



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de biologie
Laboratoire de Produits Naturels

THÈSE

Présentée par M^{me} **ALLAM Hanane Ep Elouchdi**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD

Option : Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques

**Étude phytochimique et activités biologiques de deux plantes
médicinales sahariennes *Artemisia judaica* L subsp. *sahariensis* et
Thymelaea microphylla Coss. & Dur.**

Soutenue le : 06/07/2022

Devant le jury :

Présidente	M ^{me} ATIK-BEKKARA Fawzia	Professeur à l'Université de Tlemcen
Directrice de thèse	M ^{me} BENNACEUR Malika	Professeur à l'Université Oran1
Examineur	M ^{me} BEKHECHI Chahrazed	Professeur à l'Université de Tlemcen
Examineur	M ^r AOUES Abdelkader	Professeur à l'université Oran1
Examineur	M ^{me} HADDOUCHI Farah	MCA à l'Université de Tlemcen
Examineur	M ^r BENAMAR Houari	MCA à l'université d'Oran1

Année universitaire : 2021-2022

La connaissance s'acquiert par l'expérience,
tout le reste n'est que de l'information.

Albert Einstein.

Avant toute chose, je tiens à rendre hommage à la mémoire de mon défunt père Allahyarahmou, pour son encouragement, son amour et son soutien qui m'ont poussée toujours à être positive. Merci pour ton aide et tes précieux conseils papa. J'ai toujours souhaité que tu sois présent pour partager cette joie avec moi, je t'aime papa.

Dédicace

Je dédie cette thèse à :

Mes parents

Mon mari BADREDDINE

Mes enfants WASSIM et ISRAA

Mon frère et mes sœurs

Remerciements

Je commencerai tout d'abord par remercier « Dieu » Le Tout Puissant, qui m'a accordé la santé, la force et les moyens pour mener à terme ce travail.

Ma profonde gratitude va à Madame BENNACEUR Malika, Professeure au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Oran 1, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, tout en me faisant bénéficier de son expérience, de ses compétences, de sa sagesse, de ses encouragements et surtout de son temps. Je tiens aussi à la remercier pour ses multiples conseils et toutes les heures qu'elle a consacrées en encadrant cette recherche. Merci de m'avoir aussi confié des responsabilités plus collectives, me laisser conduire ce travail librement et surtout pour son indulgence lorsque je m'égarais un peu. Merci tout particulièrement pour le soutien humain dans la dernière ligne droite de la rédaction qui a été particulièrement ardue.

Je tiens à remercier Monsieur BENAMAR Houari, Maître de conférences à l'université Oran1, pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour son effort constant à diriger ce travail avec beaucoup d'enthousiasme. Sa rigueur sur le plan scientifique est un exemple pour moi. J'ai eu la chance de bénéficier de ses compétences qui m'ont permis d'apprendre beaucoup sur le plan méthodologique. J'ai apprécié son soutien scientifique, pédagogique et ses conseils avisés qui m'ont permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions.

De plus, je tiens, à exprimer ma sincère reconnaissance à Madame ATIK-BEKKARA Fawzia, Professeure au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour son dévouement et pour le grand intérêt qu'elle porte à tous ses étudiants. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect pour sa rigueur scientifique ainsi que pour ses qualités humaines et son soutien moral. Je la remercie également de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

J'adresse aussi mes remerciements les plus sincères à Madame BEKHECHI Chahrazed, Professeure au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail.

Mes chaleureux remerciements vont à :

Monsieur AOUES Abdelkader Professeur au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Oran 1, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Madame CHAUCHE HADDOUCHI Farah Maître de Conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus haute considération.

Par ailleurs, je remercie le Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides (LRZA) qui a pris en charge ma mission à Tamanrasset afin de réaliser une enquête auprès des Touaregs sur l'utilisation des plantes de la région. J'ai pu aussi bénéficier des connaissances de Mme Sahki, chercheuse à l'Institut National de Recherche Forestière (INRF) afin de faire un choix sur la plante à étudier, qu'elle en soit ici chaleureusement remerciée.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien de ma famille qui a toujours été là pour moi. C'est pour cela que je leur dédie ce travail. Mes pensées vont à ma mère pour son amour, elle n'a jamais douté de moi, elle m'a encouragée tout au long de mes études et apporté son soutien pendant cette pénible épreuve que représente cette thèse de Doctorat et m'a donné la force d'aller jusqu'au bout de mes ambitions.

J'exprime également mes remerciements à mon mari pour son soutien, sa patience et son encouragement ainsi que mes sœurs, mon frère, mes beaux-parents qui m'ont encouragée à finaliser ce projet par leur soutien et leurs encouragements durant toutes ces années. Et je ne saurais oublier mes enfants : mon prince WASSIM et ma princesse ISRAA pour leur amour qu'ils m'apportent chaque jour.

Un remerciement très particulier à Monsieur CHAUCHE Tarik Maître de Conférences au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen pour sa gentillesse, sa sympathie, son aide précieuse ainsi que ces encouragements. Je ne pourrais manquer cette occasion pour lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous mes amis et collègues surtout ceux qui m'ont apporté un soutien moral, une amitié inoubliable et précieuse et un dévouement qui fut particulièrement indispensable.

Aussi, je voudrais exprimer ma reconnaissance à tous les Professeurs et Maîtres de Conférences du laboratoire qui m'ont toujours aidée à chaque fois que je les ai sollicités et en particulier Madame IGHILHARIZ Zohra, Professeure à l'Université Oran1.

Je tiens également à remercier vivement les membres de l'équipe du laboratoire de Biochimie Végétale pour tous les services rendus, les conseils et pour toutes les interactions scientifiques et autres, que nous avons pu avoir ensemble. Grâce à vous tous cette aventure a été riche et m'a beaucoup apportée.

Dans ce travail, deux plantes ont été ciblées pour leurs utilisations en médecine traditionnelle. Il s'agit de *Thymeleae microphylla* (Thymelacées) et *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* L. (Astéracées). Les objectifs poursuivis sont l'identification de certains composés bioactifs et l'évaluation des activités biologiques. Ainsi, il a été procédé à l'extraction de certains métabolites secondaires, à la caractérisation de molécules bioactives à partir des différents extraits et à l'étude de leurs activités antioxydantes, anti-enzymatique et antimicrobienne. L'analyse HPLC-UV-DAD des extraits des deux espèces a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. Pour la plante *T. microphylla*, treize composés phénoliques sont identifiés dont le kaempférol 3-O-rutinoside (4,849 mg /g-1 ES) et l'acide trans-3-hydroxycinnamique (4,744 mg/g-1 ES) sont les composés principaux. Pour *Artemisia judaica*, onze composés sont identifiés avec le kaempférol (20,9 mg / g-1 ES), le resvératrol 3 -O-glucoside (5,045 mg / g-1 ES), en tant que composés principaux. Les extraits MeOH des deux espèces présentent les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes les plus élevées. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants : capacité antioxydante totale (CAT), piégeage du radical libre DPPH, l'activité inhibitrice du radical ABTS+, le pouvoir réducteur, et le blanchiment du β -carotène. Les extraits MeOH de *T. microphylla* et *A. judaica* présentent le meilleur pouvoir réducteur. En outre, le blanchiment de la β -carotène de l'extrait MeOH de *T. microphylla* est plus actif que les autres extraits. Concernant *A. judaica*, la capacité d'inhibition la plus importante est mesurée dans l'extrait AcOEt. L'activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase est absente pour tous les extraits de la partie aérienne des deux plantes testées. L'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques et celle des microdilutions en milieu liquide. Tous les extraits de *T. microphylla* présentent des zones d'inhibition contre *S. aureus* avec une activité élevée pour l'extrait Aq ($36,00 \pm 0,58$ mm). Pour *A. Judaica*, l'activité la plus importante a été observée contre *P. vulgaris* pour l'extrait Aq ($22,33 \pm 0,67$ mm). L'ensemble des résultats obtenus indiquent que les extraits de ces espèces peuvent constituer une source potentielle d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens.

Mots clés : *Thymeleae microphylla*, *Artemisia judaica* subsp *sahariensis*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobienne, acétylcholinestérase.

In this work, two plants were targeted for their uses in traditional medicine : They are *Thymeleae microphylla* (Thymelaceae) and *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* L. (Asteraceae). The objective of the present study was the identification of certain bioactive compounds and the evaluation of biological activities. Thus, it was carried out the extraction of certain secondary metabolites, the characterization of bioactive molecules from the various extracts and the study of their antioxidant, anti-enzymatic and antimicrobial activities.

The HPLC-UV-DAD analysis of the extracts of two species allowed to characterize the main phenolic compounds. For the *T. microphylla* plant, thirteen phenolic compounds are identified of which kaempferol 3-O-rutinoside (4.849 mg/g DE) and trans-3-hydroxycinnamic acid (4.744 mg/g DE) are the main compounds. For *Artemisia judaica* plant, eleven compounds are identified with kaempferol (20.9 mg/g DE), resveratrol 3-O-glucoside (5045 m/g DE), as the major compounds. The MeOH extracts of both species show the highest content of phenolic compounds and flavonoids. Antioxidant activities were determined *in vitro*, through the following assessment assays: total antioxidant capacity (TAC), DPPH free radical scavenging, ABTS+, reducing power activity (RPA), radical inhibitor activity, and β -carotene bleaching. The MeOH extracts of *T. microphylla* and *A. judaica* show the best reducing power. In addition, the β -carotene bleaching of *T. microphylla* MeOH extract is more active than other extracts. Concerning *A. Judaica* plant, the greatest inhibition capacity is measured in the AcOEt extract. The inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase is absent for all the extracts of the aerial part of the two plants tested. The antimicrobial activity was carried out by disc diffusion method and the liquid microdilution method. All *T.microphylla* extracts have inhibition zones against *S. aureus* with high activity for the Aq extract (36.00 ± 0.58 mm). For *A. Judaica* plant, the greatest activity was observed against *P. vulgaris* for the Aq extract (22.33 ± 0.67 mm). The results obtained indicate that the extracts from these species can be a potential source of natural antioxidants and antimicrobial agents.

Key words: *Thymeleae microphylla*, *Artemisia judaica* subsp *sahariensis*, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, acetylcholinesterase.

يستهدف هذا العمل نبتتين لأهمية استخدامهما في الطب التقليدي وهما :

Thymeleae microphylla (Thymelaceae) و

Artemisia judaica subsp *sahariensis* L. (Asteraceae)

حيث أن الأهداف المنشودة تتمثل في تحديد بعض المركبات النشطة بيولوجيا وتقييم الأنشطة البيولوجية، تضمن ذلك استخراج بعض المستخلصات الثانوية. وتوصيف الجزيئات النشطة بيولوجيا من المستخلصات المختلفة ودراسة أنشطتها المضادة للأكسدة والأنزيمية ومضادات الميكروبات.

تم تحليل مستخلصات لكلا النبتتين بواسطة HPLC-UV-DAD، مما سمح بتحديد مركبات الفلافونويد و الأحماض الفينولية الرئيسية.

بالنسبة لنبات *Thymeleae microphylla* تم تحديد ثلاثة عشر مركبًا فينوليًا منها

kaempferol 3-O-rutinoside 4,849 ملغ/غ وحمض trans-3-hydroxycinnamic 4,744 ملغ/غ من المادة الجافة كمكونات رئيسية.

بالنسبة لنبات *Artemisia judaica* تم تحديد أحد عشر مركبًا kaempferol 20.9 ملغ/غ، 3-O-glucoside resveratrol 5.045 ملغ/غ من المادة الجافة، كمكونات رئيسية.

تحتوي مستخلصات MeOH من كلا النوعين على أعلى محتوى من المركبات الفينولية و الفلافونويد.

تم تحديد الأنشطة المضادة للأكسدة في المختبر من خلال إختبارات التقييم التالية :

عن طريق فوسفوموليبيدينوم، إختبار إرجاع الجذر الحر DPPH، إختبار ABTS، إختبار قدرة الإختزال و تنشيط بير و كسيدات الدهون المتمثل في تبييض B Caroténe.

تمتلك مستخلصات MeOH لكلا النوعين أفضل قوة إختزالية.

تبييض B Caroténe لمستخلص MeOH لنبات *Thymeleae microphylla* أكثر نشاطا من المستخلصات الأخرى.

بالنسبة لنبات *Artemisia judaica*، فمستخلص الـ AcOEt كان أكثر فعالية لتبييض B Caroténe.

لا يوجد نشاط مثبط لأنزيم AChE لجميع مستخلصات الجزء الهوائي لكلا النبتتين.

تم إجراء النشاط المضاد للميكروبات من خلال طريقة الانتشار على الأقراص وتلك الخاصة بالتخفيفات الدقيقة في الوسط السائل .

تظهر جمع مستخلصات Aq لنبات *Thymeleae microphylla* أعلى نشاط فعال مضاد للبكتيريا *S.aureus* (36.00 ± مم).

بالنسبة لنبات *Artemisia judaica*، مستخلص Aq كان أكثر فعالية ضد *P.vulgaris* (22.33 ± 0.67 مم).

تشير جميع النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن مستخلصات هذه الأنواع يمكن أن تشكل مصدرًا محتملاً لمضادات الأكسدة الطبيعية والعوامل المضادة للميكروبات .

الكلمات المفتاحية:

Thymeleae microphylla ، *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* ، المركبات الفينولية ، نشاط

مضادات الأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات ، أستيل كولينستريز.

Dédicace	
Remerciements	
Résumés	
Sommaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	01
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	05
1. Présentation des plantes médicinales sélectionnées	06
1.1. Caractéristiques générales de la famille des Thymelaeacées	06
1.1.1. Genres et espèces de la famille Thymelaeacées	06
1.1.2. Propriétés chimiques et usages thérapeutiques	07
1.1.3. <i>Thymelaea microphylla</i> Coss. et Dur.	09
1.1.3.1. Description morphologique	09
1.1.3.2. Systématique de la plante <i>Thymelaea microphylla</i> Coss.et Dur.	10
1.1.3.3. Répartition géographique	10
1.1.3.4. Usages thérapeutiques	11
1.1.3.5. Composition chimique	11
1.2. Caractéristiques générales de la famille des Astéracées	12
1.2.1. Genre <i>Artemisia</i> et ses espèces	12
1.2.2. Propriétés chimiques et usages thérapeutiques (travaux antérieurs)	13
1.2.3. <i>Artemisia judaïca</i> L.	15
1.2.3.1. Description morphologique	15
1.2.3.2. Systématique <i>Artemisia judaïca</i> L.subsp. <i>sahariensis</i>	16
1.2.3.3. Répartition géographique	17
1.2.3.4. Propriétés et usages thérapeutiques (travaux antérieurs)	17
1.2.3.5. Composition chimique	18
2. Stress oxydant, radicaux libres, antioxydants et métabolites secondaires	19
2.1. Stress oxydant	19
2.1.1. Origine du stress	19
2.1.2. Les conséquences du stress oxydant	19
2.1.3. Les maladies liées au stress oxydant	20
2.2. Les radicaux libres	20
2.2.1. Principaux radicaux libres et leurs origines	21
2.2.2. Rôles des radicaux libres	22

2.3. Antioxydants	22
2.3.1. Différentes localisations cellulaires des antioxydants	22
2.3.2. Modes d'action des antioxydants	22
2.3.3. Source des antioxydants	23
2.3.1.1. Antioxydants endogènes	23
2.3.1.2. Antioxydants exogènes	23
2.4. Métabolites secondaires	25
2.4.1. Les composés phénoliques	25
2.4.2. Les terpènes	26
2.4.3. Les alcaloïdes	26
3. Évaluation des activités biologiques des extraits de plantes	27
3.1. Activités antioxydantes	27
3.1.1. Estimation de l'activité antioxydante totale	27
3.1.2. Activité antiradicalaire contre le DPPH	27
3.1.3. Activité antiradicalaire contre l'ABTS+	28
3.1.4. Capacité réductrice du fer	28
3.1.5. Capacité d'inhiber le blanchiment de la β-carotène	28
3.2. Activité enzymatique	28
3.3. Activité antimicrobienne	29
3.3.1. Méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne	29
3.3.2. Mécanismes d'action et de résistance des agents antimicrobiens	29
<i>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</i>	31
1. Récolte du matériel végétal et extraction	32
1.1. Origine géographique et période de récolte	32
1.2. Extractions	34
1.2.1. Préparation des extraits bruts	34
1.2.2. Extraction par des solvants de polarité croissante	34
1.2.3. Extraction sous reflux par l'eau distillée	35
2. Screening phytochimique des extraits	36
2.1. Mise en évidence des métabolites secondaires en tubes à essai	36
2.2. Analyse chromatographique des métabolites secondaires	37
2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	37
2.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV visible à barrettes de diodes (HPLC-DAD-UV)	40

3. Dosage des métabolites secondaires par spectrophotométrie (UV-visible)	41
3.1. Dosage des polyphénols totaux	41
3.2. Dosage des flavonoïdes totaux	42
3.3. Dosage des tanins condensés	42
4. Évaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques des différents extraits des deux plantes par plusieurs tests	43
4.1. Évaluation du potentiel antioxydant des extraits	43
4.1.1. Estimation de l'activité antioxydante totale	43
4.1.2. Test de l'activité antioxydante au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) par dosage spectrophotométrique	43
4.1.3. Mesure de l'activité inhibitrice du radical ABTS+	44
4.1.4. Mesure du pouvoir réducteur du fer	45
4.1.5. Inhibition du blanchiment du β-carotène/ acide linoléique	46
4.2. Activité inhibitrice de l'AChE : méthode bioautographique au Fast Blue B	47
4.3.Évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes	47
4.3.1. Propriétés et mise en culture des germes testés	48
4.3.2. Méthode de diffusion sur disque	49
4.3.3. Méthode de micro-dilution en milieu gélosé	50
5. Étude statistique	50
<i>Chapitre 3 : Résultats et discussion</i>	51
1. Informations ethnobotaniques	52
2. Rendement des extraits	52
3. Screening phytochimique des extraits	54
3.1. Mise en évidence des métabolites secondaires en tubes à essai	54
3.2. Analyse chromatographique des métabolites secondaires	58
3.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	58
3.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV visible à barrettes de diodes (HPLC-DAD-UV)	67
4. Dosage des métabolites secondaires par spectrophotométrie (UV-visible)	72
4.1. Dosage des polyphénols totaux	72
4.2. Dosage des flavonoïdes totaux	74
4.3. Dosage des tanins condensés	77
5. Évaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques des différents extraits des deux plantes	81

5.1. Évaluation du potentiel antioxydant des extraits	81
5.1.1. Détermination de la capacité antioxydante totale (CAT)	81
5.1.2. Test de l'activité antioxydante au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) par dosage spectrophotométrique	84
5.1.3. Mesure de l'activité inhibitrice du radical ABTS+	86
5.1.4. Mesure du pouvoir réducteur du fer	88
5.1.5. Inhibition du blanchiment du β-carotène/ acide linoléique	93
5.2. Activité inhibitrice de l'AChE : méthode bioautographique au Fast Blue B	97
5.3. Évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes	97
5.3.1. Méthode de diffusion sur disque	97
5.3.2. Méthode de micro-dilution en milieu gélosé	104
Conclusion et perspectives	108
Références bibliographiques	112
Annexes	142

Liste des abréviations

% : Pourcentage

[C] : Concentration

°C : Degré Celsius

AA : Acide ascorbique

AChE: acétylcholinestérase

AcOEt : Acétate d'éthyle

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

AG : Acide gallique

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

Aq : aqueux

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CAT : Capacité antioxydante totale

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CCM: chromatographie sur couche mince

CE : concentration efficace

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DCM: dichlorométhane

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EDTA : éthylène diamine tétra acétate

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ES : extrait sec

FeCl₃ : Chlorure de fer

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : acide sulfurique

HCl : Acide chlorhydrique

HPLC: chromatographie liquide à haute performance

HEX: Hexane

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH

M : Molaire

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

mg EAG/g : mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche

mg EC/g : mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche

min : Minutes

ml : Millilitre

MS : Matière sèche

MV: matériel végétal

nm : Nanomètre

NaNO₂ : nitrite de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

NH₄OH : ammoniacque

Rf : Rapport frontal

SOD : superoxyde dismutase

TFA : Acide trifluoroacétique

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultra-violet

µg : Microgramme

Liste des figures

- Figure 1 :** Aspects morphologiques des parties aériennes de *Thymelaea microphylla*.
- Figure 2 :** Aspects morphologiques des parties aériennes de *Artemisia judaica* L. subsp *sahariensis*.
- Figure 3 :** Extraction par des solvants à polarité croissante.
- Figure 4 :** Extraction sous reflux par l'eau distillée.
- Figure 5 :** Génération du radical ABTS^{•+} avec le persulfate de potassium.
- Figure 6 :** Mécanisme de formation du complexe Fe²⁺ Ferricyanure.
- Figure 7:** CCM des extraits bruts des parties aériennes de *Artemisia judaica* , *Thymelaea microphylla* et témoins avant (N°1: 254 nm; N°2: 365 nm) et après révélation avec le Neu (N°3: 365 nm) dans le système de solvants **S1** : AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26).
- Figure 8:** CCM des extraits bruts des parties aériennes de *Artemisia judaica* et *Thymelaea microphylla*, témoins avant (N°1: 254 nm; N°2: 365 nm) et après révélation avec le Neu (N°3: 365 nm) dans le système de solvants **S2**: AcOEt-MeOH-H₂O (100 : 13,5 : 10)
- Figure 9:** Chromatogrammes HPLC-DAD-UV à 280 nm de l'extrait AcOEt (A), de l'extrait MeOH (B), de l'extrait Aq (C) des parties aériennes de *T. microphylla*.
- Figure 10 :** Chromatogrammes HPLC-DAD-UV à 280 nm de l'extrait AcOEt (A), de l'extrait MeOH (B), de l'extrait Aq (C) des parties aériennes de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L.
- Figure 11 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.
- Figure 12 :** Teneurs en polyphénols des différents extraits de la partie aérienne de *T.microphylla* exprimées en mg/g ES.
- Figure 13:** Teneurs en polyphénols des différents extraits de la partie aérienne d'*A.judaica* exprimées en mg/g ES.
- Figure 14:** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.
- Figure 15:** Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de la partie aérienne de *T.microphylla* exprimées en mg/g ES.

- Figure 16:** Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de la partie aérienne de *A.judaica* exprimées en mg/g ES.
- Figure 17:** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.
- Figure 18:** Teneurs en tanins des différents extraits de la partie aérienne de *T.microphylla* exprimées en mg/ g ES.
- Figure 19:** Teneurs en tanins des différents extraits de la partie aérienne d'*A.judaica* exprimées en mg/g ES.
- Figure 20:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la mesure de la capacité antioxydante totale.
- Figure 21:** Capacité antioxydante totale des extraits bruts de la partie aérienne de *T.microphylla*.
- Figure 22:** Capacité antioxydante totale des extraits bruts de la partie aérienne de *A.judaica*.
- Figure 23:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des différents extraits en fonction des concentrations de la partie aérienne de *T.microphylla*.
- Figure 24 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des différents extraits de la partie aérienne de *Artemisia judaica*.
- Figure 25:** Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ des différents extraits en fonction des concentrations de la partie aérienne de *T.microphylla*.
- Figure 26:** Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ en fonction des concentrations des différents extraits de la partie aérienne de *Artemisia judaica*.
- Figure 27:** Mesure du pouvoir réducteur des différents extraits de la partie aérienne de *Thymellaea microphylla*.
- Figure 28:** Mesure du pouvoir réducteur des différents extraits de la partie aérienne de *Artemisia judaica*.
- Figure 29 :** Changement d'absorbance du β -carotène à 490 nm en présence d'extraits de *T. microphylla*, BHT et du contrôle négatif.
- Figure 30:** Activité antioxydante relative des extraits de *T. microphylla*, BHT et contrôle négatif.
- Figure 31:** Changement d'absorbance du β -carotène à 490 nm en présence des extraits de *Artemisia judaica* de BHT et du contrôle négatif.

Figure 32: Activité antioxydante relative d'extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L., BHT et contrôle négatif.

Figure 33: Zones d'inhibition des extraits actifs de *T. microphylla* à une concentration de (1 mg/ ml⁻¹) relatives aux souches sensibles

Figure 34: Zones d'inhibition des extraits actifs de *Artemisia judaica* à une concentration de (1 mg/ ml⁻¹) relatives aux souches sensibles.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques données chimiques sur le genre *Thymelaea*

Tableau 2 : Quelques données chimiques sur le genre *Artemisia*

Tableau 3: Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations de récolte

Tableau 4 : Réactions de caractérisation du screening phytochimique

Tableau 5 : Liste des témoins utilisés pour les flavonoïdes et les acides phénoliques

Tableau 6 : Systèmes de migration et réactifs utilisés pour la révélation des flavonoïdes et acides phénoliques

Tableau 7 : Caractéristiques des métabolites secondaires

Tableau 8: Programme (temps, débit et gradient de solvant) utilisé en HPLC analytique pour l'injection des différents extraits et standards.

Tableau 9 : Description et pouvoir pathogène des souches testées

Tableau 10 : Rendement en pourcentage des extraits bruts de la partie aérienne de *Thymelaea microphylla* et *Artemisia judaica*.

Tableau 11. Mise en évidence des métabolites secondaires des extraits de *T.microphylla*

Tableau 12 : Mise en évidence des métabolites secondaires des extraits de *A. judaica* subsp.

Tableau 13. Les rapports frontaux des extraits bruts des parties aériennes de *Artemisia judaica* et *Thymelaea microphylla*

Tableau 14. Les rapports frontaux des témoins

Tableau15 : HPLC-UV-DAD analyse des composés phénoliques dans différents extraits de *T. microphylla*

Tableau 16: HPLC-UV-DAD analyse des composés phénoliques dans différents extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L.

Tableau 17 : Teneurs totales en composés phénoliques, flavonoïdes et tannins des extraits de *T. microphylla*.

Tableau 18 : Teneurs totales en composés phénoliques, flavonoïdes et tannins des extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L.

Tableau 10: Activité antioxydante des extraits de *T. microphylla* par différentes méthodes

Tableau 20 : Activité antioxydante des extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L. par différentes méthodes.

Tableau 21: Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en %) des différents extraits de *Artemisia judaica* (dont les diamètres des zones d'inhibitions sont $\geq 12\text{mm}$) relatives aux bactéries testées.

Tableau 22: Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en %) des différents extraits de *T.microphylla* (dont les diamètres des zones d'inhibitions sont $\geq 12\text{mm}$) relatives aux bactéries testées.

INTRODUCTION GENERALE

La nature est pour l'humanité une source d'agents médicinaux depuis des millénaires. Aujourd'hui il s'avère qu'un grand nombre de plantes médicinales possèdent des activités biologiques très intéressantes trouvant de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, agriculture et cosmétologie. En Algérie, les industries pharmaceutiques et chimiques cherchent à mieux valoriser le patrimoine des espèces utilisées en médecine traditionnelle : leurs constituants, leurs modes d'utilisation ainsi que leurs indications dans diverses pathologies (**Hammiche et Maiza, 2006**).

D'après le rapport sur la stratégie de l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS 2014-2023**), il est noté que plusieurs millions de personnes ont recours aux médicaments à base de plantes pour se soigner. Cette médecine dite traditionnelle est facile d'accès, financièrement abordable et est traditionnellement utilisée sous plusieurs formes.

Selon un rapport publié en 2017 par le centre de recherches des jardins botaniques royaux de Kew, 28 187 plantes ont un usage médicinal. Ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle mais aussi pour faire des médicaments à l'échelle industrielle. D'après le Fond Mondial pour la Nature (WWF), 70 % des nouvelles molécules développées ces dernières années dans l'industrie pharmaceutique proviennent d'une source naturelle.

L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique en raison de sa position biogéographique privilégiée et son étendue entre l'Afrique subsaharienne et la méditerranée.

La flore algérienne est potentiellement riche et diversifiée, ce qui constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (**Baba Aissa, 1999**). Nous partageons avec les méditerranéens et les pays du Sahel une importante diversité de composés et d'éléments phytochimiques d'un intérêt certain.

La zone saharienne présente une flore spécifique, caractérisée par une importante diversité floristique, qui renferme de nombreuses espèces endémiques qui sont hautement adaptées au climat de cette zone. Elles renferment un large éventail de composés et d'éléments phytochimiques d'un intérêt grandissant parmi les espèces récoltées à Tamanrasset utilisées à des fins thérapeutiques, on peut citer l'espèce *Marrubium deserti* (**Saad et al., 2021**), *Aerva javanica*, *Deverra scoparia*, *Pentzia monodiana*, *Pulicaria incisa*, *Maerua crassifolia*, *Anabasis articulata*, *Mentha longifolia*, *Cymbopogon schoenanthus*, *Balanites aegyptiaca* (**Chaib et al., 2015**).

Les plantes médicinales sont extrêmement riches, quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées. Le métabolisme des plantes contient des milliers de différents constituants dont l'effet thérapeutique n'est évidemment pas lié à tous les composés, de même pour ce qui est de l'effet nocif ou toxique.

Les propriétés antioxydantes des extraits végétaux sont abondamment étudiées. En effet, le stress oxydatif est un facteur étiologique crucial responsable de diverses maladies chroniques humaines telles que le diabète, le cancer, l'inflammation, le vieillissement ainsi que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Uttara et al., 2009**). Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur des biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, impliquant la destruction et la mort de cellules (**Moon et al., 2009**). Une façon de prévenir ce stress oxydatif est de rechercher un apport supplémentaire de composés antioxydants (**Mohammedi, 2013**). Les études portant sur l'activité antioxydante sont basées sur l'amélioration des techniques d'extraction des composés phénoliques à partir des produits naturels (**Jerez et al., 2006**).

Les plantes sont également utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes. Néanmoins en tant que source de médicaments, les plantes restent encore mal exploitées, surtout dans le domaine de la microbiologie médicale (**Ghabrier, 2010**).

Parmi ce vaste patrimoine floristique, on trouve deux espèces végétales : *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. de la famille des Thymelacées et *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* L de la famille des Astéracées sur lesquelles on se penchera dans la suite.

Notre objectif sera alors d'apporter une contribution à la connaissance et à la valorisation des deux espèces végétales du sahara algérien évoquées ci-dessus. Notre travail a été réalisé en trois parties :

➤ Dans la première partie, une synthèse bibliographique a été menée sur les deux espèces sélectionnées. Nous avons procédé à quelques rappels sur le stress oxydant, les métabolites secondaires et leurs activités biologiques.

➤ Dans la deuxième partie, le travail est expérimental et il consiste en :

- La préparation des extraits bruts secs et détermination de leurs rendements.
- La détermination des différentes classes de familles chimiques par criblage phytochimique des différentes parties des espèces étudiées.
- La caractérisation phytochimique des acides phénoliques par une analyse en chromatographie en couche mince et une chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC-UV-DAD des extraits sur les deux espèces sélectionnées.

- Le dosage des principales classes phénoliques : les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins.
- L'évaluation *in vitro* du pouvoir antioxydant des extraits sélectionnés au moyen de cinq tests (capacité antioxydante totale (CAT), piégeage du radical libre DPPH, réduction de fer, activité inhibitrice du radical ABTS+, et blanchiment du β -carotène).
- Le test de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase par bioautographie.
- L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits.

➤ Dans la troisième partie, nous discuterons les résultats obtenus lors de cette étude et notre travail sera achevé par une conclusion générale et la définition des perspectives quant à l'utilisation de ces différentes plantes dans les secteurs agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

CHAPITRE 1 :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Présentation des plantes médicinales sélectionnées

Nous avons axé notre travail sur l'étude phytochimique et quelques activités biologiques de deux plantes sahariennes : *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* de la famille des Astéracées et *Thymeleae microphylla* de la famille des Thymelaeacées. Le choix de ces deux plantes a été dicté du fait de leurs usages dans la pharmacopée traditionnelle et par les études chimiques, répertoriées dans la littérature, qu'elles ont inspirée.

1.1. Caractéristiques générales de la famille des Thymelaeacées

Les Thymelaeacées sont une famille de dicotylédones comprenant environ 1200 espèces avec 67 genres. Les espèces de cette famille sont distribuées dans les zones tropicales et tempérées particulièrement en Afrique et sont absents des régions aux climats les plus froids (Borris et al., 1988).

Les plantes sont originaires du nord au centre de l'Europe, de l'est au centre de l'Asie, des régions méditerranéennes et des îles Canaries (Kadri et al., 2011).

Les espèces de cette famille sont principalement des arbustes ou des plantes herbacées. Leurs caractères morphologiques principaux sont les suivants (Heywood et Brice, 1996) :

-Feuilles : alternes ou opposées souvent coriaces et persistantes.

-Fleurs : régulières, hermaphrodites dioïques ou polygames, pièces florales normalement par 4 ou 5, regroupées en racèmes, en capitules ou en fascicules, en forme de coupe, le réceptacle creux formant un tube profond dont le bord porte généralement les pièces florales, sépales pétaloïdes, apparaissant comme une continuité du tube, étamines insérées dans le tube et corolle insignifiante ou absente.

-Fruit : akène, baie, drupe ou parfois capsule, graine possédant peu ou pas d'albumen (Quezel et Santa, 1963).

1.1.1. Genres et espèces de la famille des Thymelaeacées

Plusieurs genres de la famille des Thymelaeacées renferment des espèces intéressantes dont certaines figurent en Algérie: *Daphne* (90 espèces), *Daphnopsis* (73 espèces), *Gnidia* (152 espèces), *Gonystylus* (32 espèces), *Pimelea* (80 espèces), *Wikstroemia* et *Thymelaea* (30 espèces): *T.velutina*, *T.virgata*, *T.nitida*, *T.virescens*, *T.tartonnairia*, *T.hirsuta* L., *T.microphylla* Coss. et Dur. et *T.passerina* Langue de Moineau (Baba Aissa, 1999).

Thymelaea est représenté par 8 espèces poussant en Algérie (**Quezel et Santa, 1963**). Le nom *Thymelaea* est venu du mot greco-latin « *Daphnognidium* » désignant une plante à fruits laxatifs.

Ces plantes sont annuelles et se présentent sous forme d'herbes ou d'arbrisseaux bas à feuilles et fleurs très petites, les premières larges de quelques millimètres, les secondes peu apparentes, jaunâtres ou verdâtres, sans corolle, à 4 sépales et 8 étamines très courtes à fleurs polygames ou dioïques (**Fournier, 2010**). Le périanthe est à 4-5 divisions généralement persistant, verdâtre ou jaunâtre. Le fruit est une baie sèche, incluse dans le calice (**Ozenda, 1991**).

1.1.2. Propriétés chimiques et usages thérapeutiques

Les principales recherches réalisées sur les plantes de la famille Thymelaeacées montrent la variété des métabolites secondaires produits par cette famille. Parmi ceux-ci, on peut citer les esters diterpéniques de types tigliane, daphnane et 1-alkyldaphnane, coumarine, biscoumarine, flavonoïde, biflavonoïde, lignane, huile essentielle, triterpène, diterpène, stéroïde et spiro--lactone glycoside (**Ghanem et al., 2014**). L'intérêt initial de ces recherches s'explique par la toxicité remarquable de ces plantes chez les êtres humains et les espèces animales. D'autres composés tels que les flavones, les saponosides, les diterpènes, les alcaloïdes et les glucosides caractérisent la famille des Thymelaeacées (**Le Floc'h, 1983** dans **Dohou et al., 2003 ; Evans et Taylor, 1983 ; Touati, 1985**).

