piégeage de NO (IC₅₀, µg/mL) des extraits de *S. hispidula*

	<i>S. hispidula</i> EM	<i>S. hispidula</i> EA	<i>S. hispidula</i> EH	Acide ascorbique
Activité de piégeage de NO (IC ₅₀ µg / mL)	40,87±3,00	162,78±0,6	186,19±4,45	144.580±7.03

(EM) : extrait méthanolique, (EC) : extrait chloroformique, (EH) : extrait hexanique

En effet, la production de monoxyde d'azote (NO[•]) joue un rôle crucial dans l'inflammation. Les cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles et les macrophages, produisent du NO[•] pour tuer les bactéries et les autres agents pathogènes. Cependant, le NO[•] peut également endommager les tissus sains, ce qui contribue aux symptômes de l'inflammation.

Comme le montre le tableau 17, l'extrait méthanolique de *S. hispidula* (IC₅₀=40,87±3,00µg/mL) a présenté une activité de piégeage du NO plus puissante que les extraits aqueux et hexanique. Cette activité s'avère aussi meilleure à celle de l'acide ascorbique (IC₅₀=144,580±7,03µg/mL) utilisé comme référence.

Jang et al. [30] ont précédemment rapporté que l'acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique exerce des effets anti-inflammatoires en supprimant l'activation des voies de signalisation du facteur nucléaire κB et de la MAPK *in vitro* et en réduisant l'œdème induit par le carraghénane *in*

vivo. Par conséquent, l'acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique pourrait donc constituer une alternative naturelle prometteuse aux anti-inflammatoires non stéroïdiens. Ainsi, la présence de l'acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique dans l'extrait éthanolique de *S. hispidula* pourrait en partie expliquer son excellente activité de piégeage du NO.

Cependant, des études *in vivo* sont indispensables pour confirmer les effets des antioxydants issus d'extraits de *S. hispidula* chez l'homme.

IV.2.6. Inhibition des enzymes

Les enzymes métaboliques clés liées à l'hyperglycémie sont couramment utilisées pour évaluer le potentiel antidiabétique des substances. Cette étude a évalué la capacité des extraits éthanol et aqueux de *S. hispidula* à inhiber les activités des enzymes α -glucosidase et α -amylase.

Tableau18. Tests de l'inhibition des enzymes α -glucosidase et α -amylase par les extraits de *S. hispidula*

Extrait	Inhibition de l'activité enzymatique	
	α -Glucosidase IC ₅₀ (μ g/mL)	α -Amylase (% inhibition)
<i>S. hispidula</i> EE	106,94 \pm 1,55	30,34 \pm 4,58
<i>S. hispidula</i> EA	23,52 \pm 6,33	4,86 \pm 0,004
Acarbose	405,77 \pm 34,83	/

En raison des concentrations très élevées requises pour produire des inhibitions plus fortes, il n'a pas été possible de déterminer la valeur IC₅₀. EE : extrait éthanolique ; EA : extrait aqueux.

Le diabète sucré est une maladie métabolique chronique non transmissible liéé à une hyperglycémie. En 2014, on estimait que 422 millions de sujets étaient atteints de diabète dans le monde [31]. Ce nombre est en constante augmentation, avec 642 millions de la population mondiale serait touchée par ce fleau en 2040 [32].

L'inhibition de l'activité des enzymes intestinales telles que l' α -amylase et l' α -glucosidase, qui limitent l'absorption du glucose dérivé de l'amidon, fait partie des stratégies actuelles qui se démarquent pour contrôler l'hyperglycémie [33].

De nombreux médicaments contre le diabète, tels que l'acarbose, le voglibose et le miglitol, agissent comme des antagonistes enzymatiques de l' α -glucosidase, réduisant ainsi l'absorption intestinale du glucose et la glycémie postprandiale. Cependant, ces inhibiteurs produisent des effets secondaires nocifs tels que des diarrhées et des douleurs abdominales [33]. Ainsi, la recherche de nouveaux composés dotés d'un potentiel antidiabétique s'est intensifiée ces dernières années. Les plantes médicinales peu toxiques et avec peu d'effets secondaires constituent des possibilités thérapeutiques importantes pour le traitement du diabète [34]. Les effets thérapeutiques de ces plantes ont été liés à la présence de composés phytochimiques tels que les alcaloïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les caroténoïdes et les β -glycanes. Ces constituants bioactifs procurent des effets thérapeutiques soit en combattant les ROS, soit en agissant comme hypoglycémiant.