Plusieurs espèces de la famille des Thymelaeacées contiennent en diverses proportions deux principes chimiques :

-la mézéréine, une substance résineuse d'un jaune brunâtre, de constitution encore inconnue, très vénéneuse, irritante, amère et sternutatoire.

-la daphnine, un glucoside non vénéneux, à saveur amère et astringente (**Fournier, 2010**).

Les Thymelaeacées sont également connues pour leur contenu en coumarines dont certaines sont des dimères. L'exemple le mieux connu est la daphnorétine qui possède une activité anticancéreuse (**Boris et Cordell, 1984; Li et al., 2004 ; Hussain et al., 2012**), mais aussi 12 autres coumarines, dicoumarines et glycosides de coumarines (**Frankel et Meyer, 2000; Su et al., 2006; Hussain et al., 2012**). C'est ainsi que des études sur des espèces du genre *Daphne* ont rapporté que ces plantes sont riches en coumarines comme la daphnéine et la daphnorétine et en flavonoïdes comme la quercétine et la lutéoline (**Deiana et al., 2003**).

Levin (1976) a observé la présence des alcaloïdes chez 36% des espèces de Thymelaeacées, alors que Touati (1985) a signalé que *Thymelaea hirsuta* n'en contient pas. Quant aux tanins, ils semblent être peu courants dans la famille des Thymelaeacées. Lorsqu'ils apparaissent, il s'agit généralement de dérivés du leucocyanidol (Hegnauer, 1973). Ferrari (2002) affirme que les Thymelaeacées ne sont pas une famille à saponines.

Une synthèse faite par Dohou et al. en 2003 sur des études réalisées sur le genre *Thymelaea* a conduit à l'isolement de plusieurs métabolites secondaires qui sont constitués de flavonoïdes, biflavonoïdes, coumarines, biscoumarines, phénoliques, diterpènes et des huiles essentielles comme l'indique le tableau 1.

Tableau 1. Quelques données chimiques sur le genre *Thymelaea* (Dohou et al., 2003).

Espèce	Organes étudiés	Molécules extraites	Références
<i>hirsuta</i>	feuilles	thyméol ((C ₇ H ₂ O) _n)	Saleh <i>et al.</i> , 1965
	feuilles	stigmastérol, β-sitostérol, alcool aliphatique C ₁₂ H ₂₂ O, lactone C ₁₉ H ₁₈ O ₆	Gharbo <i>et al.</i> , 1970
	–	alcane en C27 à 31, alcanols en C22, 24, 26 et 28, β-sitostérol et campestérol	Rizk <i>et al.</i> , 1974
	–	daphnorine, daphnorétine, daphnine, daphnéline, daphnéline-glucoside, ombelliférone, scopolétine et esculétine (coumarines)	Rizk <i>et al.</i> , 1975
	feuilles	2-vicénine (C-flavone)	Nawwar <i>et al.</i> , 1977
	feuilles	tiliroside (3- <i>p</i> -coumaroylglucosylkaempférol) (flavanol)	Ismail, 1978
	feuilles	lupéol, β-sitostérol, phytol, β-amyrine, bétuline, erythrodiol, cholestérol et lanostérol	Garcia-Granados et Saenz de Buruaga, 1980a
	feuilles et brindilles	5,12-dihydroxy-6,7-époxy-résiniféronol	Rizk <i>et al.</i> , 1984
	feuilles et brindilles	gnidicine, gniditrine, genkwadaphnine, 12- <i>O</i> -heptadécenoyl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol-9,13,14-orthobenzoate et 12- <i>O</i> -butényl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol-9,13,14-orthobenzoate (diterpènes daphnane)	Brooks <i>et al.</i> , 1990
	racines	daphnorétine (éther de dicoumaryl)	Abou-Karam <i>et al.</i> , 1998
feuilles	tanins	El-Beheiry, 2000	
<i>microphylla</i>	parties aériennes	acide oléanolique, β-sitostérol and 3- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-β-sitostérol	Cheriti et Sekkoum, 1995
<i>passerina</i>	parties aériennes	pentacosane, triacontanol, sitostérol, stigmastérol, β-amyrine, ombelliférone et scopolétine	George et Rishi, 1982
<i>tartouira</i>	parties aériennes	orientine, isoorientine, vitexine, 2-vicénine, kaempférol, daphnorétine, genkwanine, 5- <i>o</i> -D-genkwanine, primevérosyl (flavone-coumarine)	Garcia-Granados et Saenz de Buruaga, 1980b

L'étude ethnobotanique a permis de retenir une grande utilisation des plantes de ce genre dans différentes régions. À M'sila, l'espèce *T. hirsuta* est utilisée dans le traitement de leishmanicide, vermifuge, eczéma (Amari et al., 2014).

En Tunisie, le décocté de *T. hirsuta* est utilisé dans le traitement du diabète. De plus, il a été prouvé que cette espèce possède des propriétés antiseptique, anti inflammatoire, antimelanogénèse et antihypertensive (Trigui et al., 2013).

L'activité antioxydante est aussi établie au Maroc, *Thymelaea lythroides* est largement utilisée pour guérir divers maux (et particulièrement les douleurs du dos, de la vessie, les otites, les fractures, etc).

Le genre *Daphne* renferme des espèces très connues dans la phytothérapie : *D. cneorum* (la petite Thymélée), *D. gnidium* (le Garou), *D. mezereum* (le Bois gentil) et *D. laureola* (Lauréole). Les fruits du Garou, répandus dans les régions méditerranéennes, étaient utilisés comme évacuant, dépuratif, antiaphrodisiaque, purgatif, contre les douleurs ostéocopes nocturnes, contre des exostoses crâniennes extrêmement douloureuses, contre l'hydropisie, le rhumatisme chronique, les maladies de peau, surtout d'origine vénérienne. En plus, le Garou est resté, dans la médecine populaire, le médicament par excellence des affections syphilitiques (Fournier, 2010).

D'autres composés chimiques peuvent avoir une activité anticancérogène, comme la daphnétoxine, trouvée exclusivement chez des membres de la famille des Thymelaeacées et la Daphnorétine (Diogo et al., 2009).

1.1.3. *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.

1.1.3.1. Description morphologique

Thymelaea microphylla est une espèce endémique à l'Afrique du Nord, poussant sous forme d'arbrisseau dioïque de 30 cm à 1 mètre, à rameaux effilés allongés, d'une coloration blanchâtre soyeux (Figure1). C'est une plante vivace à feuilles très petites et espacées sur les rameaux (1-4 mm), ovoïdes, les fleurs sont blanc-jaunâtres en glomérules telles que les fleurs mâles à calice cylindrique de 4 à 6 mm et les fleurs femelles de 3 à 4 mm sur des pieds différents (Quezel et Santa, 1963). Le système radical est caractérisé par une réitération distale, avec des ramifications horizontales en petits nombres (Bendali et al., 1990).

Cette espèce est très commune des hauts-plateaux et des régions désertiques de l'Algérie.

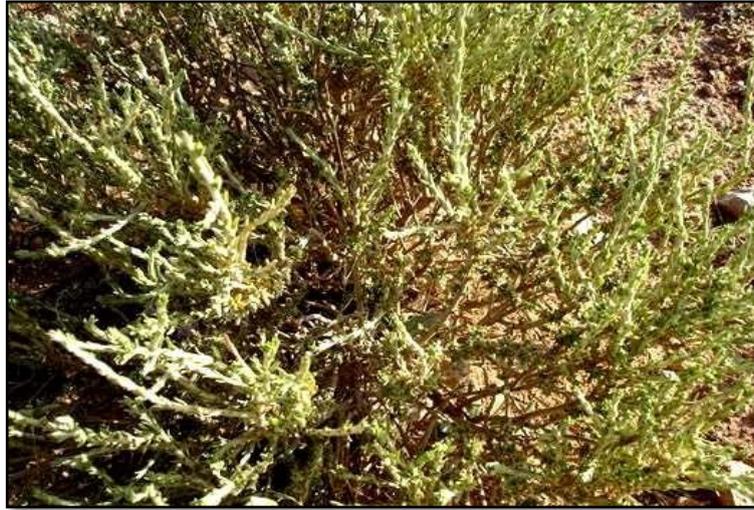


Figure 1 : Aspects morphologiques des parties aériennes de *Thymelaea microphylla*
Photo prise à Ain Sefra, Naama, Algérie. Mars 2015.

1.1.3.2. Systématique de la plante *Thymelaea microphylla* Coss.et Dur.

D'après la classification **APGIII (2009)**, on a :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones vraies

Sous classe : Rosidées

Ordre : Malvales

Famille : Thymelaeaceae

Genre : *Thymelaea*

Espèce : *microphylla* Coss. et Dur.

Noms vernaculaires : Methnane, el Abiod (**Quezel et Santa, 1963**) ou Metnen dans le sud de l'Oranie, Tiout et environ, ou Metnân dans la partie orientale marocaine et Methnène en Tunisie (**AïtYoussef, 2006**).

Nom français : Thymelée ou passerine à petites feuilles.

1.1.3.3. Répartition géographique

Thymelaea microphylla est une espèce à affinité saharienne (**Ben el Mostafa et al., 2001**), on la retrouve dans les sols sablonneux et les sols gypseux (**Perry et Goodall, 1979**). Généralement, cette plante occupe les glacis ensablés avec les espèces *Atractylis serratuloide*, *Lygeum spartum* ou occupe les steppes avec l'espèce *Salsola vermiculata* (**Bouzenoune, 2003**).

Cette espèce est très commune des Hauts-plateaux et des régions désertiques de l'Algérie (plante endémique de l'Afrique du Nord); elle pousse surtout dans les pâturages arides et désertiques (**Aït Youssef, 2006**).

1.1.3.4. Usages thérapeutiques

En Tunisie, les feuilles sont utilisées en cataplasme dans le traitement des blessures et de diverses dermatoses : érysipèle, cancer de la peau, boutons et abcès. Le décocté des feuilles est signalé comme purgatif mais aussi dans le traitement de la stérilité et de l'ictère (**Boukef, 1986**). En outre, cette plante est utilisée à Djelfa en usage externe comme bain végétal, le décocté des feuilles est utilisé pour traiter l'alopecie, la gale et les mycoses. En usage interne par voie orale, le décocté des racines est préconisé pour soulager les douleurs abdominales et pour éliminer l'aérocologie (**Djeridane et al., 2010**).

1.1.3.5. Composition chimique

La composition chimique de *Thymelaea microphylla* est peu étudiée. Une étude réalisée par **Cheriti et Sekkoum en 1995** a révélé la présence de l'acide oléanolique, le β -sitostérol et le 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitostérol, dans les parties aériennes de *Thymelaea microphylla*.

À propos des activités biologiques, le pouvoir antioxydant des extraits de *T. microphylla* est rapporté par **Benhammou et al. (2009)** et **Djeridane et al. (2010)**.

Les métabolites secondaires connus dans la littérature et isolés par **Ghanem et al. (2014)** consistent notamment en cinq biflavonoïdes néochamaejasmine A, néochamaejasmine B, daphnodorine B, genkwanol A et stelleranol, une bis-coumarine daphnorétine, un flavonoïde glucosylé appelé tiliroside, deux lignanes nommées pinorésinol et matairésinol et un phénylpropanoïde glucoside connu sous le nom syringine. Deux rares spiro--lactones glycosides nouveaux à squelette 1,7-dioxa-2,6-dioxospiro nonane nommés microphynolides A et B, un phénylpropanoïde glucosylé de type sinapyle alcool glucoside et deux stéroïdes de type phytostérol. Il est à noter que les biflavonoïdes phenyl propanoïdes glucosylés ont été identifiés pour la première fois dans le genre *Thymelaea*.

L'analyse par GC/MS des huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de l'espèce *Thymelaea microphylla* a permis d'identifier les composés suivants : acide 1-carboxylique bornane, limonène, isobutyranilide, menthone, pulégone, (6E)-2,5-diméthyl-1,6-octadiène, perillal, 1-(2-bromovinyl)-adamantane, 2-undécanone, farnésène et

artemesiatriène (**Ghanem et al., 2014**). L'étude phytochimique menée par **Mekhelfi et al. (2014)** sur *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. d'Algérie a conduit à l'isolement de six composés: vanilline, (+)-syringarésinol, daphnorétine, (Z)-8-hydroxylinalool, chrysoériol, lutéoline et un mélange de trans-tiliroside et de cis-tiliroside (respectivement 97 et 3%).

1.2. Caractéristiques générales de la famille des Astéracées

La famille des Astéracées, anciennement appelées Composées (Compositées), est une famille cosmopolite, c'est la plus large des plantes à fleurs qui comprend 1317 genres et plus de 20000 espèces décrites dont 750 endémiques (**Génin, 1989**), distribuées principalement dans les zones tempérées du globe. C'est l'une des familles les plus importantes des angiospermes ; leurs feuilles sont pennées (rarement palmées).

Les Astéracées présentent plusieurs critères morphologiques : végétaux à ports extrêmement variés constitués d'arbustes et souvent d'arbrisseaux. Généralement, ce sont des herbes annuelles ou bisannuelles, plus ou moins pérennes, ils possèdent des lianes herbacées grimpantes ou rampantes. Les feuilles très polymorphes, petites, sont sans stipule alternes ou opposées en rosette. Elles sont simples, entières ou dentelées et parfois divisées en plusieurs segments plus ou moins grands ; par contre les Astéracées sont très homogènes au niveau de leurs inflorescences, ils ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs serrées les unes à côté des autres, c'est-à-dire réunies en capitules, sans pédoncule, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Le fruit est un akène souvent couronné d'un pappus provenant du calice après la fécondation (**Quezel et Santa, 1963**).

1.2.1. Genre *Artemisia* et ses espèces

Le genre *Artemisia* (appelé Armoise) appartient à la famille des Astéracées, c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille ; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 500 espèces réparties principalement dans les zones tempérées d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Nord. Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquiniques, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (**Bora et Sharma, 2010 ; Bora et Sharma, 2011**).

Les espèces de ce genre possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (**Mirjalili et al., 2007**).

Les armoises étaient déjà employées comme anthelminthique et stomachique par les Grecs et les Romains. Plus d'une vingtaine d'espèces sont présentes au Maghreb et au Sahara (12 au Maroc, 10 en Algérie, 6 en Tunisie, 5 en Libye et 4 en Égypte). Ce sont d'abord les espèces communes aux rivages nord et sud du bassin méditerranéen : *Artemisia arborescens*, *A. herba-alba* Asso, *A. absinthium*, *A. vulgaris*, *A. Campestris* subsp. *glutinosa*, *A. verlotorum* et *A. Scoparia* ; puis les espèces du rivage sud : *A. atlantica* var. *typica*, *A. judaica* subsp. *sahariensis*, *A. alba* subsp. *chitachensis*, *A. atlantica* var. *maroccana*, *A. flahautti*, *A. ifranensis*, *A. mesatlantica*, *A. negrei*, *A. reptans*, *A. alba* subsp. *kabylica*, *A. campestris* subsp. *variabilis* et *A. monosperma* (Gast, 1989).

1.2.2. Propriétés chimiques et usages thérapeutiques (travaux antérieurs)

Un grand nombre de plantes du genre *Artemisia* a été employé dans la médecine classique comme *Artemisia herba alba* qui pousse abondamment dans le Moyen-Orient, bien connue et extensivement utilisée dans la médecine populaire irakienne pour le traitement du diabète (Alshamaony et al., 1994 ; Bouraoui et al., 2003).

En raison de sa richesse en polyphénols et en huiles essentielles volatiles, l'armoise est douée d'activités antimicrobienne, analgésique, anti-inflammatoire et antipyrétique. (Al Gaby et al., 2000).

L'absinthe ou *A. absinthium* est traditionnellement utilisée comme herbe médicinale pour traiter les troubles gastro-intestinaux, les maladies cardiovasculaires, les troubles de la peau, le diabète, le système immunitaire affaibli, l'athérosclérose, le cancer et l'arthrite.

Artemisia anomala a été employée pendant des siècles en Chine comme analgésique, hémostatique, antibiotique et aussi pour traiter les plaies. Tandis que *A. keiskeana* a été employée comme drogue chinoise traditionnelle pour le traitement des maladies rhumatismales. En outre, *A. eriopoda* a été utilisée dans la médecine traditionnelle dans le sud de la Chine au lieu de l'herbe chinoise traditionnelle *A. annua*, alors que *A. mongolica* est habituellement utilisée pour traiter les maladies inflammatoires et le froid (Jakupovic et al., 1987 ; Hu et al., 1996 ; Kwak et al., 1997).

Le sesquiterpène lactone, qui a été isolé de *A. annua* pendant plusieurs siècles, a été considéré comme l'une des drogues les plus valables utilisées en médecine traditionnelle chinoise dans le traitement du paludisme cérébral.

A. arborescens a été employée dans la médecine classique comme un antispasmodique ; en outre, *A. cina* et *A. herba alba* ont une action contre les vers ronds, en particulier l'ascaris lombricoïde (*Ascaris lumbricoides*) (Khafagy, 1971 ; Shilin, 1989 ;

Abu-Zarga et al., 1995). *A. scoparia* est utilisée comme purgative, *A. giraldii* pour traiter la pharyngite et la pneumonie, *A. mongolica* et *A. vesta* ont fréquemment été employées pour le traitement des infections fongiques telles que la teigne (Sharma e al., 1996 ; Zheng et al., 1996 ; Tan et al., 1999).

Le tableau 2 montre que la littérature indique que de nombreux composés ont été isolés du genre *Artemisia*.

Tableau 2. Quelques données chimiques sur le genre *Artemisia* (Messai, 2011)

l'espèce	Noms des composés
<i>A. glabella</i>	sesquiterpène lactone Arglabin
<i>A. sieversiana</i>	Deux sesquiterpènes lactones Artemolin et bsinthin
<i>A. feddei et Montana</i>	Deux sesquiterpènes lactones
<i>A. herba alba</i>	cinq sesquiterpènes : Herbolides G,H,I,E et F
<i>A. judaica</i>	4-epi-vulgarin et α 4 α -hydroperoxy-desoxyvulgarin,
<i>A. pectinata</i>	typiques spiroketal-enol-ether, eremophil-9,11(13)-dien-12-oic, 8 α -hydroxyeudesma-4,11(13)-dien-12-oic et - acetoxyeudesma-4,11(13)-dien-12-oic.
<i>A. Arborescens</i>	un eudesmanolide nommé Jordanolide, aussi bien que Artemetin, Arborescin, Apigenin, Dihydroridentin et chrysoeriol.
<i>A. subdigitata</i>	un sesquiterpène Subditatone avec d'autres composés comme le Borneol et l'acide ursolique
<i>A. pallens</i>	un germacranolide nommé: 4,5 β -epoxy-10 α -hydroxy-1-en-3-one-transgermacran-12,6 α -olide.
<i>A. herba alba</i>	six eudimanolides nommés: α -santonin, Taurin, Erivanin, Isoerivanin, 8 α -hydroxy-4 α ,5 α -epoxytaurin et Herbalbin
<i>A. princeps</i>	d'un eudesmane sesquiterpène Yomogin avec trois flavanoides habituels à savoir jaceosidin, Acacetin et Genkxanin, en même temps que quatre autres composés: Achillin, Leucodin, scopltin et isofraxidin.
<i>A. Annu</i>	sept sesquiterpènes cadinanes.
<i>A. fragrens</i>	(3S*,4R*,5R*)-3-hydroxymethyl-4-(1-acetoxypisopropyl)-5-isopropyl-1,2-dioxolane
<i>A. suksdorfii</i>	cinq monoterpènes polyols: (+)-(1S*,2R*,6S*)-trihydroxy-p-menth-3-ene, (+)-(1R*,2R*,6S*)-trihydroxy-p-menth-3-ene, (+)-(3S*,4R*,5R*)-trihydroxysabinane, (+)-(3S*,4R*)-dihydroxy-(5R*)-methoxysabinane, (+)-(3S*,4R*,5S*)-trihydroxysabinane sept monoterpènes lactones: 1 α ,4 α -dihydroxy-3 β -chloro-8 α -acetoxhguai-9,11(13)-dien-6 α ,12-olide, 1 α ,4 β -dihydroxy-3 β -chloro-8 α -acetoxhguai-9,11(13)-dien-6 α ,12-olide, 1 α ,4 α -dihydroxy-3 β -chloro-8 α -acetoxhguai-10(14),11(13)-dien-6 α ,12-olide, 4 α -dihydroxy-3 β -chloro-8 α -acetoxhguai-1(10),11(13)-dien-6 α ,12-olide, 1 α ,3 α ,4 β -dihydroxy-3 β -chloro-8 α -acetoxhguai-9,11(13)-dien-6 α ,12-olide,

<i>A. herba alba</i>	quatre eudesmanolides: 11-epideacetyltorrentin; 1,11-diepitorrentin; deacetyltorrentin et 1-epi-torrentin.
<i>A. schimperi</i>	un nouveau monoterpène nommé 1,5-octadien-3-hydroxy-3-méthyl-7-one, en plus de artemisyl, lyratyl acetata et quercetin-3,3',4'-triméthyl-éther.
<i>A. rutifolia</i>	deux guaianolides fortement oxygénés qui sont identifiés comme: 1 α ,2 α ,3 α ,4 β ,10 α - et 1 α ,2 α ,3 α ,4 α ,10 α -pentahydroxyguaia-11(13)-ene-12,6 α -olides aussi bien que trois secoguaianolides : 3 α -acetoxy, 3 α -methoxy-3 β -dehydroxy-iso-seco-tanapartholides et 3-acetyl-iso-seco-tanapartholides.
<i>A. rutifolia</i>	trois composés: 1 β -acetoxy-11 β H-eudesma-3-ene-12,6 α -olide, 1 β ,3 β -dihydroxy-6 α -[2'-hydroxymethylacryloyloxy]-costic acide méthyle éther et 1 α ,4 β -dihydroxyguai-2,10(14),11(13)-trien-12,6 α -olide.
<i>A. Argyi</i>	α - et β -amyrin, friedelin et un dérivé de cycloartane nommé 3 β -methoxy-9 β ,19-cycloanost-23(E)-en-25,26-diol.
<i>A. annua</i>	deux polyacétylènes nommes: annuadiepoxyde et pontecaepoxyde.
<i>A. annua</i>	morruic acid et qinghaosu
<i>A. turcomanica</i>	deux germranolides: ridentin-3-acetate et 11 β ,13-dihydroridentin-3-acetate aussi bien que, Artemorin, gallicin, Artemin, Anydroverlotorin et le monoterpène Santolina-1,8-diene-4,5-diol
<i>A. turcomanica</i>	deux germranolides: ridentin-3-acetate et 11 β ,13-dihydroridentin-3-acetate aussi bien que, Artemorin, gallicin, Artemin, Anydroverlotorin et le monoterpène Santolina-1,8-diene-4,5-diol
<i>A. turcomanica</i>	deux germranolides: ridentin-3-acetate et 11 β ,13-dihydroridentin-3-acetate aussi bien que, Artemorin, gallicin, Artemin, Anydroverlotorin et le monoterpène Santolina-1,8-diene-4,5-diol
<i>A. deserti</i>	les monoterpènes: Camphor, Borneol, Piperitone, FilfolideA et un guaianolide: 2-oxo-8 α ,10 β dihydroxyguai-3-en-1 α ,5 α ,6 β 11 β H-12,6-olide.
<i>A. jacutica</i> <i>A. sieversiana</i> <i>A. absinthum</i>	l'acide chlorogénique, Ferulique, p-hydroxy benzoïque, l'acide p-coumarique, l'acide neochlorogénique.
<i>A. verlotiorum</i> <i>A. spicigera</i>	Verlotorin, anhydroverlotorin, Artemorin, costunolide, reynosin et le Santamarin, ainsi que deux eudesmanolides identifiés comme: 1 α -hydroxyeudesma- 4(15)-en-5 α ,6 β 11 β H-12,6-olide et

1.2.3. *Artemisia judaïca* L.

1.2.3.1. Description morphologique

Artemisia judaïca L., appelée « ShihBalady », est une plante vivace parfumée sous forme d'arbustes entre 50 à 80 cm de hauteur formant de grosses touffes vert bleuté (Figure 2). Les tiges sont plus ou moins ligneuses qui se développent largement dans le désert du sud de l'Algérie. Les capitules jaunes pâles bombés sont assez gros. Les feuilles sont petites, alternes, sessiles et disséquées, densément couvertes d'un duvet argenté (Quezel et Santa, 1963). La floraison débute au printemps, les fleurs sont groupées en jaune pâle, discoïde, têtes hémisphériques 5-10 mm de diamètre, contenant 10 à 20 fleurons. Le feuillage de la plante dégage une odeur agréable quand on les écrase et une

sensation amère si on les goûte. Les fruits sont des akènes petits ne dépassant pas 5 mm en taille.



Figure 2: Aspects morphologiques des parties aériennes de *Artemisia judaica* L. subsp. *sahariensis*. Photo prise à Tamanrasset, Algérie en Mars 2014.

1.2.3.2. Systématique de la plante *Artemisia judaica* L. subsp. *sahariensis*

D'après la classification APGIII (2009), on a :

Règne : Plantae.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous-embranchement: Angiospermes.

Classe: Dicotylédones vraies

Sous classe: Asteridées

Ordre: Asterales.

Famille: Asteraceae

Genre: *Artemisia*.

Espèce: *judaica* L.

Sous espèce: subsp.. *sahariensis*.

Noms vernaculaires:

Artemisia: Le nom latin vient d'Artemis (en bonne santé), qui était le nom grec Diana, la déesse de la lune; *judaica*, de Judée.

En targui: téharagélé

En arabe: chouihiya, baatharam

En français: armoise de Judée

1.2.3.3. Répartition géographique

Artemisia judaïca se rencontre dans les lits sablonneux et sablonneux-limoneux des oueds dans l'étage tropical, elle monte parfois jusqu'à l'étage méditerranéen inférieur. On la trouve également en Egypte (désert et côte) et au Moyen-Orient (péninsule du Sinaï, Israël, Jordanie et Arabie saoudite (**Quezel et Santa, 1963; Tackholm, 1974; Ozenda, 1991**)).

Elle est répandue au Sahara oriental, très présente au Sahara central. Elle pousse en masse dans l'oued à Tadmayt dans le Hoggar, à Tefedest (Oued Gif Aman), dans l'oued Azemzi à Tamanrasset et aux environs d'In-Amenas (villes situées à 1900 km au sud d'Alger), mais elle se fait plus rare dans l'Est du Sahara septentrional (**Maire, 1933 ; Ozenda, 1991**).

Au Sahara central, *Artemisia judaïca* L. subsp. *sahariensis* pousse dans la chaîne montagneuse du Hoggar de 1200 à 1800 mètres d'altitude. Elle a une très forte odeur qui embaume les lieux et se reconnaît parfois à plusieurs kilomètres. Elle est l'une des 11 espèces les plus représentatives du genre *Artemisia* en Algérie et était connue chez les Touaregs sous le nom berbère « Teherégélé » (**Maire, 1933 ; Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda, 1991**). Selon ces auteurs, ce petit arbuste se développe dans des conditions désertiques avec une moyenne de 100 mm de pluie par an. Dans le Tassili, il ne pousse pas au-dessus de 1800 m.

1.2.3.4. Propriétés et usages thérapeutiques (travaux antérieurs)

Le pipéritone et le trans-cinnamate d'éthyle, deux principaux composants d'huile essentielle de *Artemisia judaïca* L., ont une activité insecticide contre *Callosobruchus maculatus* et une activité antifongique contre les champignons pathogènes pour l'homme et les végétaux (**Khafagy et Tosson, 1968 ; Abdalla et Abu-Zagra, 1987; Khafagy et al., 1988; Dubey et al., 2000 ; Ketoh et al., 2006 ; Abdelgaleil et al., 2008**).

Bakry et al. (2011) ont décrit pour la première fois l'activité molluscicide importante des extraits éthanoïques de *Artemisia judaïca* L. contre les escargots d'eau douce (*Biomphalaria alexandrina*) hôtes intermédiaires porteurs des parasites (vers plats) *Schistosoma mansoni miracidia* causant la schistosomiase humaine. De même, **Abd-Elhady (2012)** a montré que l'huile essentielle de *A. judaïca* L. possède un pouvoir fumigatif et un effet insecticide répulsif fort sur *Callosobruchus maculatus*.

Al-Shamaony et al. (1994) ont rapporté l'effet hypoglycémique de *Artemisia herba alba*. En effet, l'alimentation des rats et des lapins diabétiques avec 0.39 g/kg de

poids corporel de l'extrait aqueux des parties aériennes de la plante pendant 2-4 semaines a montré une réduction significative du niveau de glucose dans le sang.

L'étude réalisée par **Benmansour et al. (2016)** indique que l'espèce *Artemisia judaïca* L. subsp.. *Sahariensis* a été utilisée dans la médecine populaire algérienne comme vermifuge, agent stomacal, sédatif, diarrhéique, analeptique et antispasmodique et comme condiment dans la cuisine régionale. Cette étude rapporte que l'huile essentielle de *Artemisia judaïca* L.subsp. *sahariensis* possède un excellent effet inhibiteur sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (leur CMI est de 8,75 µg/ (ml).

L'activité anti-inflammatoire et antioxydante de l'huile essentielle de *Artemisia judaïca* L. est rapportée par **Mohammed et al. (2022)**.

1.2.3.5. Composition chimique

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Artemisia judaïca* L. subsp.. *sahariensis* a fait l'objet de quelques travaux permettant d'avancer l'existence de différentes molécules chimiques. En Egypte, **Al Gaby et al. (2000)** ont étudié l'huile essentielle et ils ont trouvé que le composé majoritaire est le camphre (37,3 %) suivi par le pipéritone (27,4 %). D'autres travaux réalisés par **El-massry et al. (2002)** dans le nord de l'Egypte ont permis de détecter 25 composés dont le composé majoritaire est le pipéritone (45%) suivi par trans-éthyle cinnamate (20,8 %) et éthyle-3-phényle propionate (11%), les autres composés sont spathuléol (6,27%), cis éthyle cinnamate (5,64%), 2,6-diméthyle phénol (1,39 %), méthyle cinnamate (1,06 %) et camphre (0,38%). Ces constituants présentent une bonne activité contre *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. et *Microsporum* spp.

En Algérie, **Dob et Chelghoum (2006)** ont étudié l'huile essentielle de *Artemisia judaïca* L.subsp.. *sahariensis* dans la région d'In Aménas et ils ont détecté 62 composés dont le composé majoritaire est le pipéritone (61,9 %) suivi par le terpinène4-ol (4,6 %) et le bornyl acétate (3 %). D'autres constituants sont le caryophyllène, l'acétate de bornyle, le bornéol, le p-cymène, le b-pinène, lecamphène, le myrcène, le thymol et le nérolidol.

Par ailleurs, **Benmansour et al. (2016)** ont effectué l'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Artemisia judaïca* L. par CPG/SM ce qui a permis d'identifier 41 composés, dont le composé majoritaire est le pipéritone (74.3%), accompagné d'autres constituants avec des teneurs relativement faibles : davana l'éther (3%), spathuléol (2%), α -terpinéol (1.08%) et cis-chrysanthénol (1.05%).

2. Stress oxydant, radicaux libres, antioxydants et métabolites secondaires

2.1. Stress oxydant

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces oxygénées réactives (EOR) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (**Morel et Barouki, 1999**). Toute personne ne possède pas le même potentiel antioxydant qu'une autre car ce potentiel varie selon son mode de vie, ses habitudes alimentaires, l'environnement dans lequel elle vit ou ses caractéristiques génétiques (**Diallo et al., 2001**). L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire et du mécanisme par lequel la sévérité de l'effort oxydant est imposée (**Aruoma, 1999**).

2.1.1. Origine du stress

Le stress oxydatif est une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle la génération d'oxydants affecte le système de défense antioxydants, soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (**Sorg, 2004**). Ce déséquilibre peut avoir plusieurs origines, comme un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques), le dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (**Halliwell et Whiteman, 2004; Valko et al., 2007**), la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules, l'activation de systèmes enzymatiques, la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire (**Pincemail et al., 2002; Sorg, 2004; Koehilin-Ramonatxo, 2006**).

2.1.2. Les conséquences du stress oxydant

Le stress oxydant engendre des perturbations biologiques ainsi que de nombreuses anomalies pathologiques : la baisse de la fluidité des membranes, les anomalies de récepteurs, la diminution de la sensibilité à l'insuline. Les lipides, notamment les acides gras polyinsaturés, sont particulièrement sensibles aux EOR, ce qui explique l'effet délétère de ces espèces chimiques hautement réactives sur la structure des membranes cellulaires (**Wolfe et al., 1994**). Les EOR altèrent aussi la fonction des protéines en réagissant avec différents acides aminés des chaînes de protéine: l'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut

également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affectent les antigénicités et leurs activités (**Martinez-Cayuela, 1995; Sorg, 2004; Valko et al., 2007**). De même, la dénaturation des acides aminés peut entraîner la diminution d'expression, le dysfonctionnement ou l'inactivation d'enzymes (**Goetz et Luch, 2008**).

Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (**Jung et al., 2007**). Les EOR agissent également au niveau de l'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial. Ces derniers peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques qui le constituent. Grâce aux ions métalliques (fer, cuivre) transportés dans le noyau par les lysosomes, le peroxyde d'hydrogène peut conduire à la production de radicaux provoquant l'oxydation et l'altération des molécules d'ADN et pouvant entraîner mutagénèse et cancer (**Goetz et Luch, 2008**).

2.1.3. Les maladies liées au stress oxydant

De nombreuses théories ont montré que le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène ainsi que ses métabolites augmente le stress oxydant induisant ainsi de nombreuses pathologies et maladies (**Favier, 2003**); ces dernières apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (**Pincemail et al., 2002; Sohal et al., 2002**).

2.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des éléments chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électrons libres non appariés sur leurs couches externes, ils peuvent se former quand l'oxygène interagit avec certaines molécules (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de l'électron libre à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta,**

2003; Vansant, 2004). Ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente (Delattre et al., 2007).

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants et ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

2.2.1. Principaux radicaux libres et leurs origines

La production de radicaux chez les organismes vivants est un phénomène normal, régulé par le biais de divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification. Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, on peut distinguer :

- **Les radicaux primaires** : ils jouent un rôle particulier en physiologie, ils dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron, plusieurs exemples peuvent être cités (Favier, 2003) :

- **Le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)** : c'est la molécule d'oxygène qui, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde qui intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions (Bonfont-Rousselot et al., 2003).
- **Le radical hydroxyle (OH^{\bullet})** : il est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite (Favier, 2003).
- **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)** : il se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde qui est catalysée principalement par la superoxyde dismutase (SOD) (Milane, 2004).
- **L'oxygène singulet (O_2^{\bullet})** : c'est une forme excitée d'oxygène hautement oxydative qui résulte du métabolisme des prostaglandines, il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, mais aussi par la réaction entre divers EOR, en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur comme la porphyrine (Sorg, 2004).
- **Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet})** : il est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine. Cette réaction est catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Sorg, 2004 ; Delattre et al., 2007).

- **Les radicaux secondaires** : ils se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

2.2.2. Rôles des radicaux libres

Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme. En effet, ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à l'apoptose des cellules tumorales, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la régulation des gènes, à la régulation de la dilatation capillaire (**Favier, 2003**), à la production énergétique ainsi qu'au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (**Ardestani et Yazdanparast, 2007**).

2.3. Antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de neutraliser la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs, ils permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. (**Vansant, 2004**).

2.3.1. Différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être naturels ou synthétiques. Ils sont naturellement présents dans presque toutes les plantes, tous les microorganismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, ils peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle, les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles (**Pelli et Lyly, 2003**).

2.3.2. Modes d'action des antioxydants

D'après **Coen (2004)**, les modes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- l'inhibition des enzymes.
- le piégeage direct des ERO en stoppant la réaction en chaîne qui préside à leur multiplication.

-l'absorption de l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur.

-la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO, ce qui a pour effet de ralentir les réactions de Fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer ferreux avec le peroxyde d'hydrogène selon une réaction d'oxydo-réduction).

2.3.3. Source des antioxydants

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante. Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories:

2.3.1.1. Antioxydants endogènes

- **Défenses enzymatiques** : les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères, ainsi que chez les plantes constituent la première ligne de défense en participant à la neutralisation excédentaire en radicaux libres (Mates et al., 1999 ; Sharma et al., 2012).

Selon Lehucher-Michelet al. (2001) cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), de catalase (métabolise H_2O_2), de glutathion peroxydase (action réductrice sur H_2O_2) et assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH.

- **Défenses non enzymatiques** : les antioxydants non-enzymatiques assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin des séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique) (Rolland, 2004). La plupart de ces composés ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.

2.3.1.2. Antioxydants exogènes

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

2.3.1.2.1. Nutriments : au sein de ce groupe, il y a une distinction entre les nutriments classiques (peptides et acides aminés, vitamines E et C) et les composants bioactifs (flavonoïdes, caroténoïdes).

- **Vitamine C (acide ascorbique)** : c'est un puissant réducteur largement répandu dans les fruits (**Vansant, 2004**). Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (**Diallo et al., 2001**).
- **Vitamine E (tocophérol)** : c'est un antioxydant important qui prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes (**Diallo et al., 2001**), protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et, par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement et la diminution de l'athérosclérose (**Maydani, 2000**). La vitamine E est présente surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines (**Vansant, 2004**).
- **β-carotène**: c'est un composé phytochimique très important que l'on trouve dans les légumes et fruits, également dans le lait. Il empêche les dommages génétiques, protège contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêche l'expression des oncogènes et, outre l'activité pro vitaminique A, il possède la capacité de capter l'oxygène singulet (**Hale, 2003; Diallo et al., 2001**).
- **Caroténoïdes**: ce sont un groupe de plusieurs centaines de substances naturelles jouant le rôle de pigments de couleurs jaune à rouge dans beaucoup de fruits et de légumes. On en distingue deux groupes majeurs: les xanthophylles qui sont des caroténoïdes porteurs de substituants oxygénés (la lutéine, la zéaxanthine et la cryptoxanthine) et les carotènes dépourvus d'oxygène (l'α- et le β-carotène, le lycopène) (**Roberfroid, 2002**).
- **Flavonoïdes** : ce sont des piègeurs de radicaux libres. Ils réagissent avec ces derniers, empêchant les dégradations liées à leur intense réactivité au niveau des phospholipides membranaires (**Bruneton, 2016**).
- **Tanins**: ce sont des piègeurs de radicaux libres, des inhibiteurs de la formation de l'ion superoxyde (**Bruneton, 2016**).
- **Acides phénoliques** : possèdent des activités antioxydantes et antiradicalaires (Cavin, 1999).
- **Xanthonnes**: agissent par inhibition envers la peroxydation des lipides et possède des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions superoxydes.
- **Coumarines**: empêchent la peroxydation des lipides membranaires ; ce sont des capteurs de radicaux hydroxydes, superoxydes et peroxydes.
- **Lignanes et quinones**: possèdent des propriétés antioxydantes (**Allain, 1996**).

- **Glutathion:** un antioxydant peut devenir à tout moment un agent prooxydant s'il n'est pas régénéré rapidement sous sa forme initiale. Ainsi le glutathion joue un rôle unique et essentiel dans le maintien des propriétés antioxydantes de différents antioxydants (**Mates et al., 1999 ; Sharma et al., 2012**) .

2.3.1.2.2. Médicaments : ils constituent une source importante d'antioxydants. Plusieurs classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés anti-oxydantes (**Vansant, 2004**).

2.4. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes (**Lutge et al., 2002; Marouf et Reynaud, 2007**). On les retrouve dans des compartiments particuliers ou à des moments précis de la vie. Ils permettent la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température, etc.). Ils participent à la vie de la plante et ont des rôles très variés. Ils peuvent servir de défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques (pollinisateurs). Leur rôle dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies cryptogamiques, aux infections bactériennes et à certains insectes) (**Raven et al., 2000**).

Les métabolites secondaires appartiennent à trois grandes familles: les composés aromatiques ou polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, banthocyanidines, tanins, les quinones), les terpénoïdes (et leurs dérivés) et les alcaloïdes (**Pratt et Cornely, 2019**).

2.4.1. Les composés phénoliques ou polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que: éther, ester, hétéroside (**Bruneton, 2016**). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**). C'est une classe qui renferme une très grande diversité de composés possédant une très large gamme d'activités en biologie dont les principaux groupes chimiques sont :

- **Flavonoïdes:** le terme «flavonoïde» désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols contenus sous forme de dérivés glucosidiques dans de nombreux fruits et légumes (**Seyoum et al., 2006**). Ils sont considérés comme les pigments quasi universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont, entre autres et pour certains, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Macheix et al., 2005; Bruneton, 2016**). Ils ont une origine biosynthétique commune et, par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques (**Bruneton, 2016**).
- **Tanins :** ce sont des composés phénoliques à haut degré de polymérisation, solubles dans l'eau, de poids moléculaire élevé (500 et 3000 Dalton) (**Pratt et Cornely , 2019**) ils inhibent la peroxydation lipidique, ce sont des piègeurs de radicaux libres, des inhibiteurs de la formation de l'ion superoxyde (**Bruneton, 2016**). Toutes les plantes en contiennent à un degré plus ou moins élevé. Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation. Des radicaux tanins plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Cavin, 1999**). En raison de leur structure et de leurs propriétés chimiques, on distingue deux classes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Pratt et Cornely, 2019**).
- **Acides phénoliques :** ce sont des composés solubles dans les solvants organiques polaires et sont divisés en 3 groupes: les acides phénols simples comme les composés hydroquinones qui se trouvent au niveau de plusieurs familles végétales; les acides benzoïques qui peuvent exister soit à l'état libre, soit liés à des glucides ou des esters comme l'acide gallique; le troisième groupe est représenté par les acides cinnamiques qui sont très fréquents, comme l'acide caféique et l'acide férulique (**Bruneton, 2016**).

2.4.2. Les terpènes : ce sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou non (acyclique, monocyclique, bicyclique ou tricyclique) résultant de la combinaison de plusieurs unités d'isoprènes (**Pratt et Cornely, 2019**).

2.4.3. Les alcaloïdes : ce sont des substances naturelles organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur

structure chimique, avec un degré variable de caractère basique (**Harborne et al., 1999**).

3. Évaluation des activités biologiques des extraits de plantes

Une panoplie de tests a été proposée afin d'évaluer les différentes activités biologiques des composés phénoliques.

3.1. Activités antioxydantes

De nombreuses plantes médicinales contiennent de grandes quantités de composés antioxydants qui pourraient être isolés et utilisés comme antioxydants pour la prévention et le traitement des troubles liés aux radicaux libres. La capacité antioxydante est influencée par plusieurs facteurs et, par conséquent, ne peut pas être entièrement décrite avec une seule méthode (**Li et al., 2011**). De nombreux tests ont été développés pour évaluer l'activité antioxydante. La méthode utilisée est associée aux transferts des électrons ou au piégeage des radicaux libres tels que l'activité antioxydante totale (la CAT), les tests DPPH, ABTS, FRAP, ainsi que l'inhibition de blanchiment du β -carotène (associé à la peroxydation des lipides) (**Li et al., 2011**).

3.1.1. Estimation de l'activité antioxydante totale

Elle repose sur la détermination d'une concentration conférant l'efficacité à un extrait donné. Cette méthode est quantitative (**Prieto et al., 1999**) et consiste à réduire les ions $Mo6+$ en $Mo5+$ par les extraits de la plante ainsi que la formation du complexe (phosphate / $Mo5+$) de couleur verte à un pH acide. L'absorbance est mesurée à 695 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La capacité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/ g-1 ES).

3.1.2. Activité antiradicalaire contre le DPPH

L'estimation de cette activité se fait par l'utilisation d'un radical de synthèse le 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) qui se transforme en DPPH-H non radicalaire par le transfert d'un hydrogène en présence d'antioxydants dans les extraits de la plante (**Öztürk et al., 2007**). Cet essai permet d'évaluer cette capacité antiradicalaire par la méthode spectrophotométrique en suivant la cinétique de la réaction d'inhibition.

3.1.3. Activité antiradicalaire contre l'ABTS^{•+}

Cette méthode introduite par **Rice-Evans et Miller (1997)** est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Le radical cation ABTS^{•+} est obtenu en mélangeant l'ABTS avec un oxydant (généralement le persulfate de potassium) qui donne une solution d'une couleur bleu vert intense (**Huang et al., 2005**). L'addition d'antioxydants réduit ce radical qui devient incolore. L'importance de cette décoloration est proportionnelle au pourcentage d'inhibition d'ABTS^{•+} ce qui traduit la capacité antiradicalaire de ces antioxydants. L'expression de cette activité se fait par rapport à un antioxydant de référence (**Zhao et al., 2006**).

3.1.4. Capacité réductrice du fer

Elle est basée sur la réaction d'oxydoréduction qui se passe entre les antioxydants (donneur d'électrons) des extraits de plantes et les ions Fe³⁺ (accepteur d'électrons). Le potassium hexacyanoferrate (III) (K₃Fe(CN)₆) fournit les ions Fe³⁺ qui sont réduits en Fe²⁺ en acceptant un électron cédé par les antioxydants (**Huang et al., 2005**). Cette méthode permet l'estimation du pouvoir réducteur par un suivi de la cinétique de réduction par spectrophotométrie.

3.1.5. Capacité d'inhiber le blanchiment de la β-carotène

En absence d'antioxydants, la β-carotène subit une décoloration rapide en présence d'acides gras ou de lipides ; par contre, en présence d'antioxydants, notamment les composés phénoliques, on peut limiter la destruction de la β-carotène par la neutralisation des radicaux formés par le système β-carotène-linoléate (**Kamath et Rajini, 2007**). La cinétique de dégradation de la β-carotène renseigne sur l'aptitude de l'extrait à inhiber le blanchiment de cette molécule et est déterminée par un dosage colorimétrique. Plus la couleur de la solution est intense plus la capacité antioxydante de l'extrait est importante.

3.2. Activité enzymatique

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme acétylcholine hydrolase ayant une activité estérase. L'AChE met fin aux impulsions nerveuses en catalysant l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh). L'inhibition de l'enzyme AChE par des inhibiteurs spécifiques est la cible thérapeutique pour le traitement de troubles tels que la maladie d'Alzheimer. Un grand nombre de flavonoïdes ont été isolés à partir de plantes, dont certains sont testés

pour leur potentiel d'inhibition possible de l'ACHÉ (Uriarte-Pueyo et Calvo, 2018 ; Kim et Lee, 2018).

3.3. Activité antimicrobienne

L'homme est tout le temps en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes, de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise.

Les polyphénols, notamment les flavonoïdes et les tanins, sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

3.3.1. Méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne

La méthode de diffusion solide des disques est la plus utilisée pour estimer l'activité antimicrobienne *in vitro* des composés naturels à partir d'extraits de plantes sur des agents pathogènes (Singh et al., 2006). Cette technique consiste à incuber différentes souches de bactéries et de levures en ajoutant des extraits de plantes à différentes concentrations. L'effet de ces extraits de plantes est déterminé par l'apparition des plages de lyse qui résultent de l'inhibition de la multiplication de ces bactéries et de ces levures. Ces activités sont comparées à celles des antibiotiques comme témoins positifs (Singh et al., 2006).

3.3.2. Mécanismes d'action et de résistance des agents antimicrobiens

Les agents antibactériens sont classés selon leurs cibles bactériennes. Il s'agit de cinq mécanismes (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999): le blocage de la synthèse de la paroi bactérienne, l'inhibition de la synthèse des protéines, l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'altération du fonctionnement de la membrane cytoplasmique et une inhibition de la synthèse de divers métabolites.

Les principales substances antimicrobiennes sont :

- **Les antibiotiques** : ce sont « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (Prescott et al., 2018). Leur action est spécifique et dirigée contre les micro-

organismes. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur leurs usages qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1999**).

- **Les composés phénoliques** : plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des polyphénols. Les polyphénols, notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes et ceci peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

CHAPITRE 2 :
MATERIEL ET METHODES

1. Récolte du matériel végétal et extraction

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles du Sahara algérien, et plus particulièrement les plantes médicinales, nous nous sommes intéressés à deux plantes à usages thérapeutiques *Thymeleae microphylla* de la famille des Thymelacées et *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* L.de la famille des Astéracées. Pour cela, il est important de connaître leur composition chimique et rechercher leurs activités biologiques.

1.1. Origine géographique et période de récolte

Les espèces sélectionnées ont été récoltées dans deux stations différentes du Sahara : Ain Safra et Tamanrasset (**Tableau 3**), elles ont été identifiées par Mr Marouf Abderrazak, Professeur au centre universitaire Salhi Ahmed de Naâma et Dc. Sahki Rabéa, chercheur à l'institut national de recherche forestière (INRF) de Tamanrasset. Une mission a été organisée par le laboratoire LRZA en 2014 pour la récolte d'informations sur l'utilisation de *Artemisia* par la population locale, auprès des herboristes de la région et auprès des chercheurs de l'INRF ayant effectué des enquêtes ethnobotaniques sur les plantes médicinales de la wilaya de Tamanrasset

Le choix de ces stations a été basé sur des critères écologiques (climat, sol, précipitations et altitude), ces derniers ont une influence sur le développement des plantes, sur la variabilité ainsi que les pouvoirs biologiques des composés sur lesquelles nous avons focalisé notre étude.

Tableau 3. Paramètres géographiques et bioclimatiques des stations de récolte.

Plantes	Stations	Période de récolte	Parties étudiées	Longitude	Latitude	Altitude	Étage bioclimatique
<i>Thymelaea microphylla</i>	Ain Sefra (w.Naâma)	Mars 2015	Parties aériennes	32°46' 01'' nord	3°43'05''Est	1087m	Aride à hiver frais
<i>Artemisia judaica</i>	Oued Amsel (w.Tamanrasset)	Mars 2014	Parties aériennes	22°40' 38'' nord	5°31'238''Est	1266m	Saharien à hiver doux

1.2. Extractions

1.2.1. Préparation des extraits bruts

Le matériel végétal récolté est séché à l'étuve à une température de 40°C, puis broyé en poudre fine à l'aide d'un broyeur à billes. Les poudres récupérées sont conservées dans des flacons en verre hermétiquement fermés en attendant de procéder aux différentes manipulations.

1.2.2. Extraction par des solvants de polarité croissante

La méthode choisie consiste en une extraction par macération dans des solvants à polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol). Elle permet donc un épuisement successif de la matière végétale et d'extraire le maximum de métabolites secondaires de natures différentes. 250 g de poudre végétale ont été mises à macérer dans 1500 ml de solution d'hexane à l'abri de la lumière à température ambiante. Le mélange est agité régulièrement afin d'assurer le contact du solvant avec la totalité du matériel végétal. Cette macération est répétée 2 fois après filtration et renouvellement du solvant chaque 24 h. L'extrait hexanique (HEX) est évaporé à 40 °C par un évaporateur rotatif. L'extraction est répétée successivement de la même manière avec le dichlorométhane (DCM), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le méthanol (MeOH) sur le même matériel végétal. On obtient à la fin du procédé d'extraction quatre extraits nommés: **HEX, DCM, AcOEt et MeOH.**

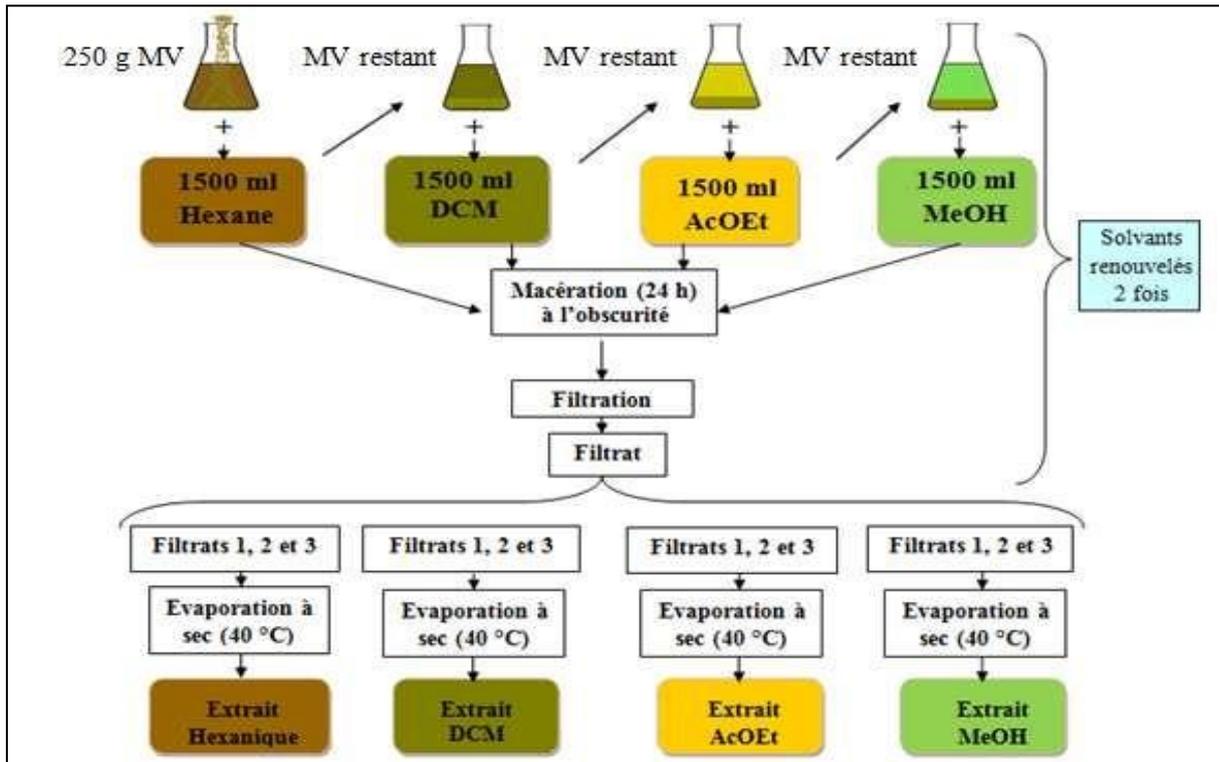


Figure 3 : Extraction des métabolites végétaux par des solvants à polarité croissante.

MV: matériel végétal (*Artemisia judaica*, *Thymelaea microphylla*).

1.2.3. Extraction sous reflux par l'eau distillée

L'extrait aqueux est préparé à partir de l'extraction liquide-solide de 5 g de matériel végétal sec en présence de 50 ml d'eau distillée, sous reflux et à chaud pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration avec un papier filtre Whatman 40, l'extraction est renouvelée 2 fois sur le même matériel végétal, suivie d'une centrifugation à 4000 T/min pendant 30 min pour éliminer les particules insolubles. Les extraits récupérés sont lyophilisés pendant 3 jours dans un ballon de 100 ml puis congelés à -20 °C. L'extrait aqueux poudreux obtenu est nommé **H2O**.

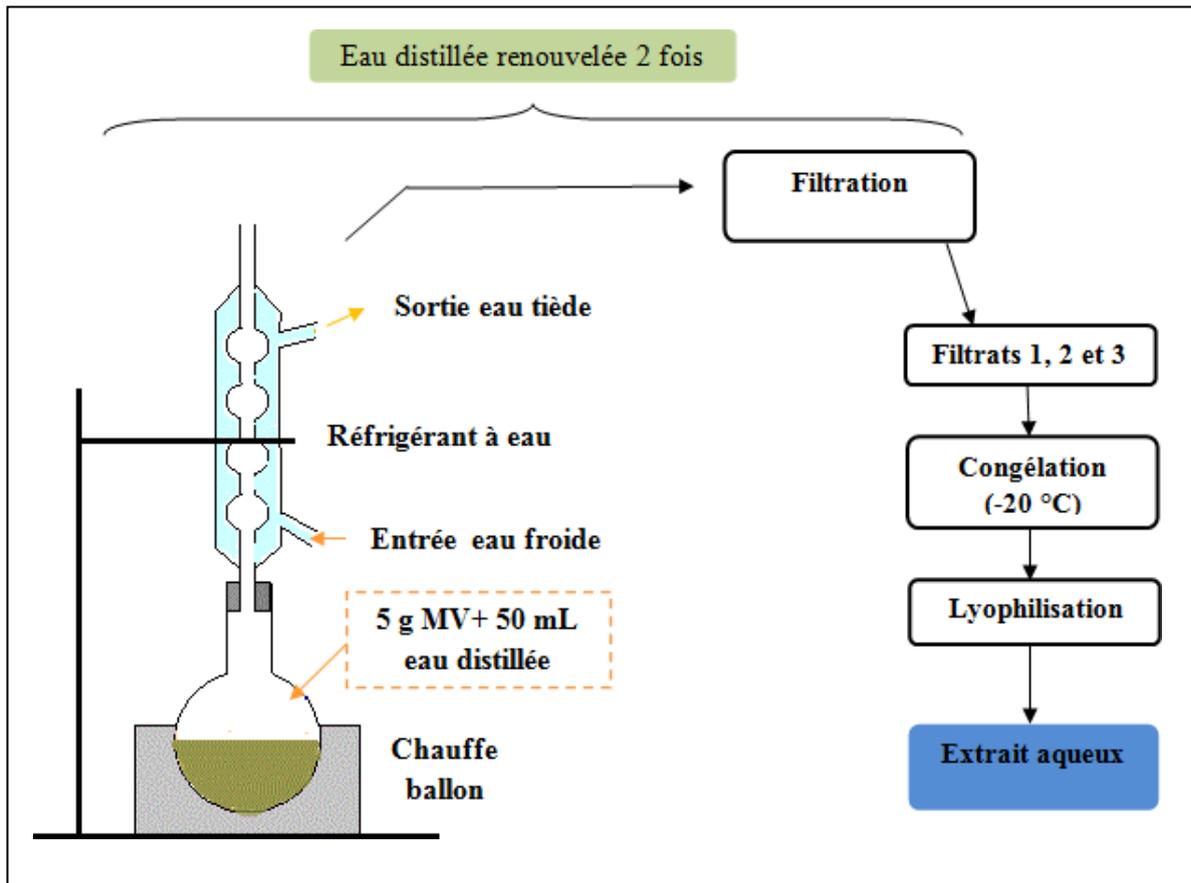


Figure 4 : Extraction sous reflux par l'eau distillée.

MV: matériel végétal (*Artemisia judaica*, *Thymelaea microphylla*).

2. Screening phytochimique des extraits

2.1. Mise en évidence des métabolites secondaires en tubes à essai

Afin de déterminer de façon préliminaire les groupes phytochimiques présents dans les plantes analysées, des tests en tube sont réalisés. Il s'agit d'une étude qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation et des examens en lumière ultraviolette. Le **tableau 4** indique les différentes classes phytochimiques recherchées et les réactifs spécifiques utilisés.

Tableau 4. Réactions de caractérisation du screening phytochimique d'après **Wagner et Bladt (1996)**.

Molécules chimiques	Réactifs et résultats positifs
Flavonoïdes	Réaction à la cyanidine : coloration orangée ; rouge ou Violette
Tanins	FeCl ₃ : coloration bleu foncée, verte ou noire
Alcaloïdes	Mayer (Iodomercurate de potassium) : précipité blanc jaunâtre Dragendorff (Iodobismuthate) : Précipité jaune orangé
Coumarines	NH ₄ OH (25%) : fluorescence sous lumière UV
Sesquiterpènes lactones	Lieberman-Burchard (anhydre acétique H ₂ SO ₄) : coloration violette bleue ou verte
Saponines	Détermination de l'indice de mousse : test positif si IM >100 Komarowsky : précipité grisâtre
Glucosides anthracéniques	SbCl ₃ : variable selon les composés

2.2. Analyse chromatographique des métabolites secondaires

2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour identifier les familles moléculaires présentes dans les extraits, nous avons effectué un criblage phytochimique par chromatographie sur couche mince (CCM). C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption employés dans l'analyse des extraits et permet de vérifier la présence ou l'absence d'une classe phytochimique par des révélateurs spécifiques aux familles moléculaires.

➤ Analyse des flavonoïdes et des acides phénoliques

Le protocole utilisé est basé sur la méthode de **Martson (2011)**. L'analyse est réalisée sur plaque en gel de silice (Merck, TLC silica gel 60 F254) comme phase stationnaire. Une quantité de chaque extrait (250 µg) ou témoin (10 µg) est déposée sous forme de trait à l'aide d'une seringue Hamilton sur les plaques de CCM. La liste des témoins est donnée dans le **tableau 5**.

Le développement de la plaque s'effectue dans une cuve en verre contenant l'éluant approprié.

Tableau 5. Liste des témoins utilisés pour les flavonoïdes et les acides phénoliques.

Numérotation	Témoins
11	Acide 4-hydroxy benzoïque
12	Acide caféique
13	Acide chlorogénique
14	Acide cinnamique
15	Acide <i>p</i> -coumarique
16	Acide ellagique
17	Acide trans-férrulique
18	Acide gallique
19	Acide sinapique
20	Acide syringique
21	Acide vanillique
22	Catéchine
23	Chrysine
24	Flavane
25	Flavanone
26	Hespérétine
27	Naringinine
28	Quercétine
29	Rutine

Les CCM sont analysées en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés. Dans notre cas, nous avons utilisés différents systèmes révélateurs afin d'identifier des composés polaires et apolaires (**tableau 7**). Le rapport frontal (Rf) (Rate factor) des spots issus de la séparation, correspond à la distance parcourue par le composé sur celle parcourue par l'éluant (phase mobile). Ainsi un Rf est caractéristique de la migration faible ou forte d'une molécule par rapport à la ligne de dépôt, il est compris entre 0 et 1. Les caractéristiques des métabolites secondaires sont mentionnées dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Caractéristiques des métabolites secondaires (Wagner et Blatt, 1996).

Phytoconstituants	Avant révélation		Après révélation	
	Quenching à 254 nm	Fluorescence à 365 nm	Couleur visible	Fluorescence à 365 nm
Acides phénoliques libres	+	Bleu	Bleu-noir	Intensification de la fluorescence à 365 nm
Flavonoïdes	+	Jaune foncé, orange, vert ou bleue marron.	-	Rouge, orange, jaune, jaune- orange, jaune- verdâtre, violette, bleue, orange marron.

Tableau 7. Systèmes de migration et réactifs utilisés pour la révélation des flavonoïdes et des acides phénoliques.

Phytoconstituants	Systèmes de migration	Réactif
Flavonoïdes	S1 : AcOEt-HCOOH-AcOH-H2O (100 : 11 : 11 : 26)	Neu
	S2 : AcOEt-MeOH-H2O (100 : 13,5 : 10)	
Acides phénoliques	S1 : AcOEt-HCOOH-AcOH-H2O (100 : 11 : 11 : 26)	
	S2 : AcOEt-MeOH-H2O (100 : 13,5 : 10)	

2.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV visible à barrettes de diodes (HPLC-DAD-UV)

L'analyse a été réalisée au laboratoire des plantes extrémophiles (LPE) de Borj Cédria (Tunisie).

Principe : la chromatographie liquide à haute performance est caractérisée par sa haute sensibilité et affinité qui permettent l'identification des composés de faible poids moléculaire. Elle consiste en premier lieu en une étape de séparation qui se fait grâce à la phase mobile qui est constituée de mélange des solvants de polarités différentes. Cette phase est établie selon un gradient de concentrations de ces solvants pendant une durée de temps donnée. Après cette séparation, les composés sont sélectionnés par leur temps de rétention. Ces deux propriétés de séparation et de sélection de la chromatographie permettent la sortie des composés bien déterminés (selon la variation de la polarité de mélange) correspondant à leurs temps de rétention bien défini. La sortie de ces composés se fait selon un gradient de polarité en phase reverse, de composé moins polaire vers le composé le plus polaire.

Conditions opératoires : la CLHP analytique Agilent est équipée d'un auto-injecteur 1100, une pompe Prostar 1100, un détecteur à barrettes diodes 1100, une colonne C18 (250 mm x ProntoSIL 4,0 mm. 5 µm. Bischoff).

La phase mobile est constituée par un mélange eau et acide trifluoroacétique (TFA) à 0,025% (solvant A) et de l'acétonitrile (solvant B). L'échantillon est dissous dans MeOH/H₂O (1:1) puis filtré à travers un filtre Millipore 0,45 µm. Le programme d'élution utilisé est décrit dans le **tableau 8**. Le volume de l'injection est de 25 µl et les pics sont examinés à 280 nm et identifiés par les temps de retentions comparés à ceux des témoins purs. Pour chaque analyse trois répétitions sont effectuées. Une gamme de 30 standards a été utilisée, elle est composée d'acides phénoliques et de flavonoïdes (**Annexe1**).

Tableau 8. Programme (temps en minutes, débit et gradient de solvant) utilisé en HPLC analytique pour l'injection des différents extraits et standard.

Temps	A %	B%	Débit
6	35%	65 %	0.7 ml/ min
9	60%	40%	0.7 ml/ min
14	80%	20%	0.7 ml/ min
25	100%	0%	0.7 ml/ min
30	35%	65%	0,7ml/ min

3. Dosage des métabolites secondaires par spectrophotométrie (UV-visible)

Notre choix s'est basé essentiellement sur les extraits : acétate d'éthyle, méthanol et aqueux des deux plantes, car les extraits hexaniques et dichlorométhaniques sont uniquement une étape de délipidation.

Les polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins attribuent aux plantes la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Pour cette raison, ces substances ont été choisies pour des analyses quantitatives qui sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage exprimées en mg équivalent par g de la matière végétale sèche.

3.1. Dosage des polyphénols totaux

L'analyse quantitative des polyphénols totaux est réalisée par un dosage spectrophotométrique selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Le réactif utilisé est celui de Folin-Ciocalteu: un mélange complexe des acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Le principe de ce dosage est basé sur l'oxydation des composés phénoliques qui entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue. Les polyphénols présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à leur quantité présente dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**).

Dans des tubes à essai, on additionne à 40 μ L de l'échantillon (10 mg/mL dans le MeOH), 2400 μ L d'eau distillée et 200 μ L de réactif de Folin Ciocalteu (Sigma). On agite et on laisse à l'obscurité pendant 5 min à température ambiante, ensuite on ajoute 600 μ L d'une solution de Na_2CO_3 (20 % dans l'eau distillée) et 760 μ L eau distillée. Après agitation et repos à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante, la couleur jaune du réactif vire au bleu. Les dosages sont réalisés en triplicata. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre UV-visible (2120 UV Optizen) à 760 nm en utilisant des cuves en plastiques jetables. La quantification des polyphénols est faite au moyen d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de différentes concentrations d'acide gallique (Sigma) (5 - 10 - 15- 20 et 25 μ g/ml, concentrations finales) à partir d'une solution mère d'acide gallique de 0,5 mg/mL (dans le MeOH). Cette courbe est réalisée dans les mêmes conditions opératoire Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/g ES). Le blanc est préparé en remplaçant l'échantillon par le MeOH, en gardant les mêmes conditions que les échantillons.

3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

L'analyse quantitative des flavonoïdes est réalisée par un dosage spectrophotométrique selon la méthode décrite par **Kim et al. (2003)**. Les extraits sont préparés dans le méthanol pour une concentration de 10mg/ml.

Dans des tubes à essai, 100 μ L de l'échantillon (10 mg/mL dans le MeOH) sont mélangés à 240 μ L d'eau distillée. À $t = 0$ min, on ajoute 30 μ L d'une solution de NaNO₂ (5 % dans l'eau distillée), à $t = 5$ min on ajoute 30 μ L d'une solution de AlCl₃ (10 % dans l'eau distillée), à $t = 6$ min on ajoute 200 μ L de NaOH (1 M dans l'eau distillée), puis on mélange au vortex. Les dosages sont réalisés en triplicata. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre à 510 nm en utilisant des cuves en plastiques jetables. Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) est réalisée par la catéchine (Sigma) (0,5 mg/ml dans le MeOH) à différentes concentrations (5, 15, 25, 35, 45, 55 μ g/ml) dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons. Les moyennes des teneurs en flavonoïdes sont exprimées en μ g d'équivalent de catéchine par mg du poids sec de l'extrait (μ g EC/mg ES). Le blanc est préparé en remplaçant l'échantillon par le MeOH, dans les mêmes conditions.

3.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés dans les extraits des deux plantes est effectué selon la méthode de **Sun et al. (1998)**. Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500 nm.

Pour 400 μ l de chaque extrait (10 mg/ml) ou le standard, on ajoute 1000 μ l de vanilline (1% dissout dans le MeOH) et 1000 μ l de H₂SO₄ (25 % dans le MeOH). Une agitation est nécessaire après chaque ajout de réactif. Après 15 min d'incubation à une température de 30°C, l'absorbance est mesurée à 500 nm. La concentration des tanins condensés est déduite à partir de la gamme d'étalonnage de six concentrations: 10, 20, 40, 50, 60, 75 μ g/ml établie avec la catéchine (0,5 mg/ml dans le MeOH). La teneur des tanins condensés est exprimée en μ g d'équivalent de catéchine par mg d'extrait sec (μ g EC/mg ES). Le blanc se prépare dans les mêmes conditions sauf que la vanilline est remplacée par le MeOH.

4. Évaluation *in vitro* des activités biologiques des différents extraits des deux plantes par plusieurs tests

4.1. Évaluation du potentiel antioxydant des extraits

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : piègeurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés (Marc et al., 2004).

4.1.1. Estimation de l'activité antioxydante totale

Cette méthode quantitative consiste à réduire les ions Mo^{6+} en Mo^{5+} par les extraits de la plante ainsi que la formation du complexe (phosphate/ Mo^{5+}) de couleur verte à un pH acide (Prieto et al., 1999).

À 200 μl d'extrait de plante sont ajoutés 2 ml d'une solution à pH acide contenant de l'acide sulfurique (H_2SO_4 0.6M), du phosphate de sodium (NaH_2PO_4 , H_2O 28 mM) et de l'heptamolybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4mM). Le mélange est ensuite incubé à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695nm. L'activité antioxydante totale est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/ g-IES).

4.1.2. Test de l'activité antioxydante au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) par dosage spectrophotométrique

L'activité antioxydante des extraits est mesurée selon la méthode de Cavin et al. (1998) basée sur le DPPH. Dans ce test, le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphénylpicryl hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu (Sanchez-Moreno, 2002).