L'analyse statistique réalisée sur les résultats obtenus dans la méthode de test d'inhibition de la α -glucosidase montre qu'il existe des différences significatives (avec $p < 0,05$) dans les activités inhibitrices de cette enzyme entre les extraits aqueux et éthanoliques de *S. hispidula*. L'extrait aqueux a présenté l'activité inhibitrice la plus importante de l'enzyme α -glucosidase, avec des valeurs IC_{50} de $23,52 \pm 6,33 \mu\text{g/mL}$ par rapport à l'extrait éthanolique montrant une $IC_{50} = 106,94 \pm 1,55 \mu\text{g/mL}$. Néanmoins, les deux extraits se sont révélés avoir une activité inhibitrice de la α -glucosidase plus puissante que celle du contrôle positif, l'acarbose ($IC_{50} = 405,77 \pm 34,83 \mu\text{g/mL}$). Cependant, en ce qui concerne l'activité inhibitrice de l' α -amylase, l'extrait aqueux ($4,86 \pm 0,004 \%$) s'avère moins puissant que l'extrait éthanolique ($30,34 \pm 4,58 \%$) dans l'inhibition de l'activité enzymatique de l' α -amylase testée à une concentration de l'extrait égale à 10 mg/mL (tableau 18).

L'extrait aqueux présente la concentration la plus élevée en acide rosmarinique (Tableau 18), ce qui suggère que ce composé pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'inhibition de l'enzyme α -glucosidase. En effet, des études ont démontré que l'acide rosmarinique isolé de l'extrait de feuilles de *Portulacaoleracea* exerce un puissant effet inhibiteur sur cette enzyme [35]. Les flavonoïdes glycosides, fortement présents dans les extraits éthanoliques et aqueux, peuvent également contribuer à leur forte activité inhibitrice de la α -glucosidase enregistrée ici.

Nos analyses révèlent que les extraits aqueux et éthanoliques présentaient une capacité d'inhibition de l'enzyme α -glucosidase supérieure à celle de l' α -amylase. Ce comportement est bénéfique car il est connu qu'une forte inhibition de l'enzyme α -glucosidase et une faible inhibition de l'enzyme α -amylase ont l'avantage d'avoir moins d'effets négatifs par rapport à l'inhibition excessive de l'enzyme α -amylase, car cela entraîne moins de fermentations bactériennes des glucides non digérés dans le côlon ce qui prévient l'inconfort abdominal [36-37].

Le double potentiel antioxydant et inhibiteur de l' α -glucosidase enregistré pour les deux extraits de *S. hispidula* suggère que cette plante pourrait être utilisée comme remède naturel pour le contrôle du diabète de type 2 ou comme une excellente source de nouvelles molécules pour le développement de médicaments antidiabétiques. En effet, plusieurs études expérimentales et cliniques ont montré que le diabète est associé à un niveau élevé de stress oxydatif [38-40]. Certains des processus impliqués dans le stress oxydatif chez les patients diabétiques incluent les radicaux libres d'oxygène créés par des réactions de glycosylation et des modifications du contenu des systèmes de défense antioxydants endogènes [41]. D'un autre côté, l'hyperglycémie pourrait également être la conséquence d'une augmentation significative du stress oxydatif.

Face à l'intrication du stress oxydatif et de l'hyperglycémie dans la pathologie diabétique, une approche thérapeutique ciblant simultanément ces deux désordres s'avère cruciale pour la prise en charge des patients diabétiques.

IV.2.7. Activité cytotoxique

Pour la première fois, cette étude a évalué l'activité cytotoxique des extraits éthanol et aqueux de *S. hispidula* contre les lignées cellulaires humaines de carcinome gastrique AGS et de carcinome du poumon A549.

Nos résultats démontrent que l'extrait éthanolique de *S. hispidula* n'exerce aucun effet notable sur la viabilité des cellules AGS ou A549. Néanmoins, une légère diminution de la viabilité cellulaire a été observée, avec une perte d'environ 11,81% pour les cellules AGS et de 13,61% pour les cellules A549.