Dans des tubes à hémolyse et en triplicata, des solutions méthanoliques (5 μL) de chaque échantillon à cinq concentrations différentes sont ajoutées à 915 μL de méthanol, puis 200 μL de solution de DPPH ont été ajoutés (0,022 % dans le méthanol). Après agitation, le mélange est incubé à température ambiante dans l'obscurité et l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée par un spectrophotomètre à 517 nm après 30 min, contre un blanc de méthanol sans DPPH. La solution de DPPH sans extrait est utilisée comme contrôle. L'acide ascorbique, la quercétine et le BHT sont utilisés comme composés de

référence. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (% I) et calculés par l'équation suivante :

$$\% I = 100 \times (\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle}$$

Abs test : Absorbance de la solution de l'extrait ou contrôle positif en présence de DPPH.

Abs contrôle : Absorbance des solutions du contrôle négatif.

Le pourcentage d'activité de piégeage a ensuite été tracé en fonction de la concentration en antioxydants pour obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la solution initiale de DPPH de 50 % (IC50). Pour tous les extraits et témoins positifs, on prépare des solutions dans du méthanol. Ces solutions dites solutions mères à 100 mg/ml et 10 mg/ml respectivement, subiront ensuite des dilutions pour avoir différentes concentrations.

4.1.3. Mesure de l'activité inhibitrice du radical ABTS+

L'estimation de l'activité antiradicalaire repose sur la mesure de la régénération du radical ABTS (2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique)). L'ABTS^{•+} est formé suite à une réaction directe entre le persulfate de potassium et l'ABTS formant le chromophore ABTS^{•+} de couleur bleu verte (Ivanova et al., 2005).

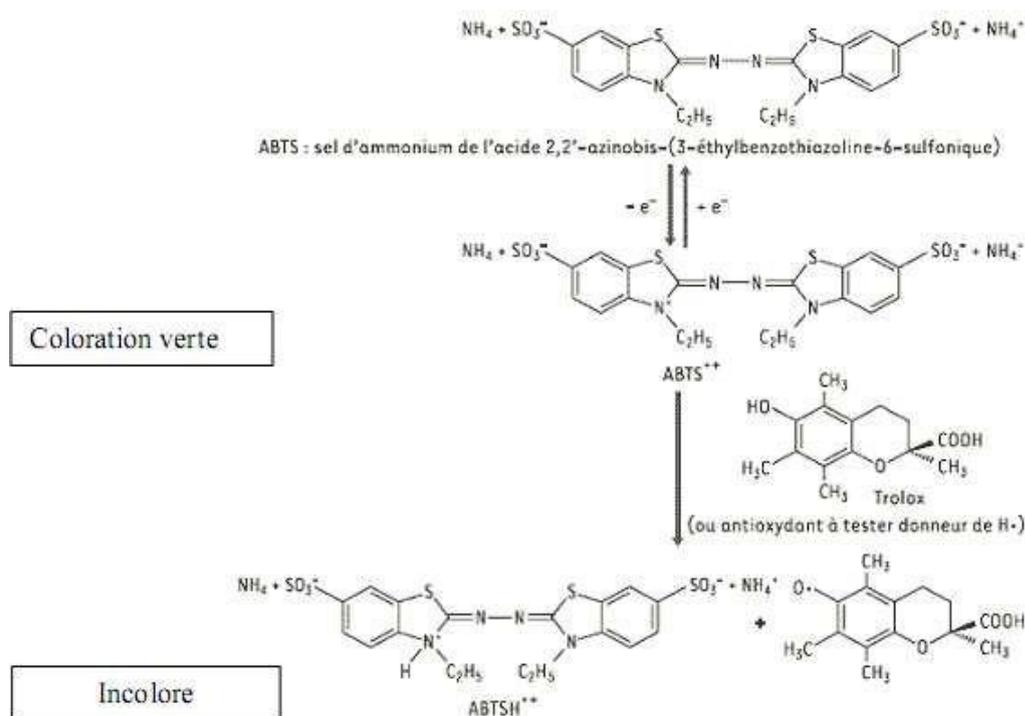


Figure 5 : Génération du radical ABTS^{•+} avec le persulfate de potassium.

L'addition d'un antioxydant à ce radical préformé le réduit en ABTS. Cette réduction se traduit par une décoloration proportionnelle au pourcentage d'inhibition de l'ABTS⁺ et à la concentration de l'antioxydant en question.

La solution d'ABTS formée (7 mM) et de persulfate de potassium (2,45 mM) est gardée à la température ambiante pendant 16 h pour produire le radical (ABTS. ⁺). Cette solution est par la suite diluée avec de l'eau distillée afin d'avoir une absorbance de 0,700 ($\pm 0,02$) à 734 nm. À 1 ml de cette solution, 10 μ l d'extrait végétal ou de témoin positif (Trolox, BHT) sont ajoutés. Après 6 min de repos, l'absorbance est mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre-UV visible, en se référant à un témoin sans extrait. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. L'activité antiradicalaire est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$PI = (DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

DO témoin : absorbance du témoin.

DO extrait : absorbance de la solution d'extrait.

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC₅₀); la valeur de IC₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée, exprimée en μ g/ml-1.

4.1.4. Mesure du pouvoir réducteur du fer

L'activité réductrice est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer ou le cuivre (**Huang et al., 2005**). En effet, le ferricyanure de potassium $FeK_3C_6N_6$ fournit des ions Fe^{3+} qui seront réduits par la capacité antioxydante de l'extrait de plante à céder des électrons :

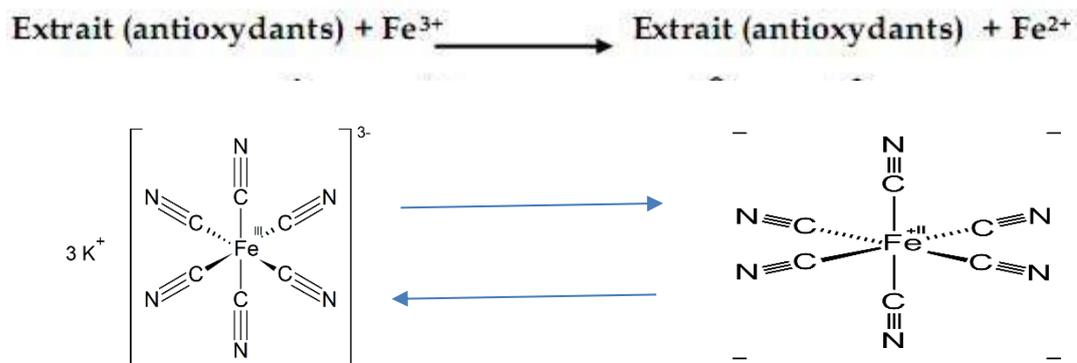


Figure 6 : Mécanisme de formation du complexe Fe^{2+} Ferricyanure.

Mesure de l'activité: le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. Cette méthode consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations (0.05 à 1 mg ml⁻¹) avec 2.5 ml de tampon phosphate (0.2 mol l⁻¹, pH 6.6) et 2.5 ml de FeK₃C₆N₆(1%). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 min à 50° C. Après cette incubation, 2.5 ml de TCA (10%) sont additionnés pour arrêter la réaction, suivie d'une centrifugation à 650 g pendant 10 min à la température ambiante. Au surnageant (2.5ml), 2.5ml d'eau distillée et 0.5ml FeCl₃ (0.1%) sont additionnés. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm (le blanc est le tampon d'extraction). Les résultats sont exprimés en concentration efficace (CE50, µg ml⁻¹), qui est la concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0,5. La valeur de la CE50 est obtenue par interpolation de la courbe de régression linéaire (**Mau et al., 2004**).

À des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés : le BHA et le Trolox. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

4.1.5. Inhibition du blanchiment du β-carotène/ acide linoléique

Dans cette technique, la capacité anti-oxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydroperoxydes conjugués résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (**Tepe et al., 2006**), qui attaquent simultanément le β-carotène et ayant comme résultat le blanchiment du β-carotène et la disparition de sa couleur orange (**Deba, 2008**).

Selon **Kartal et al. (2007)**, **Tepe et al. (2006)** 20mg de β- carotène sont dissous dans 1 ml de chloroforme. La solution du β-carotène-chloroforme est introduite dans un ballon contenant 20mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est complètement évaporé à l'évaporateur rotatif, 100 ml d'eau oxygénée ont été ajoutés lentement avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution, 2.5 ml sont transférés dans des tubes où 350µl de chaque extrait ont été ajoutés (1 mg/ml dans le méthanol). Ce test est réalisé en triplicata. Les tubes à essai sont incubés à l'obscurité à la température du laboratoire. Deux tubes contrôles sont aussi préparés avec la même procédure, l'un contenant un antioxydant de référence BHT (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 µl de méthanol.

L'absorbance est immédiatement mesurée pour le BHT à 490 nm. D'autres lectures sont mesurées à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h et 48h) (**Tepe et al., 2006**).

L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}_{48\text{h}} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{48\text{h}} (\text{BHT})] \times 100$$

AAR: Activité anti-oxydante relative.

Abs_{48h} Echantillon: Absorbance de l'échantillon après 48 heures.

Abs_{48h} BHT: Absorbance du BHT après 48 heures.

4.2. Activité inhibitrice de l'AChE : méthode bioautographique au Fast Blue B

L'activité inhibitrice de l'AChE des extraits bruts est réalisée par bioautographie sur CCM comme décrit par **Mroczek (2009)**. L'AChE (500U, anguille électrique (EC 3.1.1.7, type V-S, poudre lyophilisée, 827 U/mg solide, 1256 U/mg protéine), Sigma) est dissoute dans un tampon tris-HCL50mM, pH7.8 pour faire une solution stock de 1000U/ml qui est ensuite diluée avec du tampon tris-HCL50 mM, pH 7.8 contenant 0.1% BSA (bovin serum albumin) (Sigma) pour obtenir la solution enzymatique de travail à 3U/ml. La solution mère est conservée à -20 °C. Les échantillons sont appliqués à une quantité de 15 µg sur CCM (gel de silice 60, F254 ; feuilles d'aluminium). La galanthamine (Sigma) est déposée à 1 µg sur les plaques comme témoin positif. Après migration des échantillons dans une phase mobile appropriée, contenant en plus 1.5mg/ml du 2-naphtyle acétate (Sigma), les plaques de CCM sont séchées à l'air libre, et sont ensuite pulvérisées avec 3U/ml de la solution enzymatique de travail, soigneusement séchées et incubées pendant 10 min à 37°C dans une atmosphère humide. Par la suite, les plaques sont pulvérisées avec une solution aqueuse de sel Fast Blue B à 1.25mg/ml (Sigma). Un fond violet apparaît après environ 1 min. Les composés actifs apparaissent sous forme de taches claires sur un fond violet

4.3. Évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des différents extraits bruts de la partie aérienne de *Thymellaea microphylla* et *Artemisia judaica*, nous avons testé les extraits des espèces végétales vis-à-vis des souches microbiennes par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI).

4.3.1. Propriétés et mise en culture des germes testés

Pour les tests d'activité antibactérienne, une gamme de six microorganismes pathogènes de collection internationale ATCC (American type culture collection) a été utilisée (**tableau 9**).

Tableau 9. Description et pouvoir pathogène des souches testées.

Espèces	Références	Habitat adéquat	Infections les Plus répandues
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Eau plantes sol matières fécales voies respiratoires	Brûlures septicémies infections pulmonaires et urinaires plaies
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453	Ubiquiste dans l'environnement Eaux polluées, sol et tractus intestinal	Infections des voies urinaires Nosocomiales ou acquises infections des voies respiratoires et cutanées
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Eaux usées matières fécales aliments contaminées	Septicémies infections pulmonaires et urinaires Plaies
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC700603	Voies aériennes supérieurs aliments contaminés	Septicémies infections pulmonaires et urinaires Plaies
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427	Eau sol matières fécales	Infections urinaires et de plaies
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Aliments contaminés poussières nasopharynx peau cheveux air	Septicémies intoxications alimentaires infections cutanées plaies abcès brûlures infections pulmonaires ostéite Endocardites

ATCC: American Type Culture Collection.

Ces souches proviennent du laboratoire bactériologique du groupe Saidal- Alger, Algérie.

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37±1 °C pendant 24 h à 48 h, puisensemencées sur boîtes contenant des milieux sélectifs pour vérifier leur pureté. Après 24 h d'incubation à 37±1 °C, les souches sontensemencées sur bouillon nutritif puis incubées à 37±1 °C. De cette dernière culture, on prélève quelques gouttes que l'on met dans 10 ml de sérum –physiologique stérile à 0,9%. La suspension microbienne est bien homogénéisée. La turbidité est ensuite ajustée au standard McFarland 0,5 avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml Unité formant colonie pour les bactéries (DO = 0,08 à 0,1 / $\lambda = 625$ nm) (Pessini et al., 2003).

4.3.2. Méthode de diffusion sur disque

Afin de tester l'activité antimicrobienne des extraits, nous avons utilisé la méthode de diffusion à partir de disques imprégnés.

➤ Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogrammes

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et de le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

Trois antibiotiques différents sont utilisés : Ampicilline (A) 10µg/disque, Gentamicine (GN) 10µg/disque, Oxacilline (OX) 01µg/disque Le choix a été fait en fonction de la disponibilité.

➤ Test de sensibilité aux extraits des plantes

Les différents extraits organiques des deux plantes sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde DMSO (20 µl/disque), et les extraits aqueux sont dissous dans l'eau distillée stérile. Le milieu de culture utilisé est la gélose Mueller-Hinton. La gélose est coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre et inoculée avec une suspension microbienne pure fraîchement préparée. Trois boîtes sont utilisées pour chaque souche.

Un disque de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre est imbibé de 20 µl d'extrait à une concentration de (1 mg/ ml⁻¹) puis déposé à la surface de la géloseensemencée, les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et

incubées à $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 h. La présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible.

4.3.3. Méthode de micro-dilution en milieu gélosé

Ce test en milieu gélosé a pour objectif de déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La CMI de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dans le milieu de culture après un temps d'incubation de 18 à 24 heures (**Basli et al., 2012**). La turbidité de chaque puits est appréciée à l'œil nu à la lumière du jour.

D'après la méthode de **Billerbeck et al. (2002)**, une solution mère de chaque extrait (d'une concentration finale de 10 % = 0,1 g/ml) est obtenue en DMSO, puis une série de dilutions est réalisée extemporanément en DMSO à partir de la solution mère. Deux millilitres de chaque dilution sont alors incorporés à 38 ml de milieu Mueller-Hinton MH, maintenu en surfusion. Les mélanges sont immédiatement répartis dans deux boîtes de pétri à raison de 20 ml de milieu par boîte. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 %. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'extrait ou non (témoin), est effectuée en surface sous forme de dépôts de 1 μl (réalisés à l'aide d'une micropipette).

La CMI est déterminée seulement pour les extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide (dont les diamètres d'inhibition sont ≥ 10 mm). Dans une boîte contenant le milieu MH, plusieurs dépôts de chaque extrait sont effectués (une concentration d'extrait pour toutes les souches).

5. Étude statistique

Tous les tests sont effectués en triplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm moyenne de l'erreur standard (S.E.M.). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie du test post hoc de Tukey et Student-Newman-Keul pour des comparaisons multiples. L'analyse statistique est effectuée à l'aide du logiciel IBM SPSS statistiques V20 d'IBM. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée pour indiquer une signification statistique.

CHAPITRE 3 :
RESULTATS ET DISCUSSION

Le Sahara algérien renferme une flore très riche et moins valorisée. Parmi cette végétation qui se minimise, on trouve les plantes médicinales traditionnellement utilisées par nos ancêtres à des fins thérapeutiques.

Un des axes de recherche développé par notre laboratoire consiste à valoriser et à caractériser de nouvelles molécules bioactives à partir de plantes médicinales. À cet effet, différentes étapes sont mises en jeu dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des substances d'intérêts, tous les processus comprennent des analyses phytochimiques et des tests biologiques.

1. Informations ethnobotaniques

Suite à une étude ethnobotanique de *Thymelaea microphylla* menée auprès des populations locales et des phytothérapeutes spécialistes d'El-Mechria et Nâama. Il s'avère que la plante est utilisée en médecine traditionnelle Algérienne principalement pour le traitement des blessures et diverses dermatoses tels que : érysipèle, cancer de peau, abcès et les boutons, lutter contre les infections respiratoires, atténuer la chute des cheveux, diminuer le taux de glucose dans le sang, utiliser contre certaines infections microbiennes, traiter le rhumatisme. Elle est aussi utilisée comme compresse naturelle mélangée avec du miel (au niveau des plaies cutanées) et le traitement de la stérilité (en stimulant les ovaires et favorisant l'ovulation) et lors d'une dystrophie ovarienne (déséquilibre hormonal).

Les usages thérapeutiques de *Artemisia judaica* ont été établis à la suite d'une enquête avec des phytothérapeutes spécialistes au niveau de la Wilaya de Tamanrasset et d'Oran et des écrits de **Sahki et Sahki (2004)** sur les plantes du Hoggar et de leurs utilisations par les autochtones du Hoggar. Selon cette enquête, la plante est utilisée principalement pour diminuer le taux de glucose dans le sang, traiter les infections urinaires et vaginales chez les femmes. En infusion, la plante est utilisée pour traiter les problèmes gastriques et soigner la toux. En lotion, elle est utilisée contre les allergies de la peau.

2. Rendement des extraits

Les rendements des extractions sont calculés et exprimés en pourcentage par rapport au poids total de la poudre végétale (**Tableau 10**).

Tableau 10. Rendement en pourcentage des extraits bruts de la partie aérienne de *Thymellaea microphylla* et *Artemisia judaica*.

Plantes	Extraits	Rendement (%)
<i>T. microphylla</i>	HEX	2.875
	DCM	2.08
	AcOEt	22.58
	MeOH	30.5
	Aq	24.2
<i>A. judaica</i>	HEX	1.32
	DCM	1.89
	AcOEt	18.41
	MeOH	23.68
	Aq	17.2

HEX: extrait d'hexane, DCM: extrait du dichlorométhane, AcOEt: extrait d'acétate d'éthyle, MeOH: extrait du méthanol (extraction avec des solvants à polarité croissante).

Aq: extrait aqueux (extraction sous reflux).

La plante *Thymellaea microphylla* donne le plus grand rendement avec les extraits polaires Aq et MeOH avec 30.5% et 24.2% respectivement, suivi de l'extrait AcOEt 22.58 %, tandis que les plus faibles rendements sont de l'ordre de 2.08% et 2.875 % pour l'extrait HEX et DCM respectivement.

De même pour la plante *Artemisia judaica*, le rendement le plus élevé est observé avec les extraits polaires (Aq et MeOH) avec 23.68% et 18.41% respectivement, suivi de l'extrait AcOEt (17.2 %), les plus faibles rendements sont de l'ordre de 1.32 % et 1.89 % avec les extraits HEX et DCM respectivement.

L'objectif de l'extraction est de libérer les composés phénoliques et autres composés du métabolisme secondaire présents dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion. La présence d'un ou de plusieurs cycles benzoïques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal (Stalikas, 2007).

On a observé que les solvants polaires ont tendance d'extraire beaucoup de molécules comparés aux autres solvants.

De plus, le déroulement de la macération sous agitation pendant un temps étalé (24 h) à température ambiante permet l'épuisement de la poudre végétale et la

prévention de l'altération ou modification des solvants par la température élevée. Néanmoins, l'extraction aqueuse est faite par décoction à température élevée pendant 30 min. **Su et al. (2006)** ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (**Albano et Miguel, 2010**). La chaleur peut, cependant, conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (**Seidel, 2012**), c'est la raison pour laquelle, la décoction a été effectuée pendant un temps réduit.

Anandharajan et al. (2006) ont effectué l'extraction progressive de poudre sèche d'*Aegles marmelos* et *Syzygium cuminin* avec des solvants de polarité croissante : HEX, DCM, AcOEt et MeOH., ils ont obtenu des rendements de l'ordre de 0,1 à 0,15 % pour les extractions à l'HEX et au DCM et de 2 % pour les extractions au MeOH et à l'AcOEt. Dans notre cas, l'extraction au MeOH et à l'AcOEt a nettement été meilleure pour les deux plantes. Le rendement n'est que relatif et varie en fonction du végétal étudié, de la nature, des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés et notamment de leur polarité. En effet, la solubilité des substances contenues dans la matière végétale dans un solvant donné dépend de ces propriétés. Il s'ensuit que les rendements d'extraction et la composition des extraits varient d'un solvant à l'autre et d'un végétal à l'autre. Il faut aussi noter que le rendement semble être lié aux propriétés génétiques des parties utilisées ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage, de la période de récolte et aussi dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée et qui affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes donc l'activité antioxydante (**Lee et al., 2003**) .

3. Screening phytochimique des extraits

3.1. Mise en évidence des métabolites secondaires en tubes à essai

L'analyse qualitative de la poudre des plantes sélectionnées, ayant pour but la mise en évidence de quelques groupes chimiques a été faite par des réactions basées sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation, de turbidité et d'observation visuelle d'un changement de couleur spécifique en tubes à essai. La présence des alcaloïdes est détectée par une réaction de précipitation.

Les résultats de la composition phytochimique préliminaire des différents extraits des plantes étudiées par screening chimique sont représentés dans les tableaux **11** et **12**.

Tableau 11. Mise en évidence des métabolites secondaires des extraits de *T. microphylla*.

Extraits	Flavonoïdes	Acides phénoliques	Alcaloïdes	Sesquiterpènes	Glycosides cardiotoniques	Coumarines	Lignanes	Saponines	Tanins	Dérivés anthraceniques, anthraquinones	Naphtoquinones, quinones libres
Hexane	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dichloromethane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate d'éthyle	+++	+++	-	-	+	-	-	+++	+	-	-
Méthanol	+++	+++	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Aqueux	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- une réaction très positive est représentée par : +++
- une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- une réaction faiblement positive est représentée par : +
- une absence de la substance est représentée par : -

Tableau 12. Mise en évidence des métabolites secondaires des extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L.

Extraits	Flavonoïdes	Acides phénoliques	Alcaloïdes	Sesquiterpènes	glycosides cardiotoniques	Coumarines	Lignanes	Saponines	Tanins	Dérivés anthraceniques, anthraquinones	Naphtoquinone, quinnoeslibres
Hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dichloromethane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate d'éthyle	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthanol	+++	+++	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Aqueux	++	++	-	-	+	-	-	+	+	-	-

- une réaction très positive est représentée par : +++
- une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- une réaction faiblement positive est représentée par : +
- une absence de la substance est représentée par : -

Nous remarquons que les plantes étudiées sont plus ou moins riches en métabolites secondaires ce qui laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes, il s'agit essentiellement de flavonoïdes, polyphénols, saponines, coumarines et tanins.

La recherche des lignanes, des dérivés anthracéniques, des anthraquinones, des naphthoquinones et des quinones libres s'est montrée négative pour les deux plantes sélectionnées.

Le criblage phytochimique des extraits des parties aériennes de *T. microphylla* indique la présence de flavonoïdes, d'acides phénoliques, de tanins, de glycosides cardiotoniques et de saponines. Ces résultats corroborent avec les résultats des travaux menés par **Dehimi et al. (2016)**.

Cependant, l'extrait Aq de la plante *T. microphylla* ne contient que les Acides phénoliques et flavonoïdes. Ces derniers sont présents en fortes quantités dans l'extrait MeOH et AcOEt, les saponines sont majoritairement présentes dans l'extrait AcOEt, tandis que les coumarines et les sesquiterpènes lactones sont uniquement détectés en faibles quantités dans l'extrait MeOH.

Par ailleurs, nous constatons que les alcaloïdes sont inexistant dans les trois extraits étudiés de la partie aérienne de *T. microphylla*. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par **Kerbab et al. (2015)**.

Les principaux travaux réalisés sur les plantes de la famille des Thymelaeacées montrent une variété de métabolites secondaires. Parmi ceux-ci, les esters diterpéniques de types tiglane, daphnane et 1-alkyldaphnane, coumarine, biscoumarine, flavonoïde, biflavonoïde, lignane, huile essentielle, triterpène, diterpène, stéroïde et spiro- γ -lactone glycoside (**Ghanem, 2014**). Tandis que sur le genre *Thymelaea*, les recherches ont conduit à l'isolement de plusieurs métabolites secondaires qui sont constitués de flavonoïdes, biflavonoïdes, coumarines, biscoumarines, acides phénoliques, diterpènes et les huiles essentielles.

Concernant la plante *A. judaica*, le screening phytochimique a mis en évidence la richesse des extraits MeOH, AcOEt et Aq en polyphénols et flavonoïdes. Les sesquiterpènes lactones et coumarines sont présents en faibles quantités seulement dans l'extrait MeOH, cependant, les saponines et tanins sont présents dans le MeOH et l'extrait Aq. Les glucosides cardiotoniques sont révélés uniquement dans l'extrait Aq tandis que les alcaloïdes sont détectés dans l'extrait AcOEt ainsi que l'extrait MeOH.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Benmansour et al. (2016)** qui ont mis en évidence la présence des alcaloïdes, des glucosides, des saponosides, des

polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et des anthocyanes. De même **Acheuk et al. (2017)** ont révélé la présence de ces molécules ainsi que les coumarines et les terpènes.

Parallèlement, **Khafagy et al. (1988)** ont identifié dans les parties aériennes de la plante huit sesquiterpènes lactones.

Dans une étude de **Naili et al. (2010)** réalisée sur les tests phytochimiques de *Artemisa campestris*, la présence des mêmes métabolites secondaires a été mise en évidence, ce qui est comparable à nos résultats à l'exception des tanins qui se sont révélés dans nos extraits et qui sont absents dans leur étude.

Salah et al. (1987) ont identifié dix-sept glycosides de flavonoïdes dans les extraits des feuilles et des tiges de *A. judaïca* L., conformes aux résultats obtenus sur les extraits de feuilles de *A. nilagirica*.

De ce fait, ce qui caractérise particulièrement la famille des Astéracées, c'est le polymorphisme chimique surtout chez les *Artemisia*. Cette variation ou chimiovariété peut se présenter d'un peuplement à l'autre ou même d'un individu à l'autre.

La différence dans la composition en métabolites secondaires dépend de plusieurs facteurs à savoir des facteurs exogènes comme l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude, la différence climatique d'une région à une autre, la méthode d'extraction, la durée de macération du matériel végétal dans le solvant, le solvant utilisé et la partie de la plante étudiée (**Su et al., 2006**), ainsi qu'aux facteurs endogènes tel que le patrimoine génétique des individus.

3.2. Analyse chromatographique des métabolites secondaires

3.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est à la fois une méthode d'identification et de séparation de divers constituants chimiques contenus dans une drogue. L'interprétation des profils flavonoïques est basée sur la comparaison des rapports frontaux (Rf) et la fluorescence des spots observés sous UV avant et après révélation par un révélateur chimique.

Les CCM sont effectuées dans deux systèmes de migration :

S1: AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11: 11: 26)

S2: AcOEt-MeOH-H₂O (100: 13,5 : 10).

Ces deux systèmes permettent de confirmer la présence des flavonoïdes et des acides phénoliques dans nos plantes.

Les résultats sont illustrés dans les **figures 7** et **8**. Les systèmes **S1** et **S2** ont permis de séparer certaines substances qui sont apparues sous formes de taches visibles à 254 nm (N° 1) et de fluorescences à 365 nm (N° 2) et au visible après révélation avec le Neu (N° 3) en présence des substances de référence : acide 4-hydroxy benzoïque, acide caféique ; acide chlorogénique, acide cinnamique, acide *p*-coumarique , acide ellagique, acide trans-férrulique, acide gallique, acide sinapique, acide syringique, acide vanillique, catéchine, chryisine, flavane, flavanone, hespérétine, naringinine, quercétine et rutine. Les rapports frontaux des extraits bruts des parties aériennes de *Artemisia judaica* et *Thymelaea microphylla* sont rapportés dans le **tableau 13**. Les rapports frontaux des témoins sont regroupés dans le **tableau 14**.

Tableau 13. Les rapports frontaux des extraits bruts des parties aériennes de *Artemisia judaica* et *Thymelaea microphylla*.

Systèmes	Extraits	Observations avant révélation		Observations après révélation
		254 nm	365 nm	avec le Neu 365 nm
S1	1	1 : Rf=1	1 :Rf=0,81(bleu claire) 2 : Rf =1 (bleu foncé)	1 : Rf =1 (rouge)
	2	1 : Rf= 0,81 (bleu) 2 : Rf= 0,93	1 :Rf=0,81 (bleu claire) 2 : Rf=0,93(rouge) 3 : Rf= 1	1 : Rf= 0,62 (rose) 2 :Rf=0,81 (bleu claire) 3 : Rf=0,93(rouge) 4 : Rf=1
	3	1 : Rf = 0,65 2 : Rf= 0,73 3 : Rf= 0,78 4 : Rf=0,96	1 : Rf= 0,30 (bleu) 2 : Rf=0,65(bleu) 3 Rf=0,78(bleu claire) 4 : Rf= 0,90 (rose) 5: Rf=0,93 (rouge)	1 : Rf= 0,25 (bleu) 2 :Rf= 0,62 (bleu) 3 : Rf= 0,65 (rose) 4 :Rf=0,78(bleu claire) 5 : Rf=0,93 (rose)
	4	1 : Rf= 0,07 2 :Rf= 0,30 (bleu) 3 : Rf= 1	1 : Rf= 0,07 2 : Rf= 0,30 3 : Rf= 0,81 (bleu claire) 4 : Rf=1	1: Rf=0,07 (bleu claire) 2:Rf=0,24(jaune orange) 3 : Rf= 0,30(bleu) 4 : Rf=0,61 (rose) 5 : Rf=0,81 (bleu claire) 6 : Rf=1 (rouge)
		1 :Rf= 0,18 2 :Rf= 0,43 3 :Rf= 0,65	Aucune fluorescence	1 : Rf= 0,18(bleu foncé) 2 : Rf= 0,43(bleu foncé) 3 : Rf= 0,5 (bleu)

	5	4 :Rf=0,81 5 :Rf= 0,95		4 : Rf = 0,65(bleu) 5 :Rf=0,81(bleu foncé) 6 :Rf=0,93(bleu foncé)
	6	1 :Rf=0,03	1 :Rf=0,03(bleu claire) 2 :Rf= 0,28(bleu claire) 3 : Rf= 0,78 (bleu claire)	Intensification de la fluorescence
S2	1	1 : Rf=1	1 : Rf= 0,82 (bleu) 2 : Rf = 1 (rouge)	1 : Rf= 0,82 (bleu) 2 :Rf= 0,87 (vert) 3 :Rf = 1(rouge)
	2	1:Rf= 0 2: Rf= 0,65 3: Rf= 0,72 3: Rf=0,8 (bleu claire) 4: Rf= 0,91 5: Rf=1	1 : Rf= 0	
			2 : Rf= 0,65 (rose) 3 : Rf= 0,72 (rose) 4 : Rf=0,81(bleu) 5 : Rf=0,91 (rouge)	Intensification de la fluorescence
			6 : Rf=1	
	3	1 : Rf= 0,03 2 : Rf= 0,51 3 : Rf= 0,65 4 : Rf= 0,81 (bleu) 5 : Rf=1	1 : Rf= 0,03	
			2 : Rf= 0,27(bleu) 3 : Rf= 0,51(bleu) 4 : Rf= 0,65 (rose) 5 : Rf= 0,72 (rose) 6 : Rf=0,78(rose) 7 : Rf=0,81 (bleu) 8 : Rf=1 (rouge)	Intensification de la fluorescence
	4	1 : Rf= 0,04 2 : Rf= 0,66 3 : Rf= 0,81 (bleu) 4 : Rf=1	1 : Rf= 0,04	
			2 : Rf= 0,40 (bleu) 3 : Rf= 0,66(rose) 4 : Rf=0,81(bleu claire)	Intensification de la fluorescence

			5 : Rf=1(bleu)	
	5	1 : Rf= 0,05 2 : Rf= 0,36 3 : Rf= 0,37 4 : Rf=0,60 5 : Rf=0,67 6 : Rf=0,81 7 : Rf=0,90	1 : Rf= 0,05 (bleu marine) 2 : Rf= 0,36 (bleu marine) 3 : Rf= 0,60 (bleu marine) 4 : Rf=0,67 (bleu marine) 5 : Rf=0,90 (bleu marine)	Intensification de la fluorescence
	6	1 : Rf= 0,02 2 : Rf= 0,65 3 : Rf= 0,78 (bleu)	1 : Rf= 0,02 (bleu) 2 : Rf= 0,18 (bleu) 3 : Rf= 0,30 (bleu) 4 : Rf=0,65 (bleu) 5 : Rf=0,78(bleu claire) 6 :Rf=1 (rose)	Intensification de la fluorescence

Position 1 : extrait d'acétate d'éthyle de *A. judaica* , 2 : extrait Aqueux de *A.judaica*, 3 : extrait du méthanol de *A.judaica*, 4 : extrait d'acétate d'éthyle de *T.microphylla* , 5 : extrait Aqueux de *T.microphylla* , 6 :extrait du méthanol de *T.microphylla* .

S1 : AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26)

S2 : AcOEt-MeOH-H₂O (100 : 13,5 : 10)

Tableau 14. Les rapports frontaux des témoins.

Systèmes	Témoins	Observation avant révélation		Observation après révélation
		254 nm	365 nm	365 nm
S1	11	Rf=0,75		
	12	Rf=0,66	Rf=0,66 (bleu claire)	Intensification de la fluorescence
	13	Rf=0,08	Rf=0,08(bleu claire)	
	14	Rf=0,79		
	15	Rf=0,80		Rf=0,80 (bleu)
	16	Rf=0	Rf=0	
	17	Rf=0,77	Rf= 0,77 (bleu claire)	Intensification de la fluorescence
	18	Rf=0,70		
	19	Rf=0,74	Rf=0,74 (bleu claire)	Intensification de la fluorescence
	20	Rf=0,72		
	21	Rf=0,82		
	22	Rf=0,82		Rf=0,82(bleu marine)

	23	Rf=0,93	Rf=0,93 (bleu marine)	Rf=0,93 (vert)
	24	Rf=0,96 (bleu)	Rf=0,96 (bleu claire)	Intensification de la fluorescence
	25	Rf=0,84	Rf=0,84 (bleu claire)	
	26	Rf=0,92		Rf=0,92 (vert claire)
	27	Rf= 0,93		Rf= 0,93 (vert claire)
	28	Rf=0,85		Rf=0,85 (jaune)
	29	Rf=0,31		Rf=0,31 (jaune orange)
S2	11	Rf=0,56		
	12	Rf=0,37	Rf=0,37 (bleu claire)	Intensification de la fluorescence
	13	Rf=0,03	Rf=0,03 (bleu claire)	
	14	Rf=0,68		
	15	Rf=0,66		Rf=0,66 (bleu)
	16	Rf=0		
	17	Rf=0,56	Rf=0,56 (bleu claire)	Intensification de la fluorescence
	18	Rf=0,13		

	19	Rf=0,56	Rf=0,56 (bleu clair)	
	20	Rf=0,58		
	21	Rf=0,55		
	22	Rf=0,38		
	23	Rf=0,86	Rf=0,86 (bleu marine)	Intensification de la fluorescence
	24	Rf=0,95 (bleu)	Rf=0,95 (bleu clair)	
	25	Rf=0,93		Rf=0,93 (bleu)
	26	Rf=0,81		Rf=0,81 (bleu)
	27	Rf=0,76		Rf=0,76 (bleu)
	28	Rf=0,61		Rf=0,61 (orange)
	29	Rf=0,04	Rf=0,04 (bleu marine)	Rf=0,04 (bleu)

Position 11 : Acide 4-hydroxy benzoïque ,12 : Acide caféique ; 13 : Acide chlorogénique, 14 : Acide cinnamique, 15 : Acide *p*-coumarique ,16 : Acide ellagique, 17 : Acide trans-férrulique, 18 : Acide gallique , 19 : Acide sinapique ,20 : Acide syringique, 21 : Acide vanillique ,22 : Catéchine, 23 : Chrysin ,24 : Flavane, 25 : Flavanone, 26 : Hespéridine, 27 : Naringinine, ,28 : Quercétine, 29 : Rutine.

S1 : AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26).

S2 : AcOEt-MeOH-H₂O (100 : 13,5 : 10).

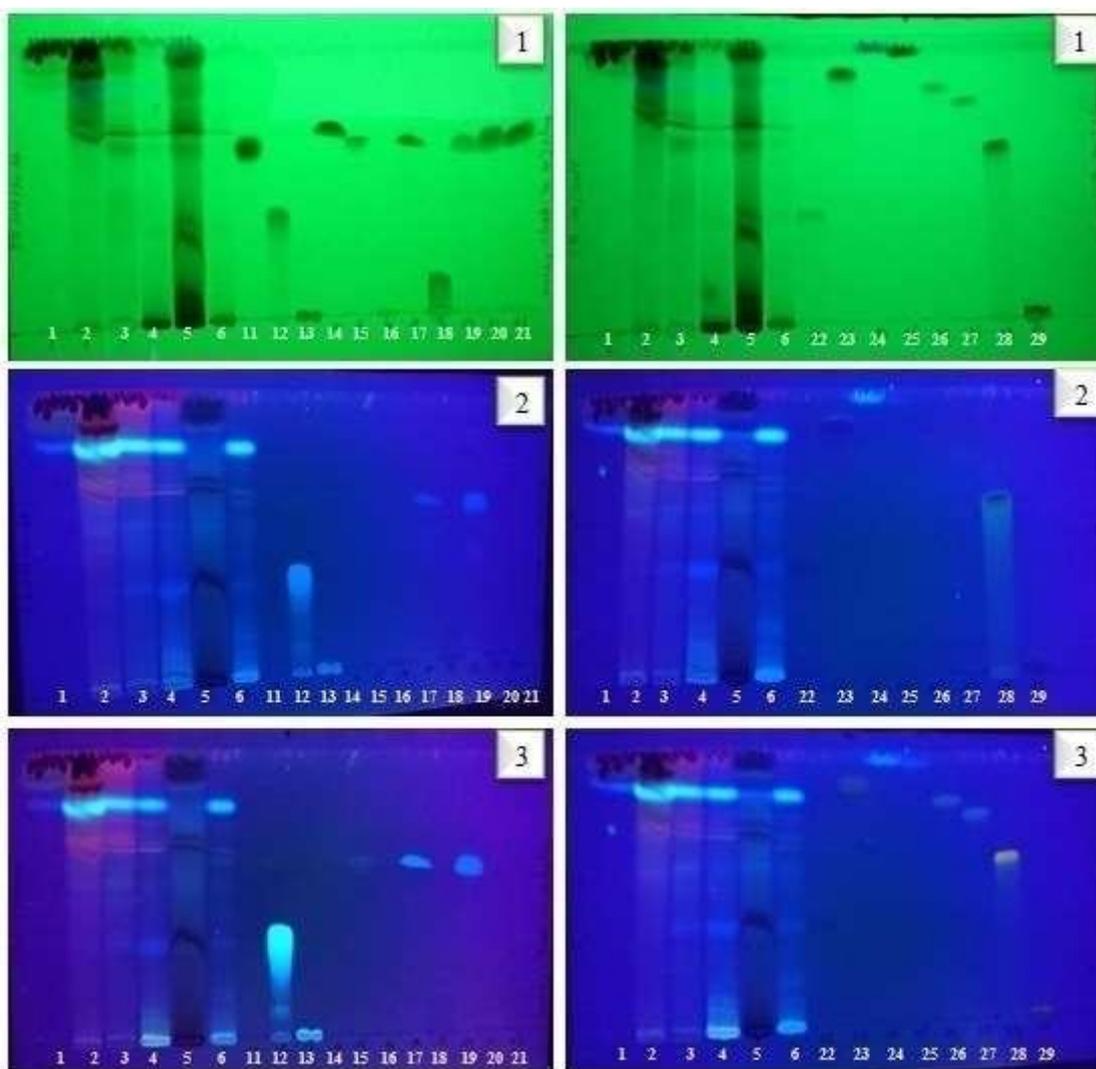


Figure 7 : CCM des extraits bruts des parties aériennes de *Artemisia judaica*, *Thymelaea microphylla* et témoins avant N°1: 254 nm; N°2: 365 nm et après révélation avec le Neu N°3: 365 nm dans le système de solvants **S1**: AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:26).

Position 1 : Extrait AcOEt de *A. judaica* , 2 : Extrait Aq de *A. judaica*, 3 : Extrait MeOH de *A. judaica*, 4 : Extrait AcOEt de *T. microphylla* , 5 : Extrait Aq de *T. microphylla* , 6 : Extrait MeOH de *T. microphylla* , 11: Acide 4-hydroxy benzoïque, 12: Acide caféique ; 13: Acide chlorogénique, 14 : Acide cinnamique, 15: Acide *p*-coumarique , 16: Acide ellagique, 17: Acide trans-férrulique, 18: Acide gallique , 19 : Acide sinapique, 20 : Acide syringique, 21: Acide vanillique, 22 :Catéchine, 23: Chrysine, 24: Flavane, 25: Flavanone, 26: Hespérétine, 27: Naringinine, 28: Quercétine, 29: Rutine.

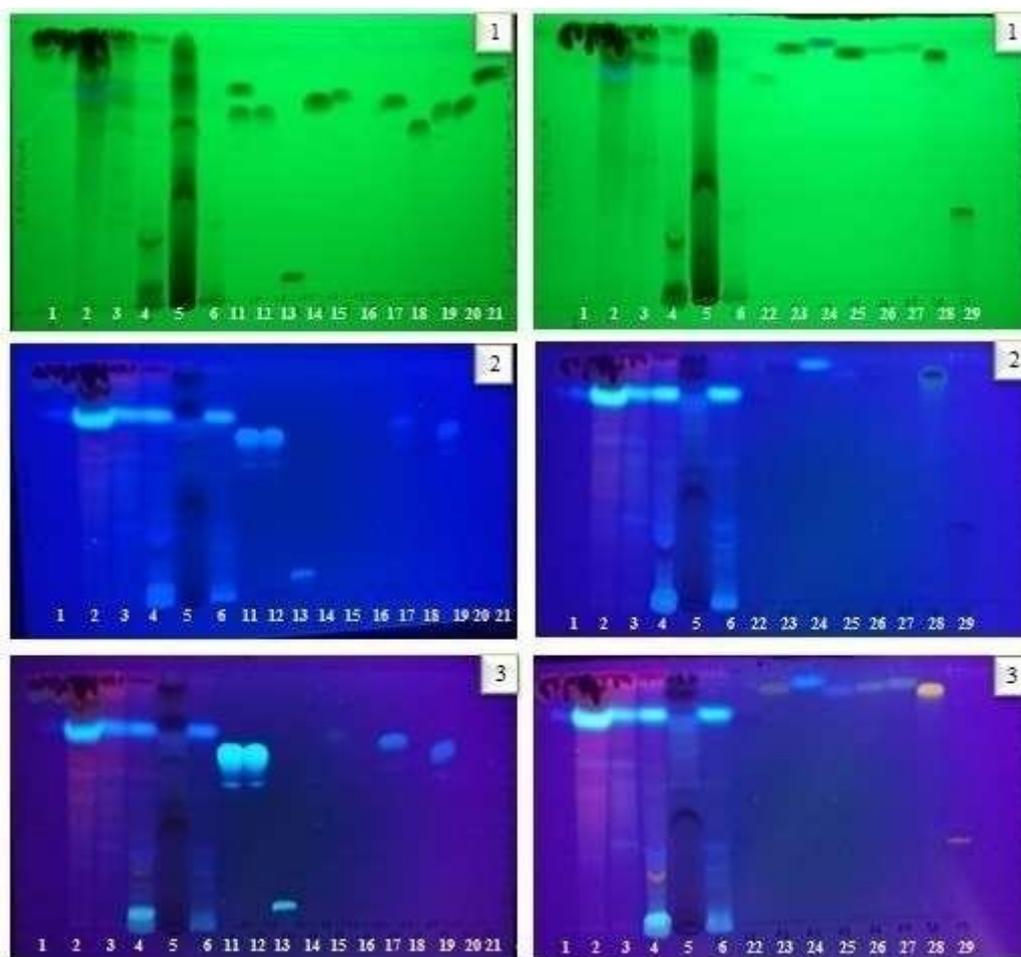


Figure 8: CCM des extraits bruts de *Artemisia judaica*, *Thymelaea microphylla* et témoins avant (N°1: 254 nm; N°2: 365 nm) et après révélation avec le Neu (N°3: 365 nm) dans le système de solvants **S2**: AcOEt-MeOH-H₂O (100 : 13,5 : 10).

Position 1 : Extrait AcOEt de *A. judaica* , 2 : Extrait Aq de *A. judaica* , 3 : Extrait MeOH de *A. judaica* , 4 : Extrait AcOEt de *T. microphylla* , 5 : Extrait Aq de *T. microphylla* , 6 : Extrait MeOH de *T. microphylla* , 11: Acide 4-hydroxy benzoïque, 12: Acide caféique ; 13: Acide chlorogénique, 14 : Acide cinnamique, 15: Acide *p*-coumarique , 16: Acide ellagique, 17: Acide trans-férrulique, 18: Acide gallique , 19 : Acide sinapique, 20 : Acide syringique, 21: Acide vanillique, 22 : Catéchine, 23: Chryisine, 24: Flavane, 25: Flavanone, 26: Hespéretine, 27: Naringinine, 28: Quercétine, 29: Rutine.

Pour mieux déterminer la nature des flavonoïdes présents dans les extraits étudiés, un réactif spécifique (réactif de Neu) est utilisé. Ce dernier révèle les flavonoïdes en orange, rouge, jaune, bleu et vert (**Wagner et Blatt, 1996**). Les plaques CCM observées, après élution par le système solvant, pulvérisation avec le réactif de Neu et visualisation sous UV à 365nm, montrent de nombreuses tâches de couleurs et de distances de migrations différents (**Figures 7 et 8**).

La révélation physique sous lampe UV à 254nm confirme l'abondance des flavonoïdes chez *Thymelaea microphylla* et *Artemisia judaica*.

D'après les résultats des **figures 7, 8** et **tableau 13**, on constate une différence entre les deux systèmes de migration **S1** : AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100 : 11 : 11 : 26) et **S2** :CHCl₃-MeOH (80:20) :

L'extrait 1 présente 2 bandes dans le système 1 et 2 bandes dans le système 2.

L'extrait 2 présente 3 bandes dans le système 1 et 5 bandes dans le système 2.

L'extrait 3 présente 5 dans le système 1 et 8 bandes dans le système 2.

L'extrait 4 présente 4 dans le système 1 et 4 bandes dans le système 2.

L'extrait 5 ne présente pas de fluorescence dans le système 1 et 5 bandes dans le système 2.

L'extrait 6 présente 3 bandes dans le système 1 et 6 bandes dans le système 2 (**tableau 13**).

La tâche de l'extrait 4 dans le système 1 à Rf = 0,07 (**tableau 13**) indique probablement la présence de l'acide chlorogénique par comparaison de leur rapport frontal (acide chlorogénique Rf = 0,08) (**tableau 14**). Les colorations bleues de la tâche à Rf = 0,78 de l'extrait 6 dans le système 2 indique la présence d'un flavonoïde qui est probablement l'hésperétine par comparaison de leurs rapports frontaux (hésperétine Rf= 0,81). Les colorations jaune orangé de la tâche à Rf = 0,24 de l'extrait 4 dans le système 1 indique la présence d'un flavonoïde. Pour préciser la nature des flavonoïdes, le réactif de Neu, révèle les bandes en orange, rouge, jaune, bleu, vert (**Wagner et Bladt, 1996**). Par ailleurs, la comparaison des colorations des différentes tâches a mis l'accent sur le type de composés phénoliques détectés. En se référant aux travaux de **Markham (1982)**, sous UV à 365nm, il a montré que les anthocyanidines-3-glycosides donnent des tâches orange rouge et mauve ; les flavonols se décèlent sous forme de tâches jaunes et vertes, les flavones, flavones méthylées, isoflavones, flavanones et chalcones apparaissent sous forme de tâches bleues. Les flavanols et les auronones se caractérisent par l'apparition de tâches vertes, les flavones et les chalcones présentent une coloration pourpre et orange. La présence des flavonoïdes dans les organes étudiés a été confirmée par le réactif de Neu en paraissant, dans le visible, sous forme de tâches jaune et marron. Sous observation UV/365nm, ces couleurs s'intensifient et se diversifient (**Wagner et al., 1996**). À l'égard des résultats obtenus, la présence des flavonoïdes et des acides phénoliques dans les extraits de la partie aérienne de *Thymelaea microphylla* et *Artemisia judaica* est évidente, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par **Mekhelfi (2014)** sur la partie aérienne de la même espèce *Thymelaea microphylla* et **Bakr (2014)** sur les extraits (BuOH et AcOEt)

de *Artemisia judaica* qui a révélé l'identification de l'orientine, la vitexine, la quercétine et l'isovitexine ainsi que l'acide caféique et l'acide isoférulique.

3.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV visible à barrettes de diodes (HPLC-DAD-UV)

Le profil d'éluion des composés issus des extraits bruts de la partie aérienne de *T. microphylla* et *A. judaica* est réalisé à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région des ultraviolets avec un pic d'absorption maximum à 280 nm dû à la présence du cycle phénolique. Le cycle B présent dans les différentes classes de flavonoïdes est caractérisé généralement par un pic d'absorption dans un intervalle de mesure compris entre 300 et 380 nm, exception faite pour les anthocyanes dont le cycle B présente un maximum d'absorption entre 460 et 560 nm.

L'identification est basée sur la comparaison des temps de rétention des différents constituants des extraits avec ceux des différents standards analysés dans les mêmes conditions.

La vaste gamme de polarité des composés phénoliques nécessite souvent de travailler en gradient d'éluion pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés. Les pics de chromatogrammes des différents extraits de *T. microphylla* résultant de l'analyse HPLC-UV-DAD sont présentés dans la **figure 9**. Les quantités des composés détectés sont rapportées dans le **tableau 15**. Treize composés phénoliques sont identifiés avec le kaempférol 3-O-rutinoside (10) (4,849 mg/g⁻¹ ES) et l'acide trans-3-hydroxycinnamique (6) (4,744 mg/g⁻¹ ES) en tant que composés principaux parmi les composés phénoliques quantifiés. En outre, le flavonoïde kaempférol 3-O-rutinoside (10) est identifié dans tous les extraits. Les flavonoïdes comme la catéchine, la lutéoline et l'apigénine sont impliqués pour avoir un effet antioxydant. Les acides phénoliques comme l'acide chlorogénique sont aussi impliqués dans l'activité antioxydante (**Rice-Evans et al., 1997**).

L'acide chlorogénique et l'acide trans-cinnamique sont présents dans les extraits de *T. hirsuta* L. (**Yahyaoui et al., 2018**).

La lutéoline a aussi été identifiée pour la première fois chez cette espèce par **Mekhelfi (2016)**.

Étant donné que la majorité des recherches se focalisent uniquement sur les huiles essentielles, il est donc difficile de comparer nos résultats avec les travaux antérieurs.

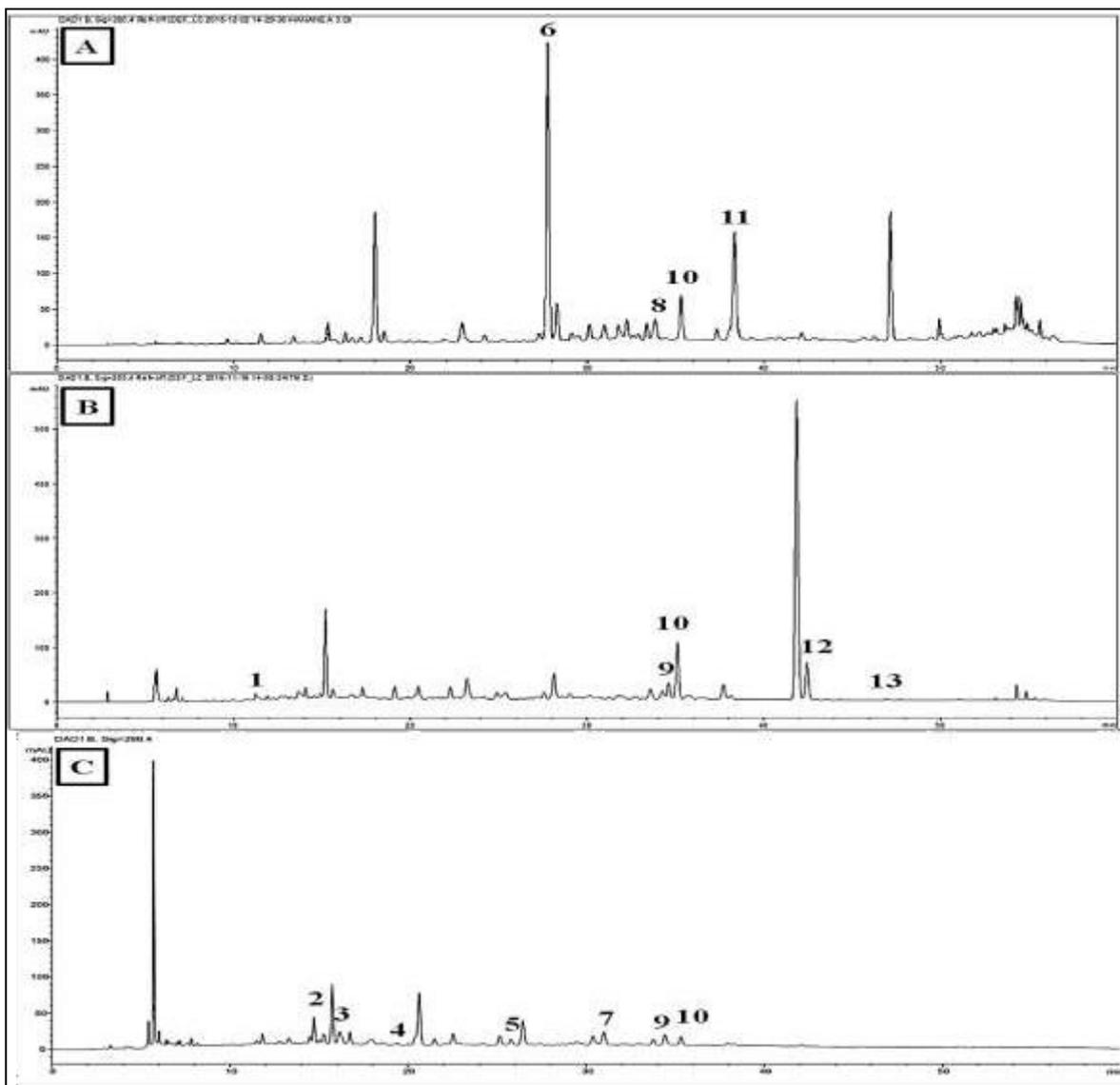


Figure 9: Chromatogrammes HPLC-DAD-UV à 280 nm de l'extrait AcOEt (A), de l'extrait MeOH (B), de l'extrait Aq (C) des parties aériennes de *T. microphylla*.

Résorcinol (1), catéchine (2), acide chlorogénique (3), acide syringique (4), acide sinapique (5), acide *trans*-3-hydroxycinnamique (6), isoquercétine (7), acide ellagique (8), myricétine (9), kaempférol 3-*O*-rutinoside (10), acide *trans*-cinnamique (11), lutéoline (12), apigénine (13).

Tableau 15. HPLC-UV-DAD analyse des composés phénoliques dans différents extraits de *T. microphylla*.

Composés	Acétate d'éthyle (mg/g ⁻¹ ES)	Méthanol (mg/g ⁻¹ ES)	Aqueux (mg/g ⁻¹ ES)
Résorcinol (1)	-	0.252	-
Catéchine (2)	-	-	2.601
Acide chlorogénique (3)	-	-	0.528
Acide syringique (4)	-	-	0.023
Acide sinapique (5)	-	-	0.605
Acide trans-3-hydroxycinnamique (6)	4.744	-	-
Isoquercétine (7)	-	-	0.489
Acide ellagique (8)	0.837	-	-
Myricétine (9)	-	0.208	0.163
Kaempférol 3-O-rutinoside (10)	3.253	4.849	0.582
Acide trans-cinnamique (11)	1.074	-	-
Lutéoline (12)	-	3.959	-
Apigénine (13)	-	0.053	-

Les données sont exprimées en mg/g⁻¹d'extrait sec.

- = absent.

Les chromatogrammes des extraits de *A. judaica* subsp *sahariensis* L. résultant de l'analyse HPLC-UV-DAD sont présentés dans la **figure 10**. Les quantités des composés détectés sont présentées dans le **tableau 16**. Onze composés sont identifiés avec le kaempférol (10) (20,9 mg/g⁻¹ ES), le resvératrol 3 -O-glucoside (3) (5,045 mg/g⁻¹ ES), le resvératrol (7) (2,835 mg/g⁻¹ ES), l'acide trans-3-hydroxycinnamique (5) (2,704 mg/g⁻¹ ES) et l'acide para-coumarique (4) (1,342 mg / g ES) en tant que composés principaux. De plus, le flavonoïde kaempférol (10) est identifié dans tous les extraits, c'est le flavonol le plus dominant dans l'extrait AcOEt avec une quantité très importante, il se trouve aussi dans *Artemisia pallens* L. (Niranjan et al., 2009).

Par ailleurs, des composés phénoliques similaires sont identifiés chez plusieurs espèces de *Artemisia* telles que *A. pectinata* Pall. (Ma et al., 2008), *A. Ludoviciana* Nutt, *A. Annu*a L. (Carvalho et al., 2011) et *A. Campestris* L.(Megdiche-Ksouri et al., 2015).

La catéchine, le kaempférol 3-*O*-rutinoside, l'apigénine, l'acide trans-3-hydroxycinnamique sont aussi identifiés dans la partie aérienne de *A. argyi* H. (Seong et al., 2019) .

De même, la présence de certains composés phénoliques tels que les acides p-coumarique, syringique et chlorogénique présents dans *A. vulgaris* et *A. annua* confèrent aux extraits de la plante *A. judaica* d'importantes capacités antioxydantes et antibactériennes. (Skowrya et al., 2014 ; Matvieieva et al., 2019)

L'analyse phytochimique de l'huile essentielle de *A. judaica* menée par Mohammed et al. (2022) a révélé une dominance des composés volatils hautement actifs comme les monoterpènes oxygénés et des dérivés de l'acide cinnamique. Ces substances sont responsables de l'activité antioxydante *in vivo* et *in vitro* de l'huile essentielle.

Des travaux antérieurs ont montré que les capacités biologiques de certaines plantes sont en partie dues à des composés phénoliques de faible masse moléculaire (Wang et al., 1999). En effet, les flavonols, l'acide hydroxybenzoïque et les composés d'acide hydroxycinnamique présents dans les légumes sont considérés comme un agent thérapeutique en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé, tels que leur prétendue protection contre certains cancers, les maladies cardiovasculaires et le vieillissement (Ross et Kasum, 2002).

Le kaempférol, le resvératrol et son précurseur naturel le polydatin (resvératrol-3-*O*-*b*-mono-*D*-glucoside, la forme glycosidique du resvératrol) ont un effet anti-inflammatoire et antioxydant contre les maladies cardiovasculaires, le vieillissement et le cancer.

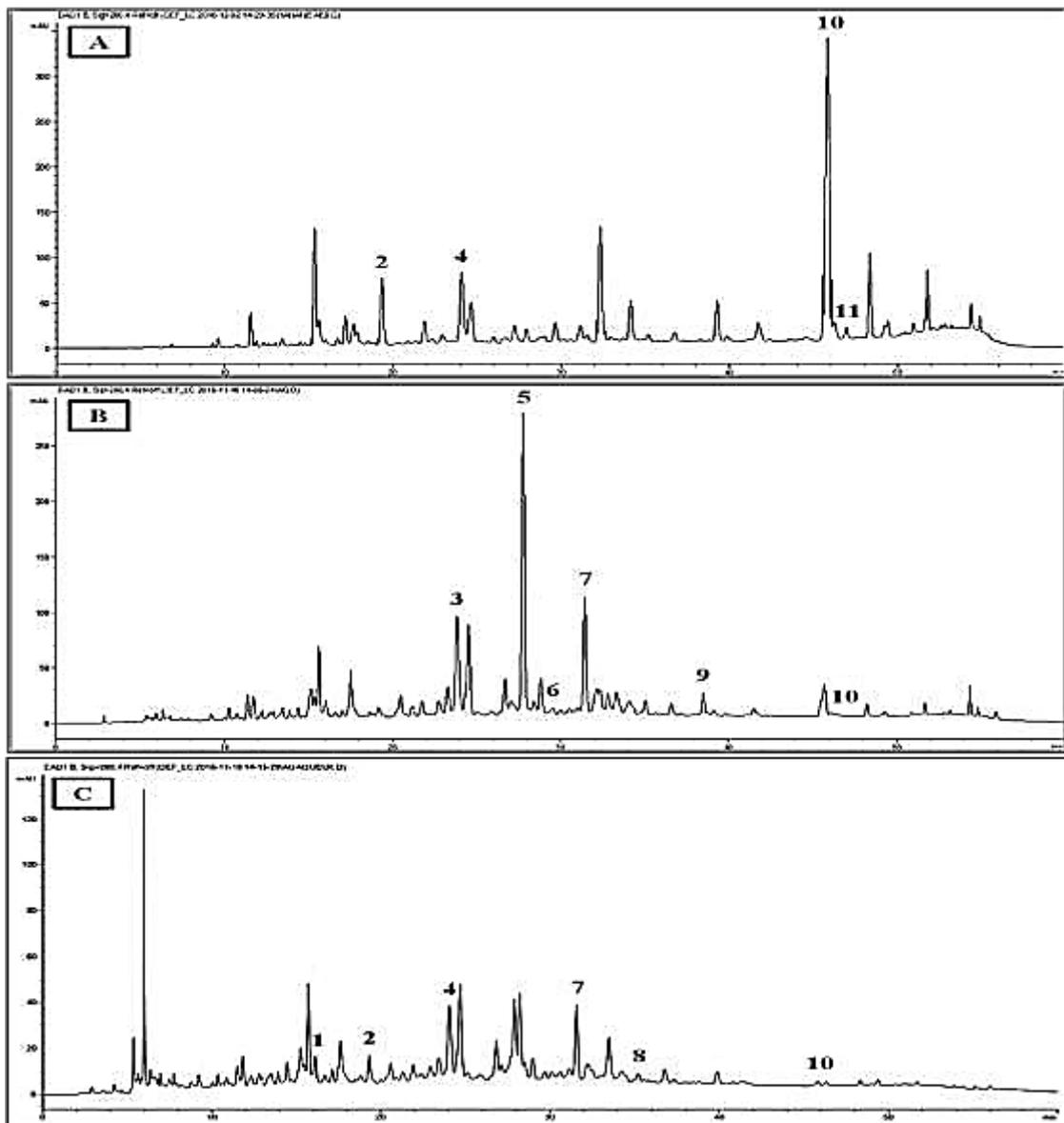


Figure 10 : Chromatogrammes HPLC-DAD-UV à 280 nm de l'extrait AcOEt (A), de l'extrait MeOH (B), de l'extrait Aq (C) des parties aériennes de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L.

Acide chlorogénique (1), acide syringique(2), résveratrol 3-*O*-glucoside (3), acide *para*-coumarique (4), acide *trans*-3-hydroxycinnamique (5), lutéoline 7-*O*-glucoside (6), resvératrol (7), kaempférol 3-*O*-rutinoside (8), acide *trans*-cinnamique (9), kaempférol (10), apigénine (11).

Tableau 16. HPLC-UV-DAD analyse des composés phénoliques dans différents extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L

Composés	Acétate d'éthyle (mg/g ⁻¹ ES)	Méthanol (mg/g ⁻¹ ES)	Aqueux (mg/g ⁻¹ ES)
Acide chlorogénique (1)	-	-	0.477
Acide syringique (2)	0.688	-	0.132
Resvératrol 3- <i>O</i> -glucoside (3)	-	5.045	-
Acide para-coumarique (4)	1.342	-	0.602
Acide trans-3-hydroxycinnamique (5)	-	2.704	-
Lutéoline 7- <i>O</i> -glucoside (6)	-	0.923	-
Resvératrol (7)	-	2.835	0.875
Kaempférol 3- <i>O</i> -rutinoside (8)	-	-	0.211
Acide trans-cinnamique (9)	-	0.11	-
Kaempférol (10)	20.9	0.134	0.12
Apigénine (11)	0.256	-	-

Les données sont exprimées en mg/g⁻¹ d'extrait sec.

- = absent.

4. Dosage des métabolites secondaires par spectrophotométrie (UV-visible)

Les analyses quantitatives des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage (**Figures 11, 14 et 17**).

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Afin de quantifier certains métabolites des extraits préparés à partir des parties aériennes des deux plantes *A. judaica* et *T. microphylla*, un dosage des polyphénols totaux a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leurs sont attribuées. Les quantités des polyphénols correspondantes sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g ES) et déterminés par l'équation de type : $y = a x + b$. La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,997$ (**Figure 11**).

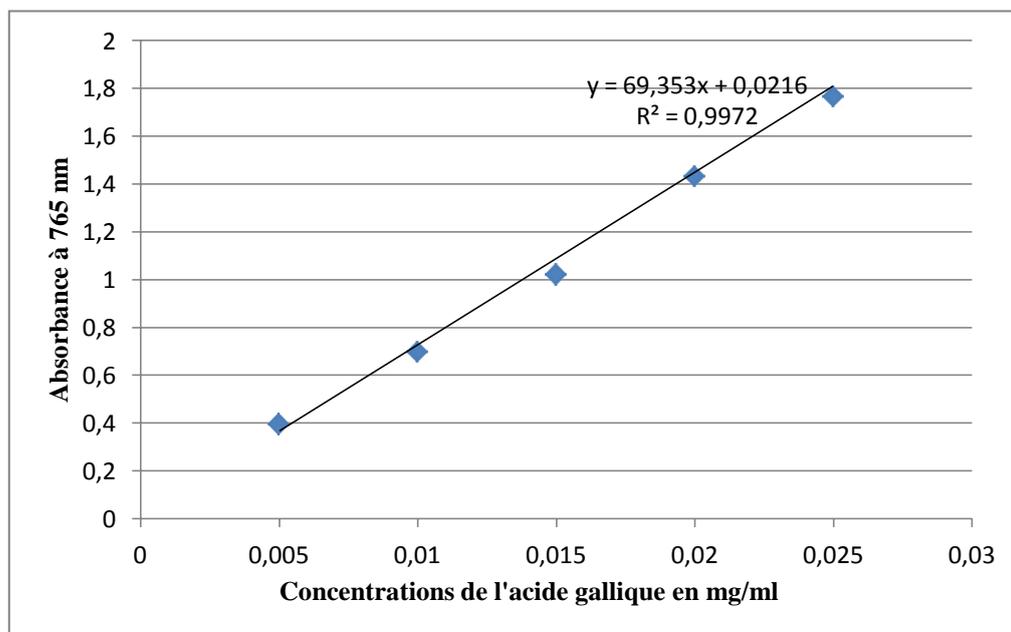


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Les teneurs totales en composés phénoliques des extraits de la partie aérienne de *T. microphylla* sont présentées dans la **figure 12**. Des quantités élevées de polyphénols ont été obtenues dans des extraits du MeOH et l'AcOEt avec des valeurs de l'ordre de $317,08 \pm 0,86$ mg EAG/g ES et $218,61 \pm 0,56$ mg EAG/g ES respectivement suivi de l'extrait Aq avec une teneur de l'ordre de $184,67 \pm 0,38$ mg EAG/g ES.

Les résultats sont cohérents avec ceux trouvés par **Benhammou et al. (2009)** qui ont obtenu la plus grande quantité de phénols totaux dans l'extrait MeOH (257 mg EAG/g ES), Tandis que la plus basse concentration de phénols totaux a été quantifiée dans l'extrait Aq.

Cependant, les teneurs en phénols totaux trouvées par **Djeridane et al. (2010)** sont de 10.80 mg EAG/g ES pour la partie aérienne et sont nettement inférieures à nos résultats.

Parallèlement, les résultats obtenus pour la plante *A. judaica* subsp. *sahariensis* L. montrent que la teneur en polyphénols varie entre ($58,97 \pm 0,30$ mg EAG/g ES) et ($248,93 \pm 0,33$ mg EAG/g ES) dans les extraits étudiés. Les plus grandes quantités ont été trouvées dans l'extrait MeOH ($248,93 \pm 0,33$ mg EAG/g ES) et l'extrait AcOEt ($227,26 \pm 0,18$ mg EAG/g ES) suivi de l'extrait Aq qui renferme une teneur moyenne de $174,82 \pm 0,65$ mg EAG/g ES (**figure13**).

Les résultats indiquent clairement l'influence du solvant sur la capacité d'extraction des composés phénoliques. Indépendamment du solvant, les teneurs en polyphénols dans les extraits Aq et MeOH des parties aériennes de *A. judaica* subsp.

sahariensis L. sont supérieures à ceux des extraits Aq et MeOH des parties aériennes de *A. annua* L. qui sont respectivement de 35,1 et 34,4 mg EAG/g ES (Cai et al., 2004).

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Vuorela, 2005; Gomez-Caravaca et al., 2006).

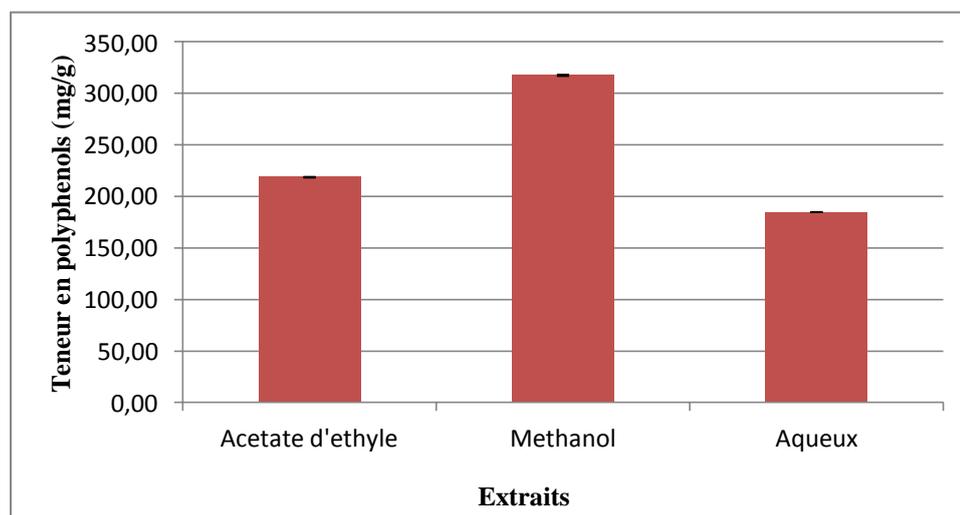


Figure 12: Teneurs en polyphénols des différents extraits de la partie aérienne de *T. microphylla* exprimées en mg d'équivalent de l'acide gallique/ g d'extrait sec.