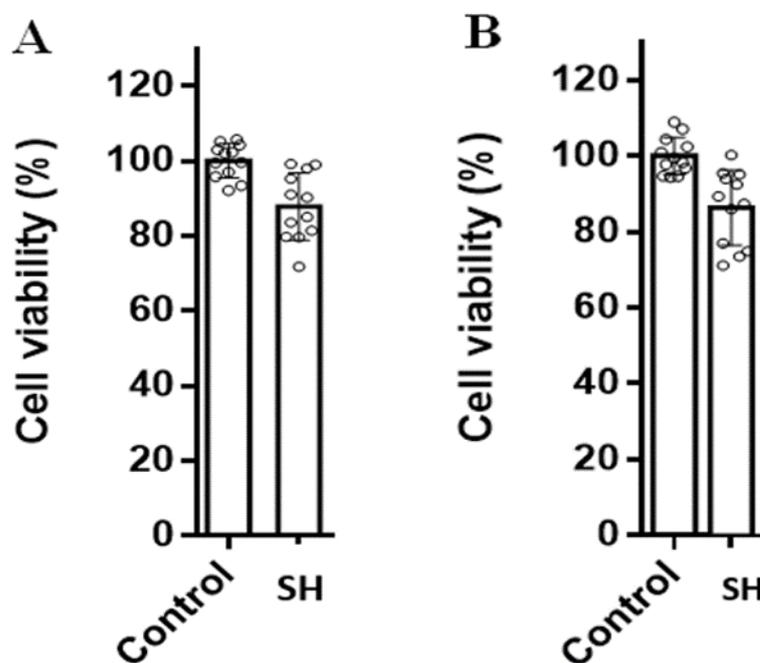


Fig. 24. Viabilité des cellules AGS et A549 exposées à l'extrait éthanolique de *S. hispidula* (250 µg/mL) ou au milieu (témoin).

Enfin, cette étude est préliminaire et ne représente pas une analyse exhaustive de l'effet cytotoxique de l'espèce *S. hispidula*. Des recherches approfondies s'avèrent nécessaires pour confirmer ces résultats sur d'autres lignées cellulaires et sur des modèles animaux.

Les résultats de l'activité cytotoxique à l'égard des lignés AGS A549 ne semblent pas en parfaite concordance avec les résultats de la littérature. Ainsi, des chercheurs ont précédemment rapporté que l'acide 4,5-*O*-dicaféoylquinique, identifié ici dans l'extrait de *S. hispidula*, a présenté un effet inhibiteur important sur les cellules cancéreuses de la prostate LNCaP et PC-3, et suggèrent que ce composé possède un potentiel thérapeutique sur un large éventail de cancers de la prostate [42].

Références bibliographiques

1. Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., and Kuhnert, N. (2003). Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem*, 51, 2900–2911.
2. Rechek, H., Haouat, A., Hamaidia, K., Allal, H., Boudiar, T., Pinto, D.C.G.A., Cardoso, S.M., Bensouici, C., Soltani, N., and Silva, A.M.S. (2021). Chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activities of an endemic species from southern Algeria: *Warionia saharae*. *Molecules*, 26, 5257.
3. Kerebba, N., Oyedeji, A. O., Byamukama, R., Kuria, K. S., and Oyedeji, O.O. (2022). UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS characterisation of phenolic compounds from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray and antioxidant activity. *Biological Chemistry and Chemical Biology*, 1–9.
4. Cao, J., Yin, C., Qin, Y., Cheng, Z., and Chen, D. (2014). Approach to the study of flavone di-C-glycosides by HPLC tandem ion trap MS and its application to characterisation of flavonoid composition in *Viola yedoensis*. *J. Mass Spectrometry*, 10.1002/jms.3413.
5. Oliva, E., Fanti, F., Palmieri, S., Viteritti, E., Eugelio, F., Pepe, A., Compagnone, D., and Sergi, M. (2022). Predictive multi experiment approach for the determination of conjugated phenolic compounds in vegetal matrices by means of LC-MS/MS. *Molecules*, 27(10), 3089.
6. Grati, W., Samet, S., Bouzyani, B., Ayachi, A., Treilhou, M., Téné, N., and Mezghani-Jarraya, R. (2022). HESI-MS/MS analysis of phenolic compounds from *Calendula aegyptiaca* fruits extracts and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules*, 27(7), 2314.
7. Bekkai, D., Ouled El Majdoub, Y., Bekkai, H., Cacciola, F., Miceli, N., Taviano, M. F., Cavo, E., Errabii, T., Vinci, R. L., Mondello, L., and El Kbiach, M. B. (2022). Determination of the phenolic profile by liquid chromatography, evaluation of antioxidant activity and toxicity of Moroccan *Erica multiflora*, *Erica scoparia*, and *Calluna vulgaris* (Ericaceae). *Molecules*, 27(13), 3979.

8. Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry*, 136(1), 1-8.
9. Li, F., Zhang, Y.B., Wei, X., Song, C.H., Qlao, M.Q., and Zhang, H.Y. (2016). Metabolic profiling of Shu-Yu capsule in rat serum based on metabolic fingerprinting analysis using HPLC-ESI-MSn. *Molecular medicine reports*, 13(5), 4191-4204.
10. Yao, H., Chen, B., Zhang, Y., Ou, H., Li, Y., Li, S., Shi, P., and Lin, X. (2017). Analysis of the total Biflavonoids extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and its in vitro anticancer effects. *Molecules*, 22(2), 325.
11. Ye, M., and Guo, D. (2004). Analysis of Homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* by HPLC-DAD-ESI-MSn. American Society for Mass Spectrometry. Published by Elsevier Inc, 1044-0305/05.
12. Abdelaziz, S., Al yousef, H.M., Al-Qahtani, A.S., Hassa, W.H.B., Fantouk, O.I., and El-Sayed, M.A. (2020). Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic potential of *Parkinsonia aculeata* L. Growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharm. J.*, 28, 1129-1137.
13. Gouveia, S.C., and Castilho, C.P. (2010). Characterisation of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by HPLC with on-line UV and MS detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 24: 1851–1868.
14. Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., and Yu, X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3), 1934578X2090355.
15. Kyaw, BM., Arora, S., and Lim, CS. (2012). Bactericidal antibiotic-phytochemical combinations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 938-945.
16. Kwiatkowski, P., Pruss, A., Wojciuk, B., Dołęgowska, B., Bonikowski, A.-W., Sienkiewicz, M., Mezyenska, M., and Łopusiewicz, Ł. (2019). The influence of essential oil compounds on antibacterial activity of mupirocin-susceptible and induced low-level mupirocin resistant MRSA strains. *Molecules*, 24(17), 3105.

17. Kwiatkowski, P., Łopusiewicz, Ł., Pruss, A., Kostek, M., Sienkiewicz, M., Bonikowski, R., Wojciechowska-Koszko, I., and Dołęgowska, B. (2020). Antibacterial activity of selected essential oil compounds alone and in combination with β -lactam antibiotics against MRSA strains. *Int J Mol Sci.* **21**(19):19.
18. Sebti, M., Zellagui, A., Lahouel, M., and Gherraf, N. (2013). Ethnopharmacology and Essential Oils Composition of *Calamintha hispidula* (Boissier and Reuter) Maire. Growing in Algeria. *TBAP Journal of Biologically Active Products from Nature* 3 339 – 344.
19. Sebti, M., Lahouel, M., and Zellagui, A. (2020). Phytochemical and pharmacological study of four aromatic plants growing in northeast of Algeria. *ALJEST6*, 3. 1516.
20. Kpadonou-Kpoviessi, B. G. H., Ladekan, E. Y., Kpoviessi, D. S. S., Gbaguidi, F., Yehouenou, B., Quetin-Leclercq, J., Figueredo, G., Moudachirou, M., and Accrombessi, G. C. (2012). Chemical variation of essential oil constituents of *Ocimum gratissimum* L. from Benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* Leach. *Chemistry & Biodiversity*, 9(1), 139-150.
21. Flamini, G., Smaili, T., Zellagui, A., Gherraf, N., and Cioni, P. L. (2013). Effect of growth stage on essential-oil yield and composition of *Daucus sahariensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3727-3733.
22. Ložienė, K., Vaičiulytė, V., and Maždžierienė, R. (2021). Influence of meteorological conditions on essential oil composition in geraniol-bearing *Thymus pulegioides* and *Thymus hybrid*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(1), 27.
23. Da Silva, E. A. J., da Silva, V. P., Alves, C. C. F., Alves, J. M., Souchie, E. L., and Barbosa, L. C. D. A. (2016). Harvest time on the content and chemical composition of essential oil from leaves of *guava*. *Ciência Rural*, 46(10), 1771-1776.
24. Mlala, S., Oyedeji, A.O., Gondwe, M., and Oyedeji, O.O. (2019). Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 2751.
25. Wu, P.P., Zhang, B.J., Cui, X.P., Yang, Y., Jiang, Z.Y., Zhou, Z.H., Zhong, Y.Y., Mai, Y.Y., Ouyang, Z., Chen, H.-S., Zheng, J., Zhao, S.-Q., and Zhang, K. (2019). Synthesis and biological evaluation of novel ursolic acid analogues as potential α -glucosidase inhibitors. *Sci. Rep.*7, 45578.

26. Zeghad, N., Ahmed, E., Belkhiri, A., Heyden, Y.V., and Demeyer, K. (2019). Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, 5 (4).
27. Li, X., Li, K., Xie, H., Xie, Y., Li, Y., Zhao, X., Jiang, X., and Chen, D. (2018). Antioxidant and cytoprotective effects of the di-O-caffeoylquinic acid family: The mechanism, structure-activity relationship, and conformational effect. *Molecules*, 23, 222.
28. Hamed, Y.S., Abdin, M., Chen, G., Akhtar, H.M.S., and Zeng, X. (2020). Effects of impregnate temperature on extraction of caffeoylquinic acid derivatives from *Moringa oleifera* leaves and evaluation of inhibitory activity digestive enzyme, antioxidant, antiproliferative and antibacterial activities of the extract. *Int. J. Food Sci*, 55, 3082-3090.
29. Trendafilova, A., Genova, V., Rangelov, M., Todorova, M., Ozek, G., Yur, S., Ozek, T., Aneva, I., Veleva, R., Moskova-Doumanova, V., Doumanov, J., and Topouzova, T. (2020). Caffeoylquinic Acids, Cytotoxic, Antioxidant, Acetylcholinesterase and Tyrosinase Enzyme Inhibitory Activities of Six *Inula* Species from Bulgaria. *Chemistry & Biodiversity*, 17(10), 1002.
30. Jang, G., Lee, S., Hong, J., Park, B., Kim, D., and Kim, C. (2021). Anti-Inflammatory Effect of 4,5-Dicaffeoylquinic Acid on RAW264.7 Cells and a Rat Model of Inflammation. *Nutrients*, 13, 3537.
31. World Health Organization (WHO). (2020). Diabetes [Fact sheet]. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
32. Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., Cavan, D., Shaw, J. E., and Makarov, L. E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128, 40-50.
33. Van de Laar, F. A. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4(6), 1189-1195.
34. Gupta, P. D., and De, A. (2010). Diabetes Mellitus and its herbal treatment. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biosciences*, 3(3), 706-721.

35. Chen, W.-C., Wang, S.-W., Li, C.-W., Lin, H.-R., Yang, C.-S., Chu, Y.-C., Lee, T.-H., and Chen, J.-J. (2022). Comparison of various solvent extracts and major bioactive components from *Portulaca oleracea* for antioxidant, anti-tyrosinase, and anti- α -glucosidase activities. *Antioxidants*, 11(2), 398.
36. Kwon, Y-I., Apostolidis, E., and Shetty, K. (2006). Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2-diabetes. *J Food Biochem*, 32(1):15–31.
37. Kim, K-T., Rioux, L-E., and Turgeon, SL. (2014). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98:27–33.
38. Rahimi-Madiseh, M., Malekpour-Tehrani, A., Bahmani, M., and Rafieian-Kopaei, M. (2016). The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 825-831.
39. Pieme, C. A., Tatangmo, J. A., Simo, G., Nya, P. C. B., Moor, V. J. A. M., Moukette, B. M., Nzufu, F. T., Nono, B. L. N., and Sobngwi, E. (2017). Relationship between hyperglycemia, antioxidant capacity and some enzymatic and non-enzymatic antioxidants in African patients with type 2 diabetes. *BMC Research Notes*, 10, 141.
40. Iacobini, C., Vitale, M., Pesce, C., Pugliese, G., and Menini, S. (2021). Diabetic Complications and Oxidative Stress: A 20-Year Voyage Back in Time and Back to the Future. *Antioxidants*, 10, 727.
41. Ramakrishna, V., Jaiikhani, R. (2007). Evaluation of oxidative stress in insulin dependent diabe mellitus (IDDM) patients. *DiagnPathol*. 2(22): 1-6.
42. Lodise, O., Patil, K., Karshenboym, I., Prombo, S., Chukwueke, C., and Pai, S. B. (2019). Inhibition of prostate cancer cells by 4,5-dicaffeoylquinic acid through cell cycle arrest. *Prostate Cancer*, 23, 4520645.

Conclusion & Perspectives

V. Conclusion & Perspectives

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la composition chimique et les activités biologiques des espèces *Cistus salviifolius* et *Satureja hispidula* originaires d'Algérie.

L'extraction des composés de *C. Salviifolius* a été effectuée par macération des parties aériennes dans l'éther de pétrole, le chloroforme et le méthanol. Les extraits de *S. hispidula*, une espèce endémique d'Algérie qui n'a pas fait l'objet d'aucune étude jusqu'à maintenant, ont été préparés par macération des feuilles dans l'éthanol et dans l'hexane. Une décoction à partir des feuilles de cette espèce a été également préparée. L'extraction des huiles essentielles des feuilles des deux espèces a été réalisée par hydrodistillation.