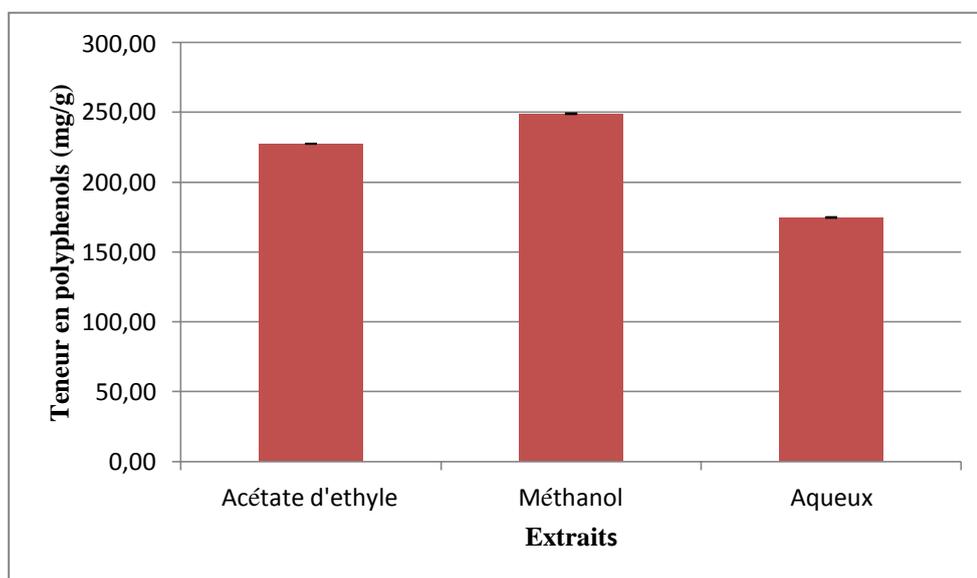


Figure 13: Teneurs en polyphénols des différents extraits de la partie aérienne de *A. judaica* exprimées en mg d'équivalent de l'acide gallique/ g d'extrait sec.

4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Pratt et Cornely, 2019). Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Yi et al., 2007).

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de la courbe d'étalonnage est la catéchine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2=0,993$ (**Figure 14**). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par Gramme de matière sèche (mg EC/g ES).

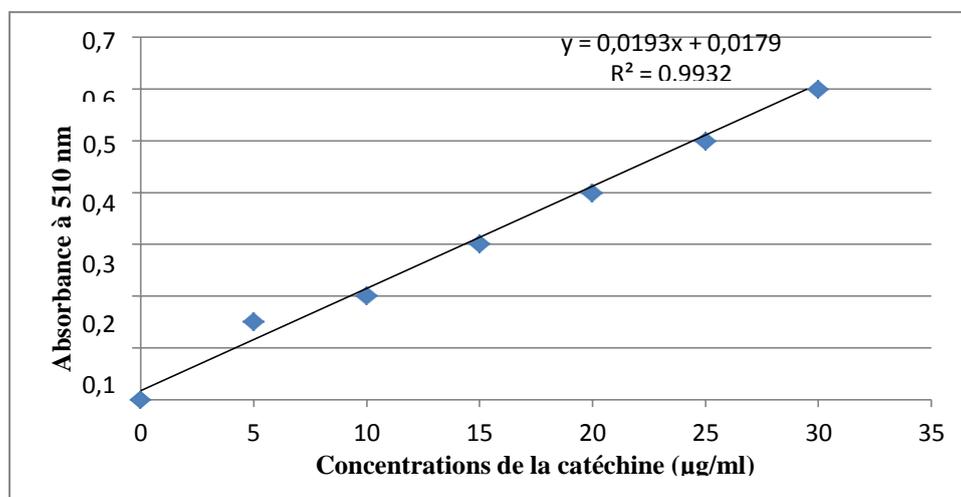


Figure 14: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux dans la partie aérienne de *T. microphylla* par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait MeOH est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 172.27 ± 0.32 mg EC/g ES par la suite viennent l'extrait AcOEt et l'extrait Aq avec des valeurs de 89.73 ± 0.13 mg EC/g ES et 66.78 ± 0.28 mg EC/g ES respectivement (**figure 15**).

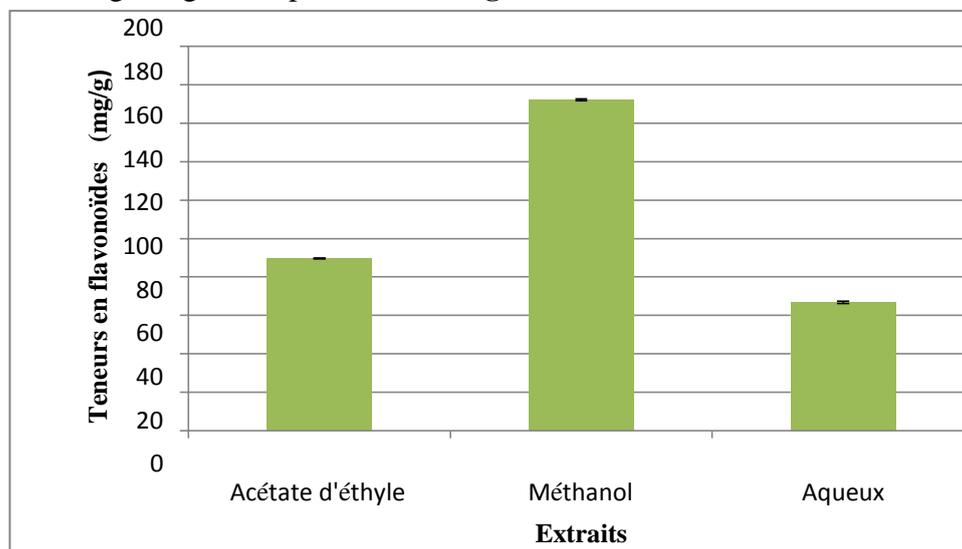


Figure 15: Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de la partie aérienne de *T. microphylla* exprimées en mg/g d'extrait sec.

Ceci est en accord avec les résultats de **Benhamou et al. (2009)** dont la quantité de flavonoïdes trouvés dans l'extrait MeOH de *T. microphylla* est de 100mg EC/g ES pour les tiges et 35.77 mg EC/g ES pour les racines.

Bakr (2014) rapporte dans son étude que l'espèce *Artemisia judaica* L.var. *sinaitica* est riche en acides phénoliques et flavonoïdes : l'extrait AcOEt a montré la concentration la plus élevée en polyphénols ($370,58 \pm 3,5$ mg/g) et en flavonoïdes ($18,3 \pm 1,23$ mg/g) suivi de l'extrait BuOH.

Dehimi et al. (2016) ont obtenu de très faibles concentrations en flavonoïdes et en proanthocyanidines dans l'extrait MeOH des tiges et des feuilles de *T. microphylla* par rapport aux résultats obtenus dans notre étude.

Concernant les extraits *A. judaica* subs *sahariensis* L., ils contiennent une quantité de flavonoïdes allant de 90.18 ± 0.20 mg EC/g ES à $15,06 \pm 0.36$ mg CE / g ES. Comme le montre la **figure 16**, ces teneurs varient de manière significative avec le type de solvant. Là encore, l'extrait MeOH présente la teneur la plus élevée 90.18 ± 0.20 mg CE / g, suivi par l'extrait AcOEt $75,75 \pm 0,29$ mg CE/g ES et l'extrait Aq 66.43 ± 0.19 mg CE / g ES. La quantité de flavonoïdes de l'extrait AcOEt provenant des parties aériennes de *A. judaica* subsp. *sahariensis* était supérieure à celui de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *A. judaica* var. *Sinaitica* tackholm (**Bakr, 2014**).

Par conséquent, les études précédentes ont montré que les stress abiotiques largement présents dans les zones arides pourraient augmenter la synthèse de composés phénoliques en réponse au stress oxydatif provoqué par la production d'espèces réactives de l'oxygène dans ces conditions environnementales (**Navarro et al., 2006**).

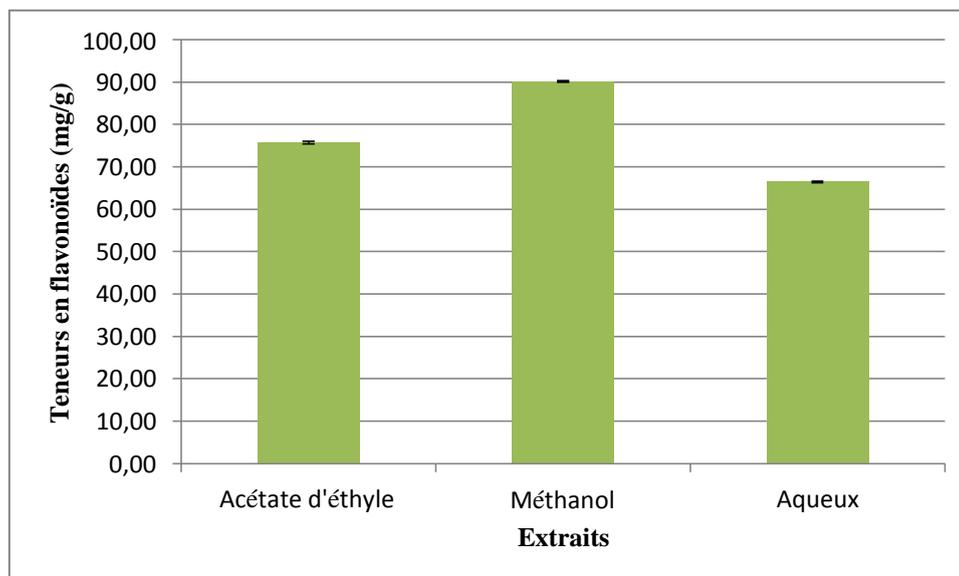


Figure 16: Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de la partie aérienne de *A. judaica* exprimées en mg/g d'extrait sec.

4.3. Dosage des tanins condensés

La courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés est établie en utilisant la catéchine comme référence (**Figure 17**).

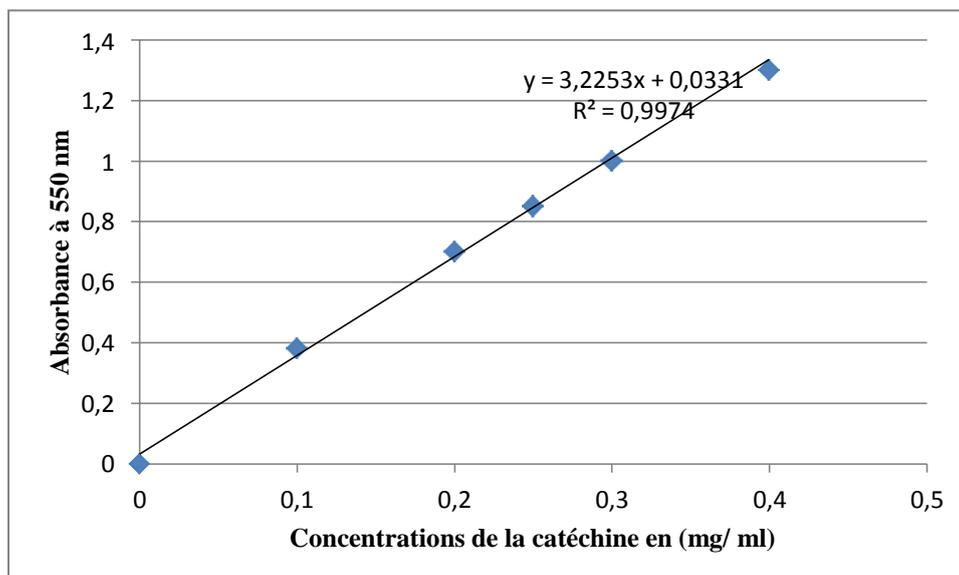


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

L'analyse des résultats des teneurs en tanins condensés dans la plante *T. microphylla* révèle que l'extrait AcOEt présente une valeur de 96.39mg EC/g ES, il est plus riche que l'extrait MeOH et Aq avec des quantités allant de 62.14 mg EC/g ES à 33.08 mg EC/g ES respectivement (**Figure 18**). Les tanins sont peu courants dans la famille des thymelaeaceae et sont généralement de dérivés du leucocyanidol (**Hegnauer, 1973**). Alors

que les feuilles de *Thymelaea hirsuta* contiennent des tanins de type gallique (El Beiheiry, 2000).

Par ailleurs, *Thymelaea lythroides* contiendrait des tanins à la fois de type gallique et catéchique (Dohou et al., 2003). Au cours de nos récoltes et prospections, nous avons remarqué que la plante *T. microphylla* n'est jamais broutée par le bétail. Le faible intérêt pastoral des Thyméléacées a été expliqué par le fait qu'elles contiennent des alcaloïdes et des glucosides (Bakr, 2014). Les tanins et les terpénoïdes pourraient aussi jouer un rôle de protection contre les agressions par les animaux et les insectes.

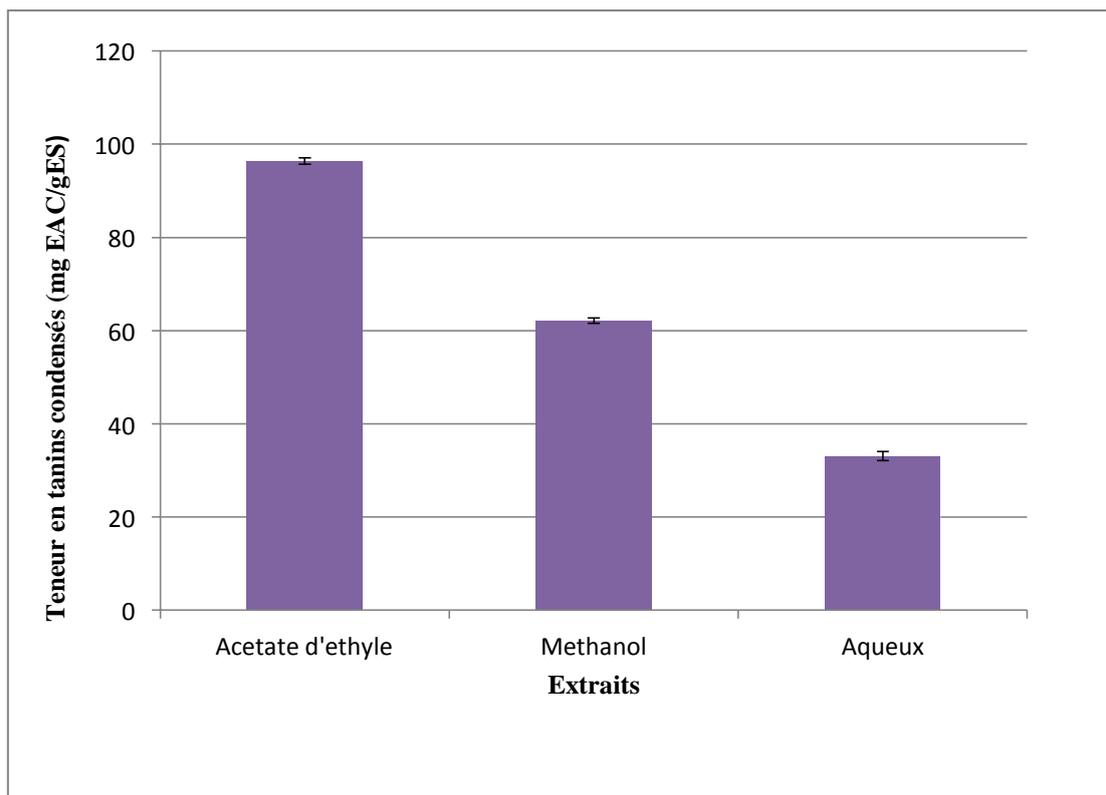


Figure 18: Teneurs en tanins des différents extraits de la partie aérienne de *T. microphylla* exprimées en mg EC/ g d'extrait sec.

Les résultats pour la teneur en tanins condensés de la partie aérienne de *A. judaica* (figure 19) montrent que l'extrait Aq contient une quantité de tanins condensés significativement supérieure à celle des autres extraits. Les quantités étant comme suit extrait Aq > extrait MeOH > extrait AcOEt, avec des valeurs de 44.60 mg EC/g ES, 37.68 mg EC/g ES et 35.55 mg EC/g ES respectivement. Il en est de même pour Bouchenak et al. (2018) qui rapportent l'existence des tanins condensés dans *Artemisia absinthium* L.

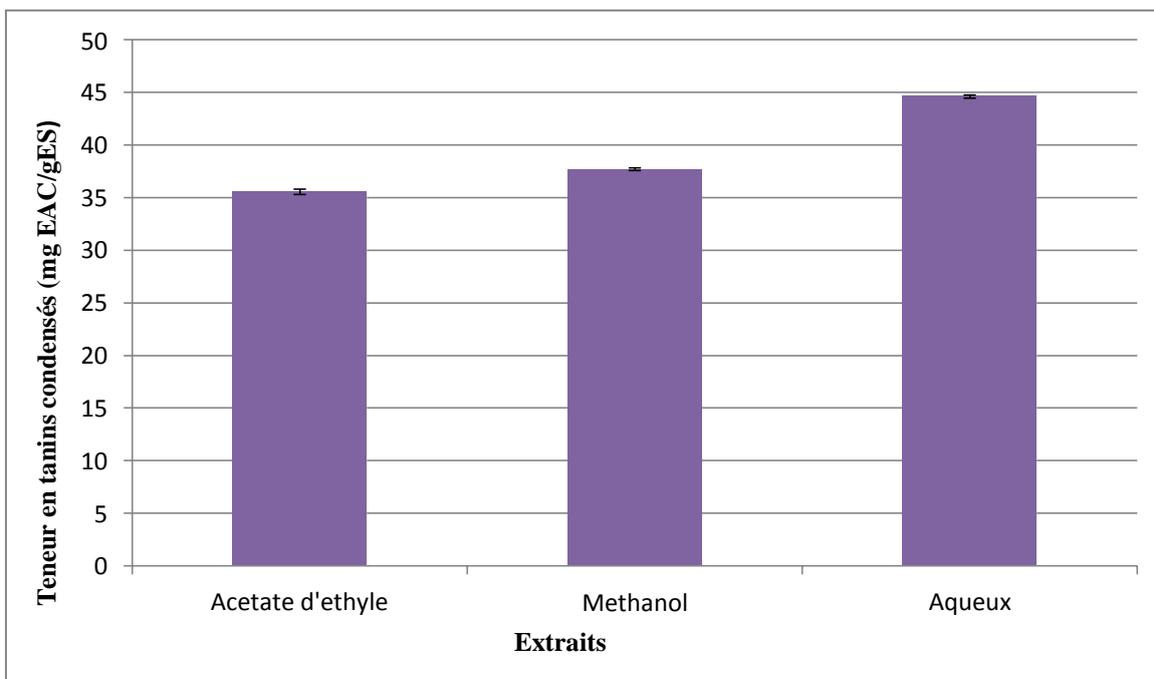


Figure 19: Teneurs en tanins des différents extraits de la partie aérienne de *A. judaica* exprimées en mg EC /g d'extrait sec.

La quantité de tanins condensés trouvée par **Megdiche-Ksouri et al. (2015)** pour l'extrait MeOH des parties aériennes de *A. campestris* est inférieure à celle de notre présente étude.

Par ailleurs, les faibles teneurs en tanins dans les plantes étudiées comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes sont probablement dues au fait que le méthanol n'est pas le solvant approprié à l'extraction de ces composés. Des travaux ont montré que les tanins sont mieux extraits avec de l'acétone à différentes concentrations avec ou sans acidification (**Chavan et al., 2001**). Pour **Trabelsi et al. (2010)**, un mélange acétone/eau (8:2) donne un meilleur rendement pour l'extraction des tanins.

Le taux des tanins dans une plante dépend aussi de deux facteurs principaux : le stade de développement végétatif et les conditions environnementales. Leur concentration varie considérablement entre les différentes espèces végétales et au sein de la même espèce où elle dépend du degré de maturité, de l'âge des feuilles, des fleurs et de la saison (**Skadhauge et al., 1997**).

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante, ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), les méthodes culturales, la maturité à la récolte et les conditions de stockage qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que

les polyphénols (Falleh et al., 2008). Ainsi, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (Podsdek, 2007).

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

Les teneurs totales en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins des extraits des deux plantes sont présentées dans les **tableaux 17** et **18**.

Tableau 17. Teneurs totales en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins des extraits de *T. microphylla*.

Extraits	TTP (mg EAG/g ES) ^A	TTF (mg EC/g ES) ^A	TTTC (mg EC/g ES) ^A
Acétate d'éthyle	218.61± 0.56 ^a	89.73± 0.23 ^a	96.39± 0.67 ^a
Méthanol	317.08± 0.86 ^b	172.27± 0.58 ^b	62.14± 0.54 ^b
Aqueux	184.67± 0.38 ^c	66.79± 0.50 ^c	33.08± 0.93 ^c

A : erreur standard de la moyenne de trois essais.

a-c : différences dans les colonnes (les moyennes non suivies de la même lettre sont statistiquement différentes [p< 0,05]).

TTP: teneur totale en phénols, TTF: teneur totale en flavonoïdes, TTTC: teneur totale en tanins condensés.

Tableau 18. Teneurs totales en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins des extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L.

Extraits	TTP (mg EAG/g ES) ^A	TTF (mg EC/g ES) ^A	TTTC (mg EC/g ES) ^A
Acétate d'éthyle	227.27 ± 0.19 ^a	75.75 ± 0.29 ^a	35.55 ± 0.25 ^a
Méthanol	248.93 ± 0.34 ^b	90.18 ± 0.20 ^b	37.68 ± 0.12 ^b
Aqueux	174.82 ± 0.38 ^c	66.43 ± 0.19 ^c	44.60 ± 0.17 ^c

A : erreur standard de la moyenne de trois essais.

a-c Différences dans les colonnes (les échantillons non connectés par la même lettre sont statistiquement différents à $p < 0,05$).

TTP: teneur totale en phénols, TTF: teneur totale en flavonoïdes, TTTC: teneur totale en tanins condensés.

5. Évaluation *in vitro* des activités biologiques des différents extraits des deux plantes

5.1. Évaluation du potentiel antioxydant des extraits

Afin d'évaluer le potentiel antioxydant des différents extraits des parties aériennes de *T. microphylla* et *A. judaica*, l'utilisation de plusieurs tests et méthodes sont nécessaires. Elles sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation ou au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux, souvent en donnant une forme H. (Marc et al., 2004). Ainsi, nous avons combiné cinq techniques complémentaires (les plus citées dans la littérature) à savoir : CAT, DPPH, ABTS, FRAP et β Carotène.

5.1.1. Détermination de la capacité antioxydante totale (CAT)

La méthode au phosphomolybdène est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par les composés antioxydants et la formation d'un complexe phosphate de couleur verte / Mo (V) avec une absorption maximale à 695 nm (Prieto et al., 1999).

La capacité antioxydante totale (CAT) des différents extraits des espèces végétales étudiées est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide gallique comme référence (Figure 20).

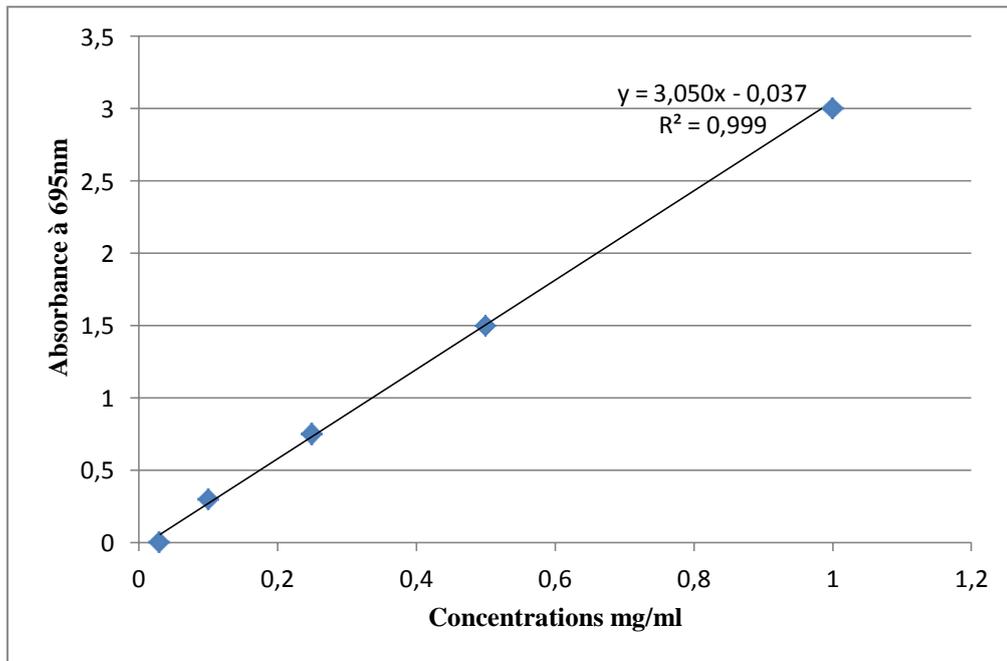


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la mesure de la capacité antioxydante totale.

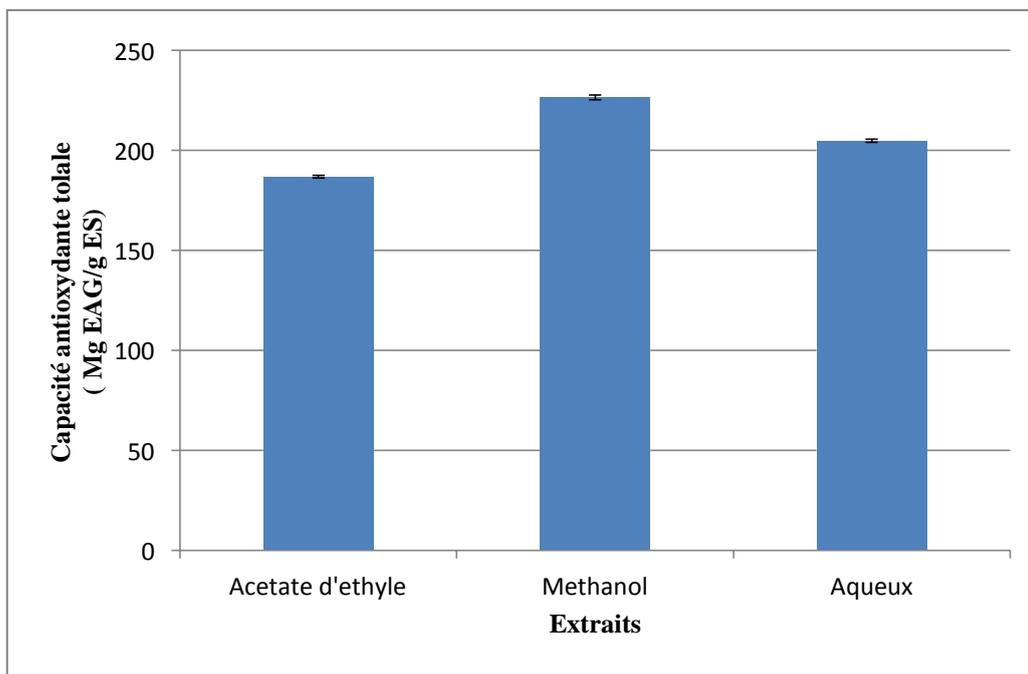


Figure 21: Capacité antioxydante totale des extraits bruts de la partie aérienne de *T.microphylla*.

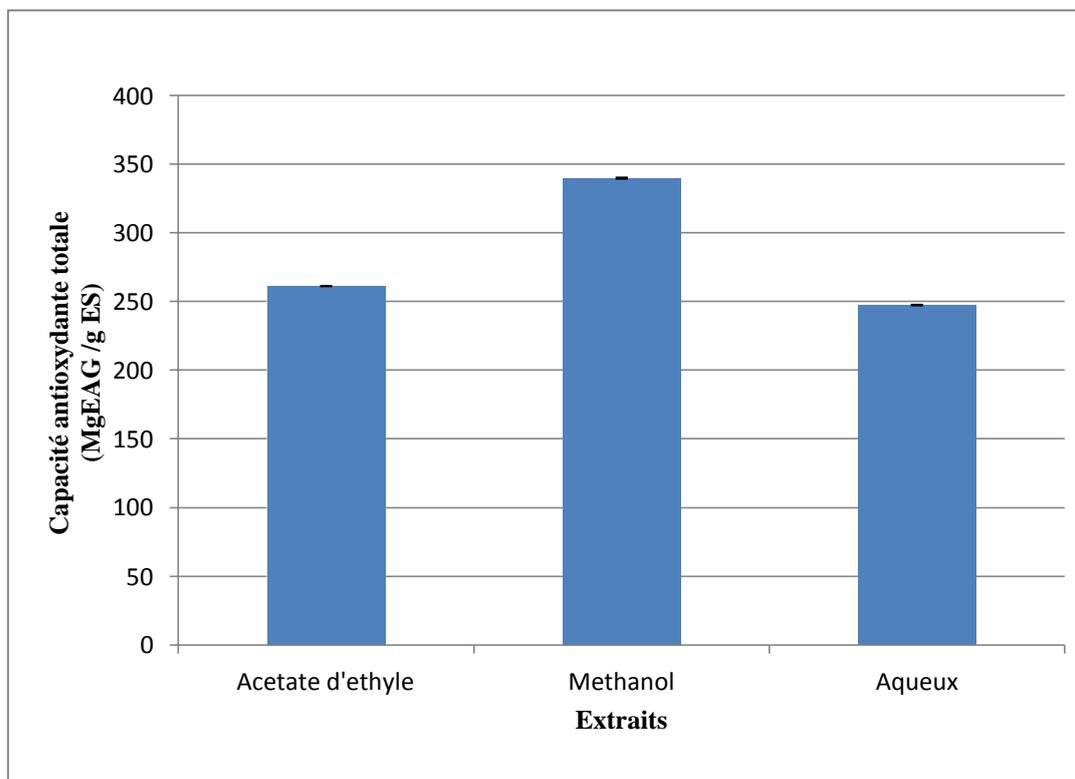


Figure 22 : Capacité antioxydante totale des extraits bruts de la partie aérienne de *A. judaica*.

Les **figures 21 et 22** montrent que tous les extraits de *T. microphylla* et *A. judaica* présentent des activités antioxydantes différentes. On remarque que l'extrait MeOH donne la meilleure valeur de l'ordre de $226,4 \pm 1,15$ mg EAG/g ES pour la plante *T. microphylla* et $339,63 \pm 0,72$ mg EAG/g ES pour la plante *A. judaica*.

Les résultats ont indiqué que la CAT des extraits MeOH et Aq de la plante *T. microphylla* (respectivement $226,40 \pm 1,15$ et $204,76 \pm 0,76$ mg EAG/g ES) est supérieure à celle de l'extrait AcOEt ($186,75 \pm 0,69$ mg EAG/g ES) (**Figure 21**).

La classification des différents extraits de la plante *T. microphylla* par ordre décroissant de capacité antioxydante totale est la suivante: MeOH > Aq > AcOEt.

Belyagoubi-Benhammou et al. (2014) ont obtenu une valeur de CAT de 14,56 mg d'équivalents d'acide ascorbique/g ES

Pour la plante *A. judaica* subsp. *sahariensis* L., les résultats de la **figure 22** ont indiqué que l'extrait MeOH a la CAT la plus élevée, avec une valeur de $339,63 \pm 0,72$ mg d'EAG/g ES. La CAT la plus faible a été trouvée dans l'extrait Aq avec une valeur de $247,24 \pm 0,29$ mg d'EAG/g ES. L'étude réalisée par **Megdiche-Ksouri et al. (2015)** indique que la CAT de l'extrait MeOH de *A. judaica* est inférieure à celle de l'extrait MeOH des parties aériennes de *A. campestris*.

La classification des différents extraits de la plante *A. judaica* par ordre décroissant de capacité antioxydante totale est la suivante: MeOH>AcOEt>Aq.

La différence d'activité antioxydante observée dans les extraits d'AcOEt, MeOH et Aq des deux plantes *T. microphylla* et *A. judaica*., peut être attribuée à la variabilité des quantités phénoliques totales dans ces extraits, mais aussi à la diversité structurale ainsi qu'aux interactions dans les extraits des composés phénoliques (Al-Mustafa et Al-Thunibat, 2008; El-Sayed et al., 2013).

5.1.2. Test de l'activité antioxydante au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) par dosage spectrophotométrique

Le pourcentage d'inhibition de DPPH est calculé par la méthode colorimétrique à différentes concentrations. Les figures 23 et 24 montrent la capacité des différents extraits à agir contre le DPPH•, cette capacité est exprimée par les valeurs d'IC₅₀ (µg/mL) de chaque extrait.

L'extrait MeOH de *T. microphylla* a une activité de piégeage du radical DPPH plus élevée par rapport aux autres extraits, avec une IC₅₀ de $7,50 \pm 0,21 \mu\text{g ml}^{-1}$ alors que les extraits AcOEt et Aq ont donné une IC₅₀ de $9,86 \pm 0,11 \mu\text{g / ml}^{-1}$ et $12,80 \pm 0,23 \mu\text{g / ml}^{-1}$ respectivement. L'activité de tous les extraits est inférieure à la quercétine (IC₅₀ de $4,67 \pm 0,03 \mu\text{g / ml}^{-1}$), à l'acide ascorbique (IC₅₀ de $5,16 \pm 0,03 \mu\text{g / ml}^{-1}$) et au BHT (IC₅₀ de $5,32 \pm 0,02 \mu\text{g / ml}^{-1}$).

La figure 23 montre qu'à la concentration 10 µg/ml, l'extrait MeOH de la partie aérienne de *T. microphylla* enregistre le pourcentage d'inhibition le plus élevé (60%) suivi par l'extrait AcOEt (50%) et l'extrait Aq (30%).

Ces résultats corroborent avec ceux trouvés par Benhamou et al. (2009) (IC 50 de l'extrait MeOH des tiges de *T. microphylla* est de 7.82 µg / ml).

Par la même méthode, Kerbab et al. (2014) ont trouvé la valeur IC₅₀ de 180,80 µg/ml pour l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *T. microphylla*.