Les extraits polaires obtenus des deux espèces ont été analysés par UHPLC-DAD-ESI/MS. Les extraits apolaires ainsi que les huiles essentielles ont été analysés par GC-MS. De plus, les activités antioxydante, anti-inflammatoire, enzymatique (α -glucosidase, α -amylase et acétylcholinestérase), antimicrobienne et cytotoxique de ces extraits ont été étudiées. Une étude *in silico* a été réalisée dans le but d'identifier les interactions spécifiques entre l' α -glucosidase et les principaux composés des extraits polaires des deux espèces.

L'analyse UHPLC-DAD-ESI/MS de l'extrait méthanolique de l'espèce *C. salviifolius* a indiqué que les flavonoïdes étaient les principaux composés identifiés. La chromatographie en phase gazeuse couplée à l'analyse par spectrométrie de masse a permis l'identification de plusieurs composés lipophiles dans les extraits éther de pétrole et chloroforme. Les terpènes étaient les plus dominants, le cycloarténol étant le composé principal. Cette classe de composés était également répandue dans l'huile essentielle de cette espèce, en particulier les diterpènes oxygénés et non oxygénés. L'extrait méthanolique était le plus efficace et présentait de puissantes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et d'inhibition de l' α -glucosidase. L'extrait méthanolique a également présenté une activité cytotoxique marginale contre les lignées cellulaires AGS et A549. Les extraits apolaires de *C. salviifolius* ont également montré une très forte activité antibactérienne contre les souches pathogènes testées. L'étude *in silico* a permis de cribler les interactions entre les deux composés majoritaires de l'extrait méthanolique et l'enzyme α -glucosidase.

L'analyse UHPLC-DAD-ESI/MS de l'espèce *S. hispidula* a permis l'identification de 28 et 20 composés respectivement dans les extraits éthanol et aqueux ; parmi eux, l'acide 5-O-caféoylquinique était le plus abondant dans les deux extraits. La GC-MS a permis l'identification, dans l'extrait hexane de cette espèce, de plusieurs composés lipophiles répartis en 5 familles à savoir les acides gras, les alcanes, les acides carboxyliques et les

esters, les alcools en plus des terpènes et les stéroïdes. Les terpènes étaient très répandus dans l'huile essentielle de cette espèce. Les résultats des analyses biologiques indiquent que l'espèce *S. hispidula*, outre son pouvoir antioxydant élevé, est également potentiellement utile pour inhiber l'enzyme α -glucosidase. Cependant, son activité cytotoxique à l'égard des lignées cellulaires AGS et A549 a été marginale. Dans les tests antioxydants et le test d'inhibition de l' α -glucosidase, l'extrait aqueux a présenté les résultats les plus prometteurs, nettement meilleurs que les standards utilisés comme contrôles positifs.

L'étude *in silico* a permis de cribler les interactions entre les composés majeurs des extraits polaires et l'enzyme α -glucosidase. Les résultats actuels suggèrent que les espèces de *C. salviifolius* et *S. hispidula* pourraient être considérées comme des sources potentielles de composés bioactifs naturels pour la confection des aliments fonctionnels et les produits pharmaceutiques.

Nos résultats suggèrent que *C. salviifolius* et *S. hispidula* sont de nouvelles sources de composés bioactifs aux propriétés prometteuses. Cependant, Il serait intéressant de mener davantage de recherches sur ces espèces végétales afin d'isoler et d'élucider la structure des composés qui sont à l'origine des activités biologiques observées dans cette étude. Des études supplémentaires sur l'innocuité de ces espèces s'avèrent aussi d'une importance particulière. Ceci devrait être évalué par des études de toxicité à court et à long terme chez des modèles animaux.

Production scientifique

1. Article publié

Haouat, A.; Rechek, H.; Pinto, D.C.G.A.; Cardoso, S.M.; Válega, M.S.G.A.; Boudjerda, A.; Silva, A.M.S.; Mekkiou, R. Metabolite Profiling, Antioxidant and Key Enzymes Linked to Hyperglycemia Inhibitory Activities of *S. hispidula*: An Underexplored Species from Algeria. *Molecules* 2022, 27, 8657. <https://doi.org/10.3390/molecules2724865>

Résumé

La présente étude a pour objectif l'étude de la composition chimique de certains extraits polaires et apolaires ainsi que les huiles essentielles des espèces *Cistus salviifolius* et *Satureja hispidula* originaires d'Algérie. L'extraction des composés polaires de *C. salviifolius* a été effectuée par macération des parties aériennes dans le méthanol alors que les extraits apolaires ont été extraits par macération dans l'éthher de pétrole et le chloroforme. Les extraits polaires de *S. hispidula* ont été préparés par macération des feuilles dans l'éthanol et par décoction. L'hexane a été utilisé pour l'extraction des composés apolaires. L'extraction des huiles essentielles des feuilles des deux espèces a été réalisée par hydrodistillation. L'analyse de la composition chimique des extraits obtenus a été effectuée en utilisant les techniques UHPLC-DAD-ESI/MS et GC-MS. De plus, les activités antioxydantes, anti-inflammatoires, enzymatiques (α -glucosidase, α -amylase et acétylcholinestérase), antimicrobiennes et cytotoxiques de ces extraits ont été étudiées. Une étude *in silico* a été réalisée pour examiner plus en détail les mécanismes d'interaction entre l' α -glucosidase et les principaux composés des extraits polaires des deux espèces.

L'analyse UHPLC-DAD-ESI/MS a indiqué que les flavonoïdes étaient les principaux composés identifiés dans l'espèce *C. salviifolius*, tandis que les acides caféoylquiniques étaient les plus abondants dans les extraits polaires de l'espèce *S. hispidula*.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis l'identification, dans les deux espèces, de plusieurs composés lipophiles répartis en 5 familles à savoir les acides gras, les alcanes, les acides carboxyliques et les esters, les alcools en plus des terpènes et les stéroïdes. Les terpènes étaient très répandus dans les huiles essentielles des deux espèces, en particulier les diterpènes oxygénés et non oxygénés fortement présents dans l'huile essentielle de *C. salviifolius*.

Les résultats des analyses biologiques indiquent que les espèces *S. hispidula* et *C. salviifolius*, outre leur pouvoir antioxydant élevé, sont également potentiellement utiles pour inhiber l'enzyme α -glucosidase. Les extraits apolaires de *C. salviifolius* ont montré une très forte activité antibactérienne contre les souches pathogènes testées. Cependant, les deux espèces ont présenté un effet anti-inflammatoire modéré et une activité cytotoxique marginale contre les lignées cellulaires AGS et A549.

L'étude *in silico* a permis de cribler les interactions entre les composés majeurs de l'extrait polaire et l'enzyme α -glucosidase. Les résultats actuels suggèrent que les espèces *C. salviifolius* et *S. hispidula* pourraient être considérées comme des sources potentielles de composés bioactifs naturels pouvant être utiles pour la confection des aliments fonctionnels et des produits pharmaceutiques.

Mots clés: *Cistus salviifolius*, *Satureja hispidula*, UHPLC-DAD-ESI/MS, GC-MS, Activité antioxydante, Activité anti-inflammatoire, Activité antimicrobienne, Activité anticancéreuse, Inhibition enzymatique, Docking moléculaire.

Abstract

The present work aims to study the chemical composition of certain polar and non-polar extracts as well as the essential oils from *Cistus salviifolius* and *S. hispidula* species originating from Algeria. The extraction of polar compounds from *C. salviifolius* was carried out by maceration of the aerial parts in methanol while the apolar extracts were extracted by maceration in petroleum ether and chloroform. The polar extracts of *S. hispidula* were prepared by maceration of the leaves in ethanol and by decoction. Hexane was used for the extraction of nonpolar compounds. The extraction of essential oils from the leaves of both species was carried out by hydrodistillation. The analysis of the chemical composition of all extracts was carried out using UHPLC-DAD-ESI/MS and GC-MS techniques. In addition, the antioxidant, anti-inflammatory, enzymatic (α -glucosidase, α -amylase and acetylcholinesterase), antimicrobial and cytotoxic activities of these extracts were studied. An *in silico* study was carried out to further examine the interaction mechanisms between α -glucosidase and the main compounds of the polar extracts of the two species.

UHPLC-DAD-ESI/MS analysis indicated that flavonoids were the main compounds identified in *C. salviifolius*, while caffeoylquinic acids were the most abundant in the polar extracts of *S. hispidula*.

Gas chromatography coupled with mass spectrometry analysis allowed the identification, in the apolar extracts of the two species, of several lipophilic compounds divided into 5 families, namely fatty acids, alkanes, carboxylic acids and esters, alcohols in addition to terpenes and steroids. Terpenes were very prevalent in the essential oils of both species, especially oxygenated and non-oxygenated diterpenes strongly present in *C. salviifolius* essential oil.