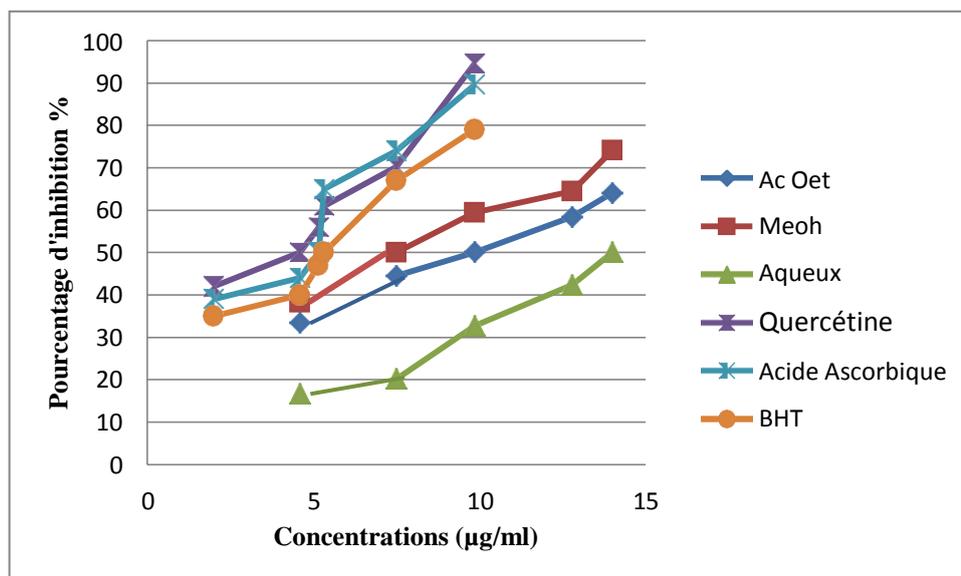


Figure 23 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des différents extraits de la partie aérienne de *T.microphylla*.

La **figure 24** montre que le pourcentage d'inhibition à la concentration 10 µg/ml de l'extrait MeOH de la partie aérienne de *A. judaica* est le plus élevé (50 %) suivi par l'extrait AcOEt (48%) et l'extrait Aq (30%).

Les extraits étudiés de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L. montrent une activité de balayage dépendante de la concentration. Les extraits MeOH et AcOEt ont montré un pouvoir réducteur plus important avec des valeurs de IC₅₀ de $10,23 \pm 0,09 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ et $11,62 \pm 0,31 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ respectivement par rapport à l'extrait Aq ($15,67 \pm 0,18 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$). L'activité de tous les extraits est inférieure à la quercétine (IC₅₀ de $04,67 \pm 0,03 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$), à l'acide ascorbique (IC₅₀ de $5,164 \pm 0,03 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$) et au BHT (IC₅₀ de $05,32 \pm 0,02 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$). Par ailleurs, des études précédentes des potentiels de balayage du radical DPPH sont rapportées pour certains extraits de parties aériennes de *A. judaica* L. tels que l'AcOEt (IC₅₀ de $61,9 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$) et le MeOH (IC₅₀ de $158 \mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$) (**Bakr, 2014; El-Naggar et al., 2015**). Nos résultats de l'IC₅₀ sont nettement meilleurs à neutraliser le radical DPPH.

Les valeurs d'IC₅₀ nous permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits; nous rappelons que plus l'IC₅₀ est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

En comparaison avec les antioxydants standards, les extraits bruts testés s'avèrent moins actifs.

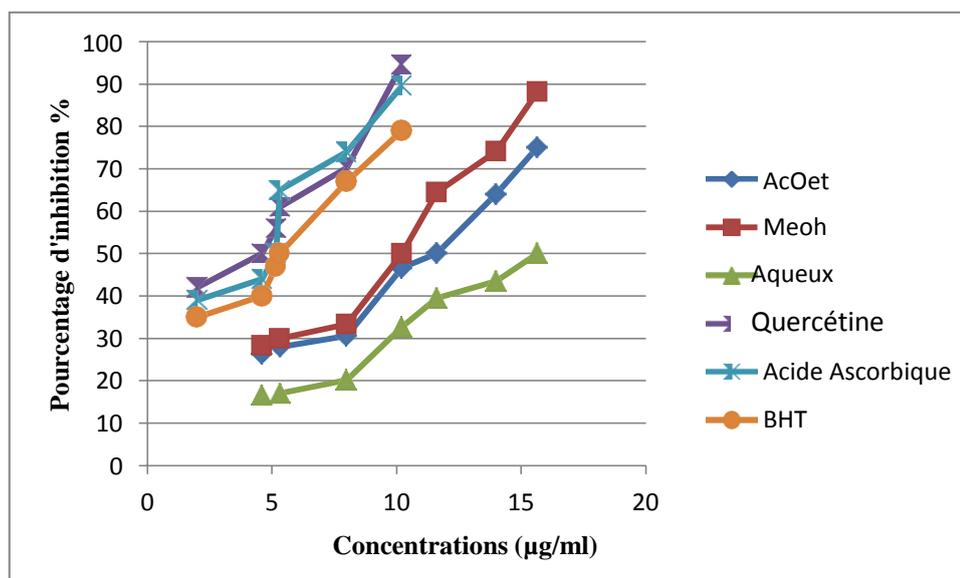


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des différents extraits de la partie aérienne de *Artemisia judaica*.

5.1.3. Mesure de l'activité inhibitrice du radical ABTS+

L'activité antioxydante des différents extraits des parties aériennes de *T. microphylla* et *A. judaica* est déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS•+, obtenu à partir de ABTS comparativement aux antioxydants de référence BHT et Trolox.

Les **figures 25** et **26** illustrent la courbe représentative du pourcentage d'inhibition du radical ABTS en fonction des concentrations des extraits testés et les standards, de ces courbes sont déduites l'IC50.

Les contrôles positifs Trolox et BHT utilisés, ont montré un effet antiradicalaire plus puissant que la plupart des extraits, les valeurs d'IC50 de ces standards sont de $2,43 \pm 0,03$ et $3,55 \pm 0,02 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivement.

D'après les résultats représentés dans **la figure 25**, on observe qu'à une concentration de 1 mg/ml , les extraits MeOH et AcOEt de *T. microphylla* ont montré la capacité inhibitrice la plus élevée avec des valeurs de IC50 de $15,80 \pm 0,40 \mu\text{g ml}^{-1}$ et de $17,80 \pm 0,35 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivement. L'extrait Aq s'est révélé être le plus faible dans le piégeage des cations de radicaux ABTS•+ (IC50 de $31,10 \pm 0,71 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Dahamna et al. (2015) ont également étudié l'effet antioxydant des extraits Aq et éthanoliques préparés à partir des feuilles et des fleurs de *T. microphylla*, les valeurs IC50 sont de l'ordre de 0,39 et 0,67 µg/ml obtenues pour les deux extraits respectivement.

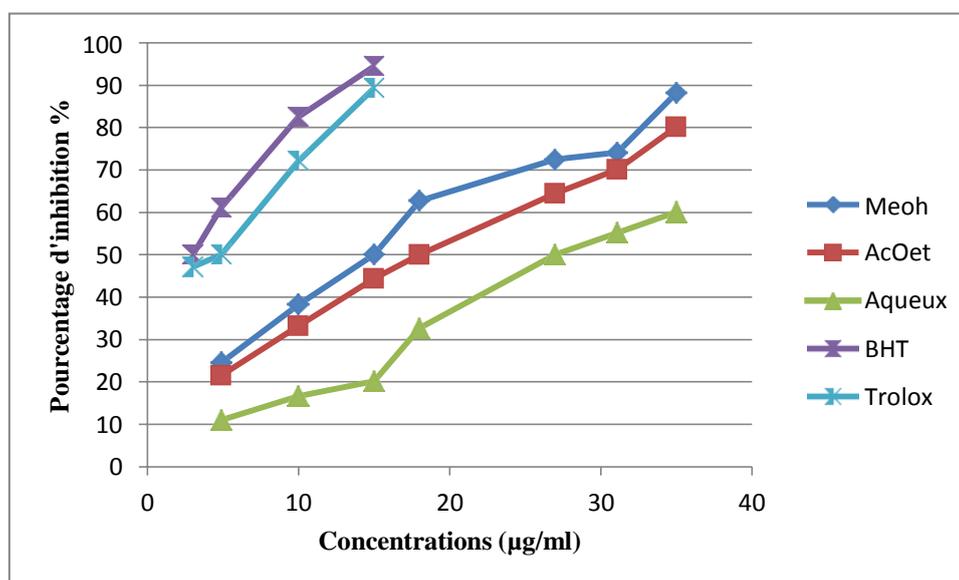


Figure 25: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ des différents extraits de la partie aérienne de *T. microphylla*.

Concernant *A. judaica* subsp. *sahariensis* L. et toujours selon le test ABTS et la valeur IC50, le potentiel de piégeage des radicaux libres le plus élevé a été trouvé dans les extraits MeOH et AcOEt à une concentration de 1mg/ml, avec des valeurs de IC50 de $15,07 \pm 0,16 \mu\text{g ml}^{-1}$ et $18,09 \pm 0,19 \mu\text{g / ml}$, respectivement. L'extrait Aq présente l'activité la plus faible (IC50 de $27,23 \pm 0,17 \mu\text{g / ml}$). Les contrôles positifs Trolox et BHT ont un effet plus important (IC50 de $2,43 \pm 0,03 \mu\text{g ml}^{-1}$ et $3,55 \pm 0,02 \mu\text{g / ml}$), respectivement (**Figure26**). Dans le même système de test, les valeurs de l'IC50 se sont avérées être de 55 et 132 µg / ml dans des extraits des parties aériennes de *A. sieberi* (Irshaid et al., 2014).

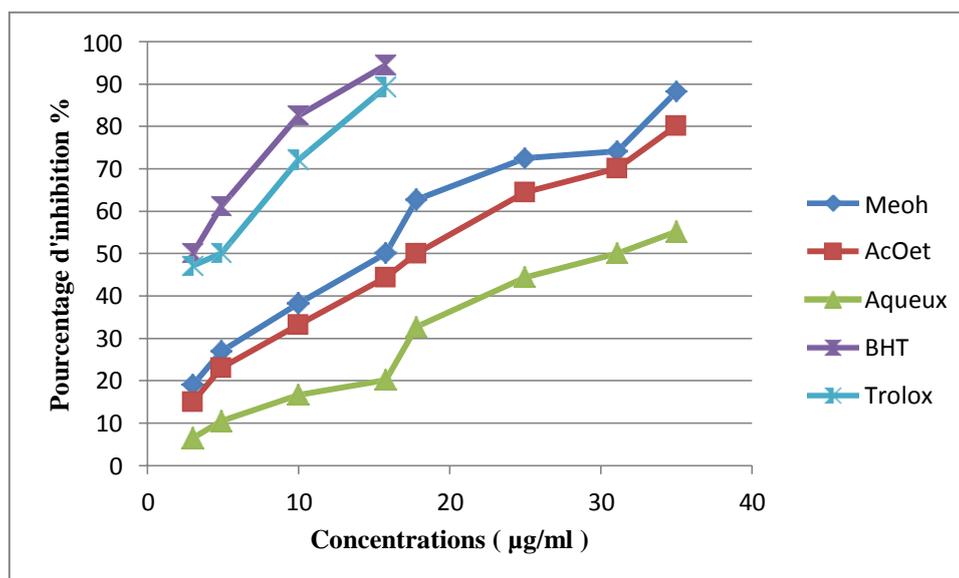


Figure 26 : Pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$ en fonction des concentrations des différents extraits de la partie aérienne de *Artemisia judaica*.

5.1.4. Mesure du pouvoir réducteur du fer

Plusieurs études antérieures ont montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle, son principe est basé sur la capacité d'un composé à céder un électron

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes induit la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'intensité de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung et al., 2002**).

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits de la partie aérienne des deux plantes étudiées. Les valeurs obtenues ont permis de tracer un histogramme pour chaque extrait. Comme pour l'activité antiradicalaire, la concentration de l'échantillon (des acides phénoliques ou de standard) a un effet hautement significatif sur le pouvoir réducteur.

Les résultats obtenus dans la **figure 27** montrent la capacité de réduction de fer. Les différents extraits présentent une faible activité comparée aux contrôles positifs (BHA et Trolox) utilisés comme antioxydants de référence, ils ont montré un fort pouvoir réducteur de l'ion fer (CE_{50} de $3,01 \pm 0,02$ et $4,89 \pm 0,02 \mu g ml^{-1}$, respectivement). Nous constatons que l'extrait MeOH de *T. microphylla* détient le meilleur pouvoir réducteur (CE_{50} de $30,44 \pm 0,58 \mu g ml^{-1}$), suivi de l'extrait AcOEt (CE_{50} de $38,25 \pm 0,55 \mu g ml^{-1}$). La valeur de CE_{50} la plus basse est enregistrée avec l'extrait Aq (CE_{50} de $43,89 \pm 0,02 \mu g ml^{-1}$).

Benhammou et al. (2009) ont évalué le pouvoir réducteur de l'extrait aq obtenu à partir des feuilles, la valeur de la CE50 trouvée est de 690 µg/ml.

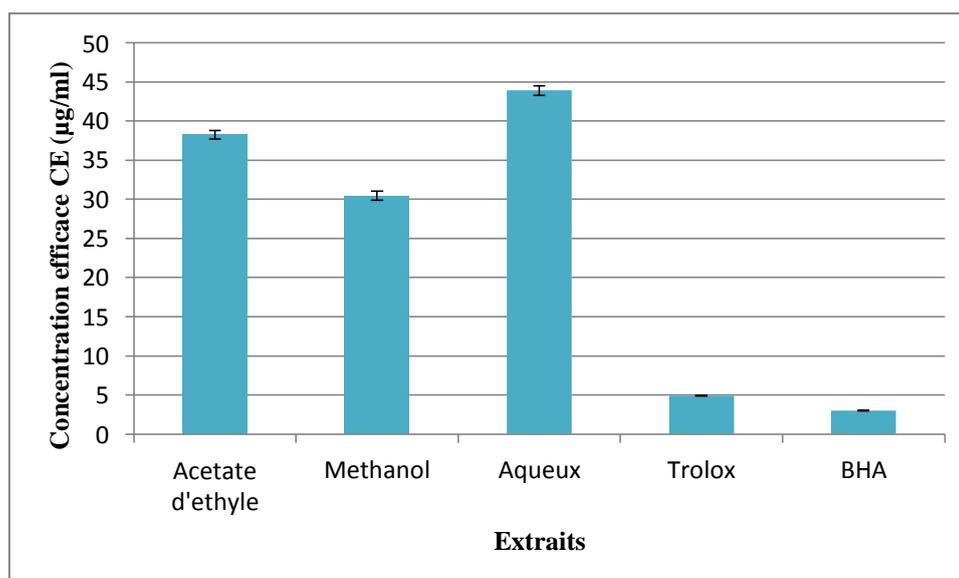


Figure 27: Mesure du pouvoir réducteur des différents extraits de la partie aérienne de *Thymelaea microphylla*.

Concernant *A.judaica*, les résultats du pouvoir réducteur sont présentés dans la **figure 28**. L'activité la plus élevée est notée pour l'extrait MeOH (CE50 de $35,19 \pm 0,15$ µg / ml), suivie de AcOEt (CE50 de $43,90 \pm 0,81$ µg / ml) et l'extrait Aq (CE50 de $57,52 \pm 0,04$ µg / ml). Les standards positifs BHA et Trolox ont montré une CE plus importante (CE50 de $3,01 \pm 0,02$ et $4,89 \pm 0,02$ µg / ml respectivement). Dans une étude de **Megdiche-Ksouri et al. (2015)** concernant l'extrait méthanolique des parties aériennes de *A. campestris*, l'activité réductrice trouvée est moins importante que celle de notre présente étude

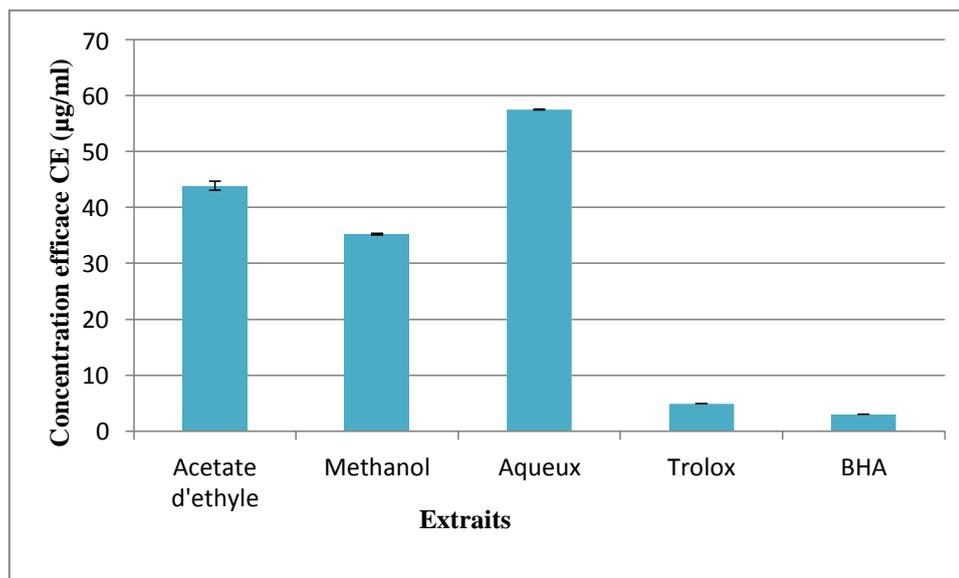


Figure 28: Mesure du pouvoir réducteur des différents extraits de la partie aérienne de *Artemisia judaica*.

Les résultats obtenus corroborent avec le fait que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons (**Ozturk et al., 2007**).

Selon **Hinneburg et al. (2006)**, le pouvoir réducteur d'un extrait peut être lié à la capacité des substances à transférer des électrons dans le milieu réactionnel. Par contre, l'activité scavenger d'un extrait peut être attribuée à la structure de ses composés actifs qui déterminent leur capacité à céder un proton (**Guelcin et al., 2004**) ce qui pourrait être à l'origine des résultats observés.

L'attribution exacte de la capacité antioxydante à un composé ou un petit groupe de composants dans un extrait de plante est une tâche difficile, puisque l'activité efficace dépend de plusieurs facteurs tels que la concentration, les formes isomériques et l'interaction synergique avec d'autres composants (**Almela et al., 2006**). Les extraits obtenus en utilisant des solvants de haute polarité semblent considérablement plus efficaces que ceux obtenus en utilisant des solvants de basse polarité.

La polarité des solvants change la capacité de dissoudre un groupe choisi de composés antioxydants, ce qui influe l'évaluation de l'activité anti-oxydante (**Hayouni et al., 2007 ; Turkmen et al., 2007**). La majorité des travaux publiés portant sur les plantes choisies pour cette étude se limitent à l'évaluation de la capacité antioxydante des huiles essentielles. Très peu de travaux sur l'activité antioxydante des extraits non volatils ont été rapportés dans la littérature.

L'effet antioxydant des extraits AcOEt, MeOH et Aq est probablement dû à la présence de groupes hydroxyles dans la structure. Des études antérieures ont montré qu'une augmentation du nombre de groupes OH dans la structure chimique des composés phénoliques les rend adaptés aux réactions de piégeage des radicaux libres (Zhu et al., 2010). En outre, la disposition des groupes OH autour de la structure phénolique est également nécessaire pour les réactions de piégeage de radicaux (Moure et al., 2001).

Les résultats de cette étude préliminaire montrent que les tests utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante sont en bonne corrélation. On constate la même relation entre les valeurs issues des quatre tests. En effet, les extraits qui possèdent les meilleurs pouvoirs piègeurs vis-à-vis des radicaux libres (DPPH et ABTS+) montrent également les meilleures capacités réductrices du Fe^{3+} . Cela témoigne visiblement de la présence dans nos extraits des molécules antioxydantes pouvant intervenir par deux types de mécanisme réactionnel. Il est à signaler que les réactions mises en jeu peuvent différer d'un test à l'autre. Pour le test PR (pouvoir réducteur), il s'agit d'une réduction du Fe^{3+} donc basé exclusivement sur un transfert d'électrons. Concernant les tests DPPH et ABTS+, ces deux radicaux peuvent être neutralisés soit par réduction directe via des transferts d'électrons ou par balayage radicalaire via un transfert d'un atome d'hydrogène (Kassi et al., 2020).

Le potentiel antioxydant des extraits bruts de la plante *T. microphylla* mesuré par le dosage CAT, DPPH, ABTS⁺, FRAP est présenté dans le **tableau 19**.

Tableau 19. Activité antioxydante des extraits de *T. microphylla* par différentes méthodes.

Extraits	CAT (mgEAGg ⁻¹ ES) ^{B,E}	DPPH [*] IC ₅₀ (µgmL ⁻¹) ^{B,C}	ABTS ⁺⁺ IC ₅₀ (µgmL ⁻¹) ^{B,C}	PRA CE ₅₀ (µgmL ⁻¹) ^{B,D}
Acétate d'éthyle	186.75± 0.69 ^a	9.86± 0.11 ^a	17.80± 0.35 ^a	38.25± 0.55 ^a
Méthanol	226.40± 1.15 ^b	7.50± 0.21 ^b	15.80± 0.40 ^b	30.44± 0.58 ^b
Aqueux	204.76 ± 0.76 ^c	12.80 ± 0.23 ^c	31.10 ± 0.71 ^c	43.89 ± 0.02 ^c
Quercétine ^A	-	4.67 ± 0.03 ^d	n.t.	n.t.
Acide ascorbique ^A	-	5.16 ± 0.03 ^{d,e}	n.t.	n.t.
BHT ^A	-	5.32 ± 0.02 ^e	3.55 ± 0.02 ^d	n.t.
BHA ^A	-	n.t.	n.t.	3.01 ± 0.02 ^d
Trolox ^A	-	n.t.	2.43 ± 0.03 ^d	4.89 ± 0.02 ^d

^A : Composés utilisés comme contrôle positif.

^B : Erreur standard de la moyenne de trois essais.

^C : Concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres.

^D : Concentration efficace à laquelle l'absorbance est égale à 0,5.

a-c : Différences dans les colonnes (les échantillons non connectés par la même lettre sont statistiquement différents à p <0,05).

^E : Capacité antioxydante totale (CAT) exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique g-1 d'extrait sec (mg EAG/g de ES)

n.t. : non testé.

a-e : Différences dans les colonnes (les échantillons non connectés par la même lettre sont statistiquement différents à p <0,05).

Le potentiel antioxydant des extraits bruts de la plante *A. judaica* mesuré par le dosage CAT, DPPH, ABTS⁺, FRAP est présenté dans le **tableau 20**.

Tableau 20. Activité antioxydante des extraits de *A. judaica* subsp. *sahariensis* L. par différentes méthodes.

Extraits	CAT (mg EAG/g ES) ^{B,E}	DPPH IC ₅₀ (µg/mL) ^{B,C}	ABTS ⁺ IC ₅₀ (µg/mL) ^{B,C}	PRA CE ₅₀ (µg/mL) ^{B,D}
Acétate d'éthyle	261.06 ± 0.19 ^a	11.62 ± 0.31 ^a	18.09 ± 0.19 ^a	43.90 ± 0.81 ^a
Méthanol	339.63 ± 0.72 ^b	10.23 ± 0.09 ^b	15.07 ± 0.16 ^b	35.19 ± 0.15 ^b
Aqueux	247.24 ± 0.29 ^c	15.67 ± 0.18 ^c	27.23 ± 0.17 ^c	57.52 ± 0.04 ^c
Quercétine ^A	-	4.67 ± 0.03 ^d	n.t.	n.t.
Acide ascorbique ^A	-	5.16 ± 0.03 ^d	n.t.	n.t.
BHT ^A	-	5.32 ± 0.02 ^d	3.55 ± 0.02 ^d	n.t.
BHA ^A	-	n.t.	n.t.	3.01 ± 0.02 ^d
Trolox ^A	-	n.t.	2.43 ± 0.03 ^e	4.89 ± 0.02 ^e

^A : Composés utilisés comme contrôle positif.

^B : Erreur standard de la moyenne de trois essais.

^C : Concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres.

^D : Concentration efficace à laquelle l'absorbance est égale à 0,5.

a-c : Différences dans les colonnes (les échantillons non connectés par la même lettre sont statistiquement différents à p < 0,05).

^E : Capacité antioxydante totale (CAT) exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique g-1 d'extrait sec (mg EAG/g de ES)

n.t. : non testé.

a-e : Différences dans les colonnes (les échantillons non connectés par la même lettre sont statistiquement différents à p < 0,05).

5.1.5. Inhibition du blanchiment du β-carotène/ acide linoléique

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β-carotène/acide linoléique est proportionnel à la concentration. Tous les extraits des plantes inhibent le blanchiment du β-carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libres.

La **Figure 29** montre le changement d'absorbance du β -carotène à 490 nm en présence des extraits de *T. microphylla*, BHT et du contrôle négatif.

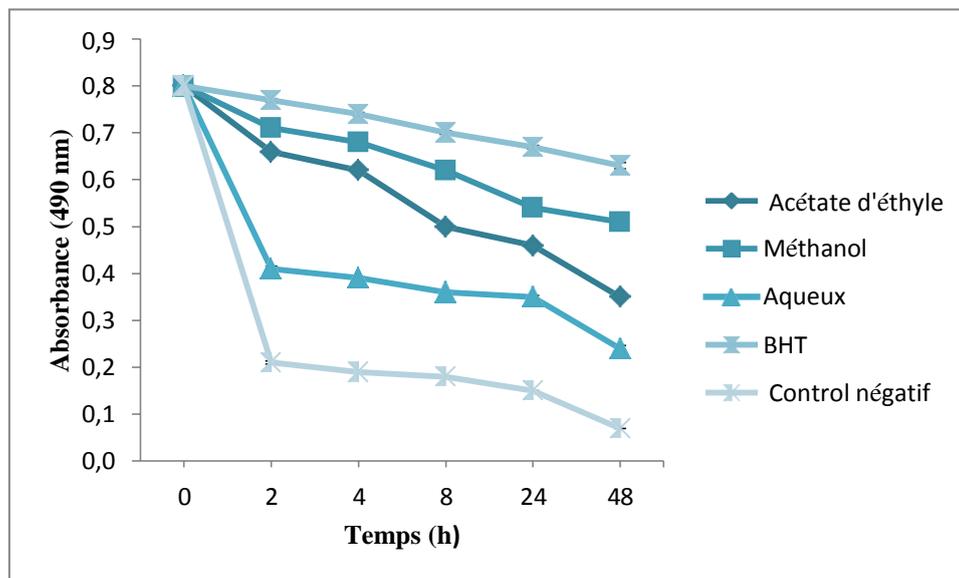


Figure 29: Changement d'absorbance du β -carotène à 490 nm en présence d'extraits de *T. microphylla*, BHT et du contrôle négatif.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard de la moyenne des mesures en triplicata.

La **figure 30** illustre les différents pourcentages d'inhibition du blanchiment du β carotène à différentes concentrations, en présence des extraits de *T.microphylla*, de BHT et d'un contrôle négatif.

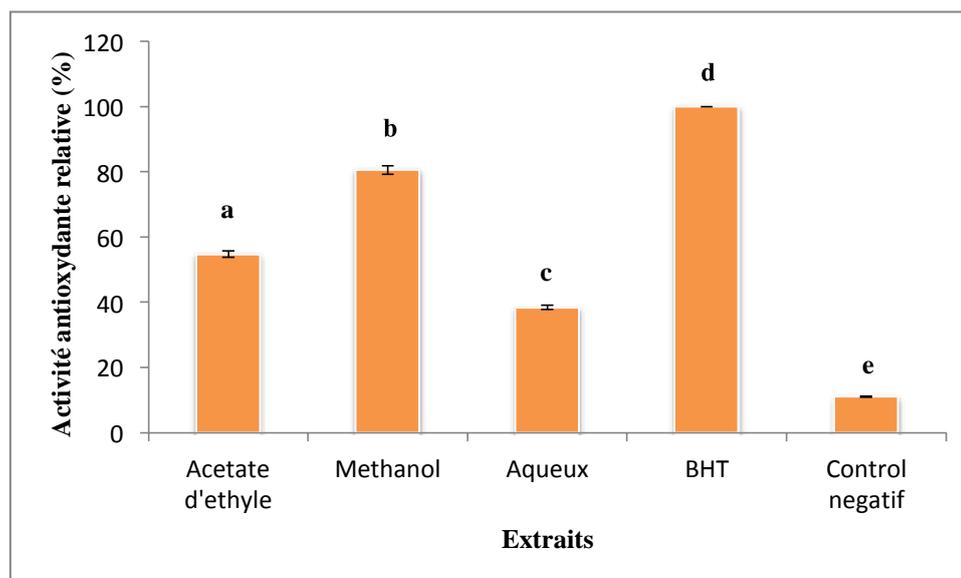


Figure 30: Activité antioxydante relative des extraits de *T. microphylla*, BHT et contrôle négatif.

Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard de la moyenne des mesures en triplicata $p < 0,05$.

La **Figure 31** montre le changement d'absorbance du β -carotène à 490 nm en présence des extraits de *Artemisia judaica*, BHT et du contrôle négatif.

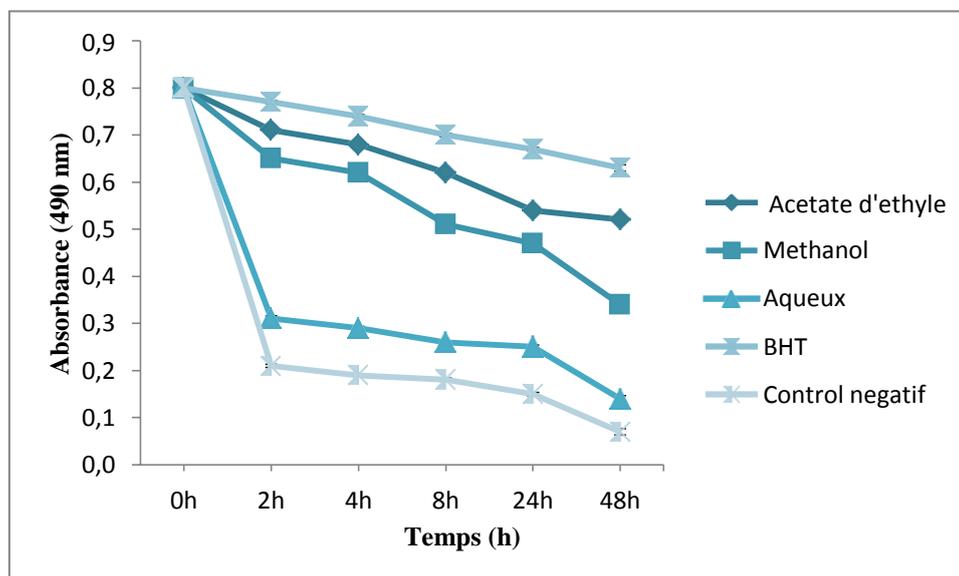


Figure 31 : Changement d'absorbance du β -carotène à 490 nm en présence des extraits de *Artemisia judaica*, BHT et du contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard de la moyenne des mesures en triplicata.

La **figure 32** illustre les différents pourcentages d'inhibition du blanchiment du β carotène à différentes concentrations en présence d'extraits de *A. Judaica* subsp. *sahariensis* L., de BHT et d'un contrôle négatif.

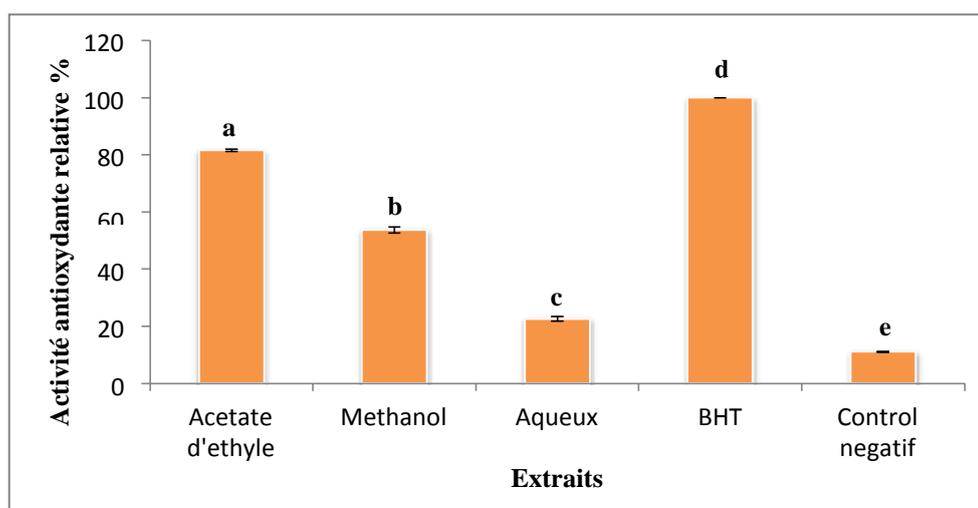


Figure 32 : Activité antioxydante relative des extraits de *A. Judaica* subsp. *sahariensis* L., BHT et contrôle négatif. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard de la moyenne des mesures en triplicata $p < 0,05$.

La capacité d'inhibition suit la même trajectoire que celle des méthodes citées ci-dessus. L'antioxydant standard BHT a montré la capacité d'inhibition la plus élevée (**Figure 30**). On peut voir sur la **figure 29** que l'extrait MeOH de *A. Judaica* (riche en composés phénoliques et en flavonoïdes) est plus actif que les autres extraits avec une inhibition de 80,54%.

La capacité d'inhibition mesurée dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *T. microphylla* après 48 h est meilleure que celle des extraits MeOH et Aq (**figure 31**). Cependant, l'antioxydant synthétique BHT présente la plus grande capacité d'inhibition à 48 h. Par ailleurs, on peut voir sur la **figure 32** que l'extrait le moins polaire AcOEt (81,59%) est plus actif que les extraits polaires MeOH (53,70%) et Aq (22,61%). En outre, la forte activité enregistrée dans l'extrait AcOEt peut s'expliquer par la présence élevée de kaempférol et d'apigénine dans cet extrait. D'après **Shariffar et al. (2009)**, ces deux composés phénoliques inhiberaient l'oxydation du β -carotène.

Il est relativement difficile de comparer les résultats de ce test avec ceux de la littérature. En effet, il existe une assez grande variation dans le choix des solvants d'extraction et dans celle de la méthode de mesure de l'activité antioxydante.

Selon **Frankel et Meyer (2000)**, le test de blanchiment du β carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau. Ces deux auteurs ont proposé que les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Selon **Ferreria et al. (2006)**, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques.

D'une façon générale, le comportement antioxydant des composés dans les émulsions n'a pas encore été complètement expliqué (**Schwarz, 2000**). Les extraits bruts obtenus à partir des deux plantes *T.microphylla* et *A.judaica* représentent un mélange de composés différents, principalement apolaire pour les extraits AcOEt et polaire pour les extraits MeOH et Aq.

5.2. Activité inhibitrice de l'AChE : méthode bioautographique au Fast Blue B

L'activité inhibitrice de l'enzyme est absente pour tous les extraits de la partie aérienne des deux plantes testées.

Djermane et al. (2020) ont trouvé que les extraits de *Thymelaea hirsuta* présentent une inhibition significative contre l'enzyme AChE.

Concernant l'espèce *Artemisia judaica*, nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Boutiti et Zellagui (2019)**.

Une étude a montré que l'extrait éthanolique de cette plante possède une activité inhibitrice contre cette enzyme chez les pucerons à forte concentration (**Owokotomo et al., 2015**). Ces auteurs expliquent que l'inhibition de l'AChE est certainement due à la présence prédominante de sesquiterpènes dans les extraits.

D'autres recherches ont prouvé que certains flavonoïdes peuvent fortement inhiber l'enzyme AChE (**Uriarte-Pueyo et Calvo, 2018**); cela indique que nos extraits sont pauvres en certains types de flavonoïdes.