The results of biological analyzes indicate that both species, in addition to their high antioxidant capacity, are also potentially useful for inhibiting the enzyme α -glucosidase. The non-polar extracts of *C. salviifolius* showed very strong antibacterial activity against the pathogenic strains tested. However, both species exhibited moderate anti-inflammatory effect and marginal cytotoxic activity against AGS and A549 cell lines.

The *in silico* study made it possible to screen the interactions between the major polar compounds of the extract and the α -glucosidase enzyme. The current results suggest that *C. salviifolius* and *S. hispidula* species could be considered as a potential sources of natural bioactive compounds for functional foods and pharmaceuticals.

Keywords: *Cistus salviifolius*, *Satureja hispidula*, UHPLC-DAD-ESI/MS, GC-MS, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, Antimicrobial activity, Anticancer activity, Enzymatic inhibition, Molecular docking

الملخص

تهدف الدراسة الحالية إلى دراسة التركيب الكيميائي لبعض المستخلصات القطبية وغير القطبية وكذلك الزيوت العطرية لنوعي *C. salviifolius* و *S. hispidula* المنشأ من الجزائر. تم استخلاص المركبات القطبية من *C. salviifolius* عن طريق نقع الأجزاء الهوائية في الميثانول بينما تم استخلاص المستخلصات القطبية عن طريق النقع في الإيثر البترولي والكلوروفورم. تم تحضير المستخلصات القطبية لـ *S. hispidula* عن طريق نقع الأوراق في الإيثانول وبواسطة مغلي. تم استخدام الهكسان لاستخلاص المركبات غير القطبية. تم استخلاص الزيوت العطرية من أوراق كلا النوعين عن طريق التقطير المائي. تم إجراء تحليل التركيب الكيميائي للمستخلصات التي تم الحصول عليها باستخدام تقنيات UHPLC-DAD-ESI/MS و GC-MS. بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة التأثيرات المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات والإنزيمية (α -glucosidase) و α -amylase و acetylcholinesterase والمضادة للميكروبات والسامة الخلوية لهذه المستخلصات. تم إجراء دراسة في السيليكو لمزيد من فحص آليات التفاعل بين α -glucosidase والمركبين الرئيسيين في المستخلصات القطبية للنوعين. أشار تحليل UHPLC-DAD-ESI/MS إلى أن مركبات الفلافونويد هي المركبات الرئيسية التي تم تحديدها في *C. salviifolius*، في حين كانت أحماض الكافويلكينيك هي الأكثر وفرة في المستخلصات القطبية لـ *S. hispidula*.

كروماتوغرافيا الغاز مع تحليل مطياف الكتلة أتاحت التعرف في المستخلصات القطبية للنوعين على عدة مركبات محبة للدهون مقسمة إلى 5 عائلات، وهي الأحماض الدهنية والألكانات والأحماض الكربوكسيلية والإسترات والكحولات بالإضافة إلى التربينات والستيرويدات. كانت التربينات منتشرة جداً في الزيوت العطرية لكلا النوعين، وخاصة ثنائي التربينات المؤكسجة وغير المؤكسجة الموجودة بقوة في زيت *C. salviifolius* الأساسي.

تشير نتائج التحاليل البيولوجية إلى أن النوعين *S. hispidula* و *C. Salviifolius*، بالإضافة إلى قدرتهما العالية كمضادات للأكسدة، من المحتمل أيضاً أن يكونا مفيدتين في تثبيط إنزيم α -glucosidase. أظهرت المستخلصات غير القطبية لنبات *C. salviifolius* نشاطاً مضاداً للجراثيم قوياً جداً ضد السلالات المسببة للأمراض التي تم اختبارها. ومع ذلك، أظهر كلا النوعين تأثيراً معتدلاً مضاداً للالتهابات ونشاطاً هامشياً ساماً للخلايا ضد خطوط الخلايا AGS و A549.

أتاحت دراسة السيليكو فحص التفاعلات بين المركبات القطبية الرئيسية للمستخلص وإنزيم α -glucosidase. تشير النتائج الحالية إلى أنه يمكن اعتبار أنواع *C. salviifolius* مصدرًا محتملاً للمركبات الطبيعية النشطة بيولوجياً للأغذية الوظيفية والمستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: *C. salviifolius* ، *S. hispidula* ، LC-MS ، GC-MS ، أنشطة مضادات الأكسدة، نشاط مضاد للالتهابات، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد للسرطان، تثبيط إنزيمي، الالتحام الجزي