5.3. Évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de plantes

5.3.1. Méthode de diffusion sur disque

Les trois extraits de *T. microphylla* et *A. judaica* sont testés pour leurs effets antibactériens contre les souches standard de *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. L'effet des antibiotiques utilisés comme témoins positifs et les diamètres des zones d'inhibition pour chaque souche sont représentés dans les **tableaux 21** et **22**, de même que les résultats obtenus sur nos extraits.

Tableau 21. Activité antibactérienne des extraits de *T.microphylla* estimée par le diamètre d'inhibition (mm).

Extraits	<i>S.aureus</i> ^B	<i>E.coli</i> ^B	<i>P.mirabilis</i> ^B	<i>P.vulgaris</i> ^B	<i>P.aeruginosa</i> ^B
Acétate d'éthyle	14.00 ± 0.58 ^a	n.a.	n.a.	14.00 ± 0.58 ^a	n.a.
Méthanol	26.67 ± 0.67 ^b	n.a.	7.33 ± 0.33 ^a	20.67 ± 0.67 ^b	n.a.
Aqueux	36.00 ± 0.58 ^c	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Oxacilline ^A	n.a.	n.a.	29.33 ± 0.33 ^b	n.a.	n.a.
Gentamicine ^A	37.33 ± 0.67 ^c	8.67 ± 0.33 ^c	n.a.	24.33 ± 0.33 ^c	n.a.
Ampicilline ^A	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7.33 ± 0.33

K. pneumoniae : n.a pour l'ensemble des extraits.

^A : composés utilisés comme contrôle positif.

^B : Erreur standard de la moyenne de trois répétitions.

n.a.: non actif.

^{a-c} : Différences au sein des colonnes (les échantillons non reliés par la même lettre sont statistiquement différents à p < 0,05).

Tableau 22. Activité antibactérienne des extraits de *A. judaica* estimée par le diamètre d'inhibition (mm).

Extraits	<i>S.aureus</i> ^B	<i>E. coli</i> ^B	<i>P.mirabilis</i> ^B	<i>P.vulgaris</i> ^B	<i>P.aeruginosa</i> ^B
Acétate d'éthyle	21.00 ± 1.00 ^a	19.67 ± 0.67 ^a	10.67 ± 1.20 ^a	n.a.	11.00 ± 0.58 ^a
Méthanol	16.33 ± 0.67 ^b	13.67 ± 0.33 ^b	19.67 ± 0.88 ^b	19.00 ± 0.00 ^a	12.67 ± 0.33 ^a
Aqueux	n.a.	11.33 ± 0.88 ^b	n.a.	22.33 ± 0.67 ^b	n.a.
Oxacilline^A	n.a.	n.a.	29.33 ± 0.33 ^c	n.a.	n.a.
Gentamicine^A	37.33 ± 0.67 ^c	8.67 ± 0.3 ^c	n.a.	24.33 ± 0.33 ^c	n.a.
Amoxicilline^A	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7.33 ± 0.33 ^b

K. pneumoniae : n.a pour l'ensemble des extraits.

^A : Composés utilisés comme contrôle positif.

^B : Erreur standard de la moyenne de trois répétitions.

n.a.: non actif.

^{a-c} Différences au sein des colonnes (les échantillons non reliés par la même lettre sont statistiquement différents à $p < 0,05$).

Le **figure 33** illustre les zones d'inhibition des extraits actifs de *T. microphylla* relatives aux souches sensibles. Nous remarquons que la majorité des extraits testés n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches microbiennes testées et ceci à une concentration de 10 µg/ml. La nature du solvant, la méthode d'extraction ainsi que la quantité des extraits mise dans les disques pourraient être à l'origine de ces résultats.

Par ailleurs, tous les extraits de *T. microphylla* présentent des zones d'inhibition contre *S. aureus* avec une activité élevée pour l'extrait Aq (diamètre inhibiteur de 36,00 ± 0,58 mm) par rapport à l'antibiotique gentamicine (diamètre inhibiteur de 13,00 ± 0,00 mm) (**Tableau 21**). Une activité antibactérienne s'est manifestée avec les extraits AcOEt et MeOH contre *P. vulgaris* (inhibition du diamètre de 14,00 ± 0,58 et 20,67 ± 0,67 mm, respectivement). L'extrait MeOH est également actif contre *P. mirabilis* avec une

inhibition du diamètre de $7,33 \pm 0,33$ mm. Cependant, tous les extraits sont inactifs contre *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Nos résultats sont en concordance avec les travaux de **Ghanem et al. (2014)** qui ont montré l'inactivité des extraits AcOEt des deux parties (aériennes et racines) contre les deux souches à Gram - *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et ceci quel que soit le dosage, et de même l'activité à l'égard de la souche à Gram + *Staphylococcus aureus*.

Contrairement à **Bounab et al. (2018)** qui ont observé une activité de l'huile essentielle de *T. microphylla* contre *E. coli*, par contre aucune activité n'a été enregistrée contre *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Nous avons constaté qu'aucune activité n'a été mise en évidence pour les extraits contre *K. pneumoniae*. De plus, **Dahamna et al. (2015)** ont signalé une activité antibactérienne négative contre *E. coli* et *P. aeruginosa* pour les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles et des fleurs de *T. microphylla*.

Parallèlement, **Noman et al. (2015)** ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait dichlorométhane préparé à partir des parties aériennes de *T. microphylla* contre *S. aureus*, le diamètre de la zone d'inhibition était de 10,25 mm.

La Figure 34 montre les zones d'inhibition des extraits actifs de *Artemisia judaica* relatives aux souches sensibles.

Concernant l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits de *A. Judaica* subsp. *sahariensis* L. contre les souches bactériennes, les résultats obtenus (**tableau 22**) illustrent que les extraits de la plante sont actifs contre les souches bactériennes avec des zones d'inhibition comprises entre $10,67 \pm 1,20$ et $22,33 \pm 0,67$ mm. L'activité la plus importante a été observée contre *P. vulgaris* pour l'extrait Aq dont le diamètre de la zone d'inhibition est de l'ordre de $22,33 \pm 0,67$ mm. L'activité la plus faible a été observée contre *P. mirabilis* pour l'extrait AcOEt dont le diamètre de la zone d'inhibition est de l'ordre de $10,67 \pm 1,20$ mm. En revanche *K. pneumoniae* est la plus résistante aux antibiotiques testés. En effet, cette souche a une résistance à de nombreux antibiotiques (**Nascimento et al., 2000**). En outre, l'extrait AcOEt est inefficace contre *P. vulgaris*, alors que l'extrait Aq est efficace uniquement contre *E. coli* et *P. vulgaris*. Cependant, *E. coli* est une bactérie hautement résistante aux antibiotiques, mais s'est révélée sensible à l'action de l'extrait MeOH ($13,67 \pm 0,33$ mm) et l'extrait AcOEt ($19,67 \pm 0,67$ mm). *P. aeruginosa* se révèle parmi les plus résistantes, cela est lié à leur grande capacité à développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où leur implication fréquente dans les infections hospitalières (**Mann et al., 2000**). Cependant quelques zones d'inhibition

modérées avec l'extrait MeOH (12.67 ± 0.33 mm) et l'extrait AcOEt (11.00 ± 0.58 mm) de *A. judaica* (**tableau 22**) sont enregistrées avec cette souche.

Huang et al. (2005) ont montré dans son étude que l'extrait MeOH de *A. anomala* a une grande activité antibactérienne contre les cinq bactéries testées *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhi*, *P. vulgaris*. L'extrait MeOH est très actif vis-à-vis les bactéries à Gram -.

La présente étude a montré que l'activité antibactérienne de *Artemisia judaica* a été plus prononcée contre les bactéries Gram+ que les bactéries Gram-. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études effectuées sur d'autres espèces végétales (**Saïdana et al., 2008**).

Par ailleurs, **Mohammed et al. (2022)** ont montré que toutes les souches bactériennes testées (bactéries Gram + et bactéries Gram-) sont susceptibles vis-à-vis de l'huile essentielle de *Artemisia judaica* excepté *P. aeruginosa*.

Suite à une étude réalisée par **Bencheqroun et al. (2012)** sur le pouvoir antimicrobien des différents extraits bruts, la concentration de 1/3000 v/v de l'huile essentielle de *Artemisia mesatlantica* est suffisante pour arrêter la croissance de *Bacillus subtilis* (Gram +) qui s'est montrée la plus vulnérable à cette huile essentielle, suivi du *Staphylococcus aureus* (Gram +) et de *Escherichia coli* (Gram -) qui ont été inhibés à partir de la concentration minimale de 1/2000 v/v.

Il apparaît que la souche *Staphylococcus aureus* (Gram +) est la bactérie la plus sensible par comparaison avec les autres souches ; ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram + et les bactéries Gram -. En effet, la paroi cellulaire des bactéries Gram + est constituée par une seule couche alors que la paroi cellulaire du Gram - a une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe.

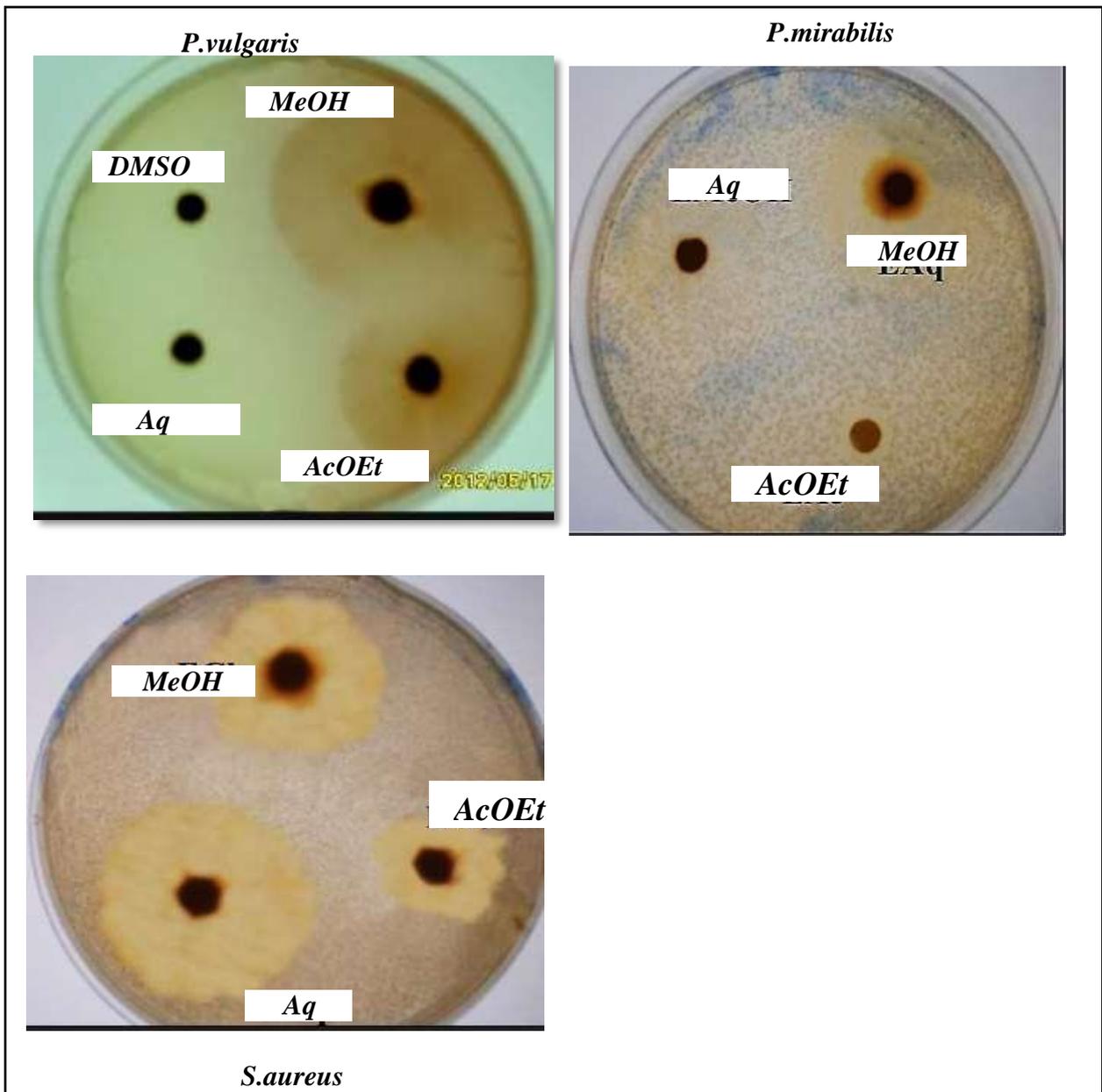


Figure 33: Zones d'inhibition des extraits actifs de *T. microphylla* à une concentration de $(1\text{mg}/\text{ml}^{-1})$ relatives aux souches sensibles.

AcOEt : extrait d'acétate d'éthyle, MeOH : extrait du méthanol, Aq : extrait aqueux, DMSO : diméthylsulfoxyde (contrôle négatif).

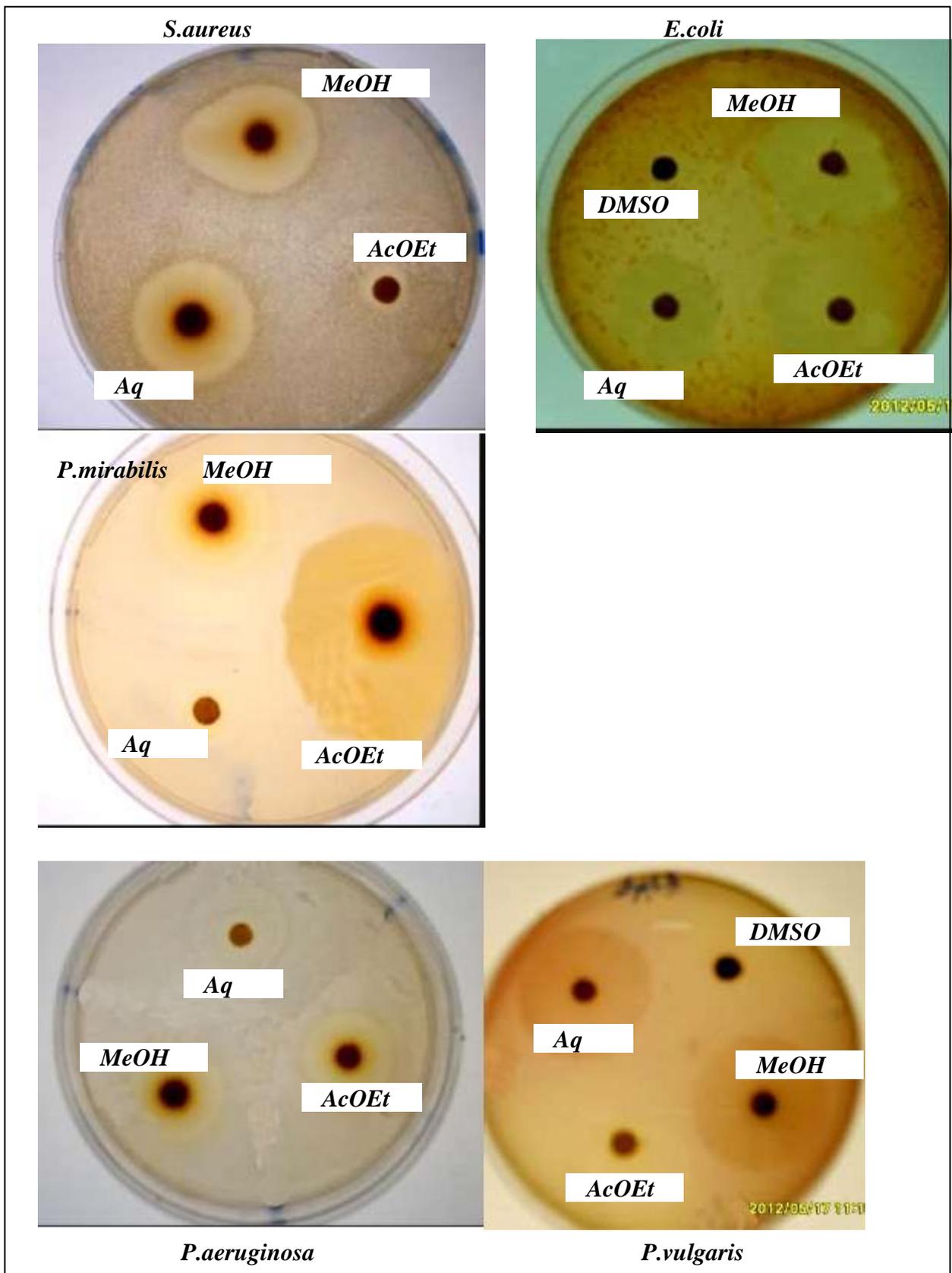


Figure 34: Zones d'inhibition des extraits actifs de *Artemisia judaica* à une concentration de (1 mg/ ml⁻¹) relatives aux souches sensibles.

5.3.2. Méthode de micro-dilution en milieu liquide

D'après **Basli et al. (2012)**, le seuil d'efficacité ou la concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance bactérienne.

Les CMI des extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide, dont les diamètres d'inhibition sont supérieurs ou égaux à 10 mm (choix arbitraire), sont obtenues par la méthode de microdilution en milieu gélosé.

Tableau 23. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en %) des différents extraits de *T.microphylla* (dont les diamètres des zones d'inhibitions sont ≥ 12 mm) relatives aux bactéries testées.

Extraits	AcOEt			MeOH			Aq					
	0,5	0,125	0,0625	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,5	0,25	0,125	0,0625	
Concentrations %												
Bactéries												
<i>S.aureus</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>E.coli</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P.mirabilis</i>	-	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P.vulgaris</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	/	/	/	/
<i>P.aeruginosa</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

AcOEt : extrait d'acétate d'éthyle, MeOH : extrait du méthanol, Aq : extrait aqueux

(+) : Croissance, (-): Pas de croissance, (/): Non testé

Tableau 24. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en %) des différents extraits de *Artemisia judaica* (dont les diamètres des zones d'inhibitions sont ≥ 12 mm) relatives aux bactéries testées.

Extraits	AcOEt				MeOH				Aq			
	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,5	0,25	0,125	0,0625
Concentrations %												
Bactéries												
<i>S.aureus</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	/	/	/	/
<i>E.coli</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>P.mirabilis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	/	/	/	/
<i>P.vulgaris</i>	/	/	/	/	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	/	/	/	/

AcOEt : extrait d'acétate d'éthyle, MeOH : extrait du méthanol, Aq : extrait aqueux

(+) : Croissance, (-): Pas de croissance, (/): Non testé

D'après les résultats obtenus dans les **tableaux 23** et **24**, nous remarquons que cette méthode confirme les résultats obtenus avec la méthode de diffusion sur disque. Les extraits ont révélé des activités antibactériennes variables contre les différentes espèces bactériennes testées.

On note pour la partie aérienne de la plante *T.microphylla* une inhibition avec l'extrait MeOH sur *P.mirabilis* à une concentration égale à 0,5 %.

Tandis que la plus faible concentration 0,125 % est trouvée chez *S. aureus* ATCC 25923 en utilisant l'extrait MeOH et l'extrait Aq et pour *P.vulgaris* avec l'extrait MeOH (**tableau 23**).

Concernant la partie aérienne de la plante *A.judaica*, *E. coli* est inhibée à une concentration égale à 0,25 % avec l'extrait MeOH et l'extrait Aq contrairement à *S. aureus* et *P.vulgaris* qui paraissent les plus sensibles (**Tableau 24**).

Par ailleurs, une concentration minimale de 0,5 % est détectée pour *P.aeruginosa* avec l'extrait AcOEt et l'extrait MeOH, il en est de même pour la bactérie *P. mirabilis* avec l'extrait AcOEt.

La plus faible concentration 0,125 % est trouvée chez *S. aureus* en utilisant l'extrait MeOH et l'extrait Aq, *E. coli* avec l'extrait AcOEt et *P.vulgaris* avec l'extrait MeOH et l'extrait Aq et *P. mirabilis* avec l'extrait MeOH. Pour les bactéries *S. aureus* ATCC 25923 et *P.vulgaris* une concentration de 0,25 % a été détectée avec l'extrait AcOEt.

Les résultats peuvent être interprétés que les bactéries Gram + sont plus sensibles que les bactéries Gram- car la disposition architecturale de la paroi cellulaire des bactéries Gram + est moins complexe que celle des bactéries Gram -. Cette différence structurelle peut rendre les bactéries Gram + plus sensibles (Zeragui et al., 2019). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on cite l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer (Milane, 2004).

La différence légère dans la sensibilité des souches aux extraits Aq et alcoolique peut être expliquée par la dissimilitude dans leur composition, l'alcool permettant une meilleure extraction des composés moins polaires comme quelques dérivés terpéniques (Ali Emmanuel et al., 2002).

Selon Shelef (1983) et Darmadji et al. (1994), la majorité des composés végétaux ayant une activité antimicrobienne sont des polyphénols ayant un effet inhibiteur sur plusieurs espèces bactériennes.

L'activité antibactérienne due aux polyphénols pourrait être aussi liée au degré d'oxydation de ces composés. En effet, les polyphénols sont des composés très susceptibles d'auto-oxydation en présence de l'oxygène de l'air. Cette oxydation se traduit par une polymérisation des monomères tels les monomères de flavonoïdes pour donner des polymères de poids moléculaires élevés qui sont important dans l'activité antimicrobienne des polyphénols, (Karou et al., 2005). L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencées par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée. De même, l'activité antibactérienne de ces extraits peut s'expliquer par la présence de différents constituants

phytochimiques de nature polyphénolique, notamment les flavonoïdes, les biflavonoïdes et les coumarines.

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

Le présent travail a pour but l'étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes : *Thymeleae microphylla* de la famille des Thymelacées et *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* L de la famille des Astéracées, choisies sur la base de leurs usages traditionnels.

L'objectif a été d'apporter des éléments pour la valorisation de certaines propriétés des plantes étudiées, l'identification de leurs principes actifs et la mise au point des méthodes de dosages et d'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour cela, nous avons effectué au préalable un criblage phytochimique des différents groupes de métabolites secondaires contenus dans les deux espèces en question. Les plantes étudiées sont plus ou moins riches en métabolites secondaires ce qui laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes, il s'agit essentiellement de flavonoïdes, polyphénols, saponines, coumarines et tanins.

L'identification chromatographique menée sur les extraits des deux espèces a permis de caractériser les principaux composés phénoliques pour la plante *T. microphylla* ; treize composés phénoliques sont identifiés six flavonoïdes, six acides phénoliques, et un diphenol avec le kaempférol 3-O-rutinoside et l'acide trans-3-hydroxycinnamique en tant que composés principaux parmi les composés phénoliques quantifiés. En outre, le flavonoïde kaempférol 3-O-rutinoside est identifié dans tous les extraits. De même pour la plante de *A. Judaica* subsp, onze composés sont identifiés (quatre flavonoïdes, cinq acides phénoliques et deux stilbènes avec le kaempférol, le resvératrol 3 -O- glucoside, le resvératrol, l'acide trans-3- hydroxycinnamique et l'acide para-coumarique en tant que composés principaux. De plus, le flavonoïde kaempférol est identifié dans tous les extraits, c'est le flavonol le plus dominant dans l'extrait AcOEt.

Afin de quantifier les extraits préparés à partir des parties aériennes des deux plantes *A.judaica* et *T.microphylla*, une analyse quantitative déterminée par des techniques spectrophotométriques UV-visible basée sur le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a été effectuée. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leurs sont attribuées.

Nous avons observé que les teneurs les plus élevées de polyphénols, flavonoïdes et tanins ont été trouvées dans l'extrait MeOH pour les deux espèces.

Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants : capacité antioxydante totale (CAT), piégeage du radical libre DPPH, réduction de fer, l'activité inhibitrice du radical ABTS⁺, et le blanchiment du β -carotène. Nous avons constaté que l'extrait MeOH de *T. microphylla* et *A. judaica* subsp a le meilleur pouvoir réducteur. Concernant *A. judaica* subsp la capacité d'inhibition la plus importante est mesurée dans l'extrait d'acétate d'éthyle.

En outre, l'activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase est négative pour tous les extraits de la partie aérienne des deux plantes testées.

Dans une autre partie, les extraits des deux plantes ont également été soumis a un criblage pour une possible activité antimicrobienne contre les souches standard de *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*, en employant la méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdilution en milieu liquide. Nous avons constaté que tous les extraits de *T. microphylla* présentent des zones d'inhibition contre *S. aureus* avec une activité élevée pour l'extrait Aq ; une activité antibactérienne s'est manifestée avec les extraits AcOet et MeOH contre *P. vulgaris*. L'extrait MeOH est également actif contre *P. mirabilis*. Cependant, tous les extraits sont inactifs contre *E. coli* et *P. aeruginosa*. Concernant l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits de *A. Judaica* subsp. *sahariensis* L. les résultats obtenus illustrent que l'activité la plus importante a été observée contre *P. vulgaris* pour l'extrait Aq. En revanche *K. pneumoniae* est la plus résistante aux antibiotiques testés, En outre, l'extrait AcOEt est inefficace contre *P. vulgaris*, alors que l'extrait Aq est efficace uniquement contre *E. coli* et *P. vulgaris*. Les CMI ont été déterminées à partir des extraits les plus actives en milieu gélosé. De même, une tendance a été montré indiquant que les extraits les plus riches en polyphénols présentent les des activités antimicrobiennes les plus élevés.

L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes des plantes choisies et de sélectionner les familles des composés phénoliques d'intérêt biologique afin de mieux connaître, de valoriser et d'utiliser

ces ressources dans le domaine thérapeutique. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives sont envisagées :

Compléter ce travail par la purification et l'identification de diverses molécules isolées en utilisant des techniques chromatographiques, spectrales et spectrophotométriques.

Détermination de l'activité antiproliférative des extraits de ces plantes sur les cellules cancéreuses.

L'étude de la toxicité de ceux-ci sur différentes lignées cellulaires *in vitro* et sur des modèles utilisant des animaux afin de déterminer la dose thérapeutique et les doses létales

Tester les activités anti-inflammatoire et antidiabétique des deux plantes ; ces activités biologiques répondent aux usages majeurs des plantes selon notre enquête ethnobotanique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdalla S.S., Abu-Zagra M.H., (1987). Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from *Artemisia judaica*, on isolate guinea-pig ileum. *Planta Medica*, 53(4): 322-324.
- Abdelgaleil S., Abbassy M.A., Belal A.S.H., AbdelRasoul M.A.A., (2008). Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. *Bioresource Technology*, 99: 5947-5950.
- Abd-Elhady H .K.,(2012). Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Plant Protection Research*, 52(3):347-352.
- Abu Zarga M., Qauasmeh R., Sabri S., Munsoor M., Abdalla S., (1995). Chemical constituents of *Artemisia arborescens* and the effect of the aqueous extract on rat isolated smooth muscle. *Planta Medica*, 61(3): 242-245.
- Acheuk F., Lakhdari W., Khemais A., Belaid M., Allouane R., Halouane F., (2017). Phytochemical study and bioinsecticidal effect of the crude ethonolic extract of the algerian plant *Artemisia judaica* L. (Asteraceae) against the black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. *Agriculture Forestry*, 63(1): 95-104.
- Aît Youssef M., (2006). *Plantes médicinales de Kabylie*. Ibis Press, Sciences et Techniques. Paris. 349p.
- Albano S.M., Miguel M.G., (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*. 33(2):338-343.
- Al-Gaby A. M., Allam R. R., (2000). Chemical analysis, antimicrobial activity, and the essential oils from some wild herbs in Egypt. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 7(1): 15-23.
- Ali-Emmanuel N., Moudachirou M., Akakpo A. J., Quetin-Leclercq J., (2002). Activités antibactériennes in vitro de *Cassia alata*, *Lantana camara* et

Mitracarpus scaber sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 55(3): 183-187.

- Ali-Shtayeh M., Yaniv Z., Mahajna J., (2000). Ethnobotanical survey in the palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 73: 221-232.
- Allain P., (1996). Les Médicaments. Ed. Estem, Paris. 414p.
- Almela L., Sánchez-Muñoz B, Fernández-López., Roca M.J., Rabe V., (2006). Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. Journal of Chromatography A, 1120(1-2): 221-229.
- Al-Mustafa A.H., Al-Thunibat O.Y., (2008). Antioxidant activity of some jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(3): 351-358.
- Al-Shamaony L, Al Khazraji MS, Twaij H.A., (1994). Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba*. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. Journal of Ethnopharmacology. 43(3): 167-171.
- Amari N.O., Bouzouina M., Berkani A., Lotmani B., (2014). Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsute* L. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4(2):104- 109.
- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J.A., (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry, 84(4): 551-562.
- Anandharajan R., Jaiganesh S., Shankernarayanan N.P., Viswakarma R.A., Balakrishnan A., (2006). *In vitro* glucose uptake activity of *Aegles mameos* and

Syzygium cumini by activation of Glut-4, P13 Kinase and PPAR γ in L6 myotubes. *Phytomedicine*, 13(6): 434-441.

- Aniya Y., Shimabukuro M., Shimoji M., Kohatsu M., Gyamfi M.A., Miyagi C., Kunii D., Takayama F., Egashira T., (2000). Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa islands. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 23(3): 309-312.
- Ardestani A., Yazdanparast R., (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104 (6): 21-29.
- Aruoma O.I., (1999). Antioxidant action of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radical Research*, 30(6): 419-427.
- Baba Aissa F., (1999). *Encyclopédie des plantes utiles: Flore d'Algérie et du Maghreb*. Ed. Librairie moderne, Rouiba. 231p.
- Bakr R.O., (2014). Microscopical and phytochemical investigation of Egyptian *Artemisia judaica* L. var. *sinaitica tackholm* and its free radical scavenging activity. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4): 698-703.
- Bakry F.A., Ragaa T.M., El-Hommosany K., (2011). Biological and biochemical responses of to some extracts of *Biomphalaria alexandrina* of the plants *Solanum siniacum* and *Artemisia judaïca* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 29(2) :174-180.
- Basli M., Chibane K., Madani N., Oukil A., (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10,2-9.

- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Tenckhoff M., (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
 - Becker L.B., (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*, 61(3):461-470.
 - Bencheqroun H.K., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Chaouch A., (2012). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la société Royale des sciences de Liège*, 81, 4-21.
 - Bendali F., Floret C., Le Floch E., Pontanier R., (1990). The dynamics of vegetation and sand mobility in arid regions of Tunisia. *Journal of arid environments*, 18, 21-32.
 - Ben El Mostafa S., Haloui B., Berrichi A., (2001). Contribution à l'étude de la végétation steppique du Maroc oriental: Transect Jerrada-Figuig. *Acta Botanica Malacitana*, 26, 295-301.
 - Benhammou N., Atik-Bekkara F., Coustard J.M., (2009). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* de Noë and *Thymelaea microphyla* from Algerian Sahara. *Advance in Food Science*, 31(4): 194-201.
 - Benmansour N., Benmansour A., El Hanbali F., González-Mas M.C., Blázquez M.A., El Hakmaoui A., Akssira M., (2016). Antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria against multi-drug resistant bacteria from clinical origin. *Flavour and Fragrance*, 31, 137-142.
- Bensaid A., (2006). Sig et télédétection pour l'étude de l'ensablement dans une zone aride: le cas de la wilaya de Naama (Algérie). Thèse de Doctorat. Géographie. Université Joseph Fourier. Grenoble I. 299p.

- Bergogne-Berezin E., Dellamonica P., (1999). Antibiothérapie en pratique clinique. Edition Masson, Paris. 496p.
- Belyagoubi-Benhammou N., Belyagoubi L., Bekkara F.A., (2014). Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(40):1198-1207.
- Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P., Marquier P., (2002). Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, 3 (10): 248-251.
- Boizot N., Charpentier J.P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'INRA*. pp 79-82.
- Bora K.S., Sharma A., (2010). Phytochemical and pharmacological potential of *Artemisia absinthium* Linn. and *Artemisia asiatica* Nakai. A review *Journal of Pharmacy Research*, 3(2):325-328.
- Bora K.S., Sharma A., (2011).The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharmaceutical Biology*, 49(1):101-109.
- Borris R.P., Blaskó G., Cordell G.A., (1988). Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the *Thymelaeaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 24(1): 41-91.
- Boudjouref M., (2018). Antioxidant activity and phenolic content of *Artemisia Campestris* from two regions of Algeria. *World Journal of Environmental Biosciences*, 7(2): 61-66.
- Boukef M.K., (1986). Les plantes dans la médecine traditionnelle Tunisienne. Edition Agence de coopération culturelle et technique. Collection Médecine traditionnelle et pharmacopée. Paris, 350p.

- Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Delattre J., (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences. Ed Flammarion, Paris: 59-81.
- Bouchenak F., Degaichia H., Lamgharbi A. Benrebiha F., (2018). Evaluation in vitro du potentiel antifongique de l'huile essentielle et des extraits méthanoliques d'une Asteraceae *Artemisia absinthium* L. Revue Agrobiologia, 8(1): 886-895.
- Bounab S., Takia L., Ramdani M., Chalard P., Figueredo G., (2018). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Thymelaea microphylla* essential oil from Algeria. Der Pharma Chemica, 10(5): 36-41.
- Boutiti.K., Zellagui.W., (2019). Étude phytochimique et activité biologique d'une plante médicinale *Artemisia judaica*. Mémoire de master. Université Frères Mentouri Constantine1-Algérie.
- Bouzenoune A., (2003). Étude portant projet de classement du site de Oglat Ed daïra en aire protégée. Wilaya de Naama. Direction générale des forêts. 32p.
- Boris R.P., Cordell G.A., (1984). Studies of the Thymelaeaceae II. Antineoplastic principles of *Gnidia kraussiana*. Journal of Natural Products, 47(2): 270-278.
- Bruneton J., (2016). Pharmacognosie : Phytochimie -Plantes médicinales. (5ème éd). Lavoisier Tec-Doc.1504p.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H., (2004). Antioxidant activity and phenolic compound of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences, 74 (17): 2157–2184.
- Carvalho I.S., Cavaco T., Brodelius M., (2011). Phenolic composition and antioxidant capacity of six *Artemisia* species. Industrial Crops and Products, 33(2) : 382-388.

- Cavin A., (1999). Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire, *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (Annoncées). Thèse de Doctorat, Université de Lausanne-Suisse. 241p.
- Cavin A., Hostettmann K., Dyatmyko W., Potterat O., (1998). Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica*, 64(5):393-396.
- Chabrier J.Y., (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Sciences Pharmaceutiques. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy.
- Chavan U. D., Shahidi F., Naczki M., (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75(4):509-512.
- Chaib F., Sahki R., Sabaou N., Rached W., Bennaceur M., (2015). Phytochemical investigation and biological activities of some Saharan plants from Hoggar. *Journal of Agricultural Science*, 7(7):163-173.
- Cheriti A., Sekkoum K., (1995). Phytochemical investigation of *Thymelaea microphylla* growing in Algeria. *Acta Chimica Slovenica*, 42, 373-374.
- Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., Chou S.T., (2002). Antioxidant activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8):2454-2458.
- Cowan M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564-570.
- Dacosta Y., (2003). Les phytonutriments bioactifs. Edition Yves Dacosta, Paris, 318p.

- Dahamna S., Dehimi K., Merghem M., Djarmouni M., Bouamra D., Harzallah D., Khennouf S., (2015). Antioxidant, antibacterial and hypoglycemic activity of extracts from *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients. 2(1):15-25.
- Darmadji P., Izumimoto M., Kataoka K., (1994). Antibacterial effects of spices on fermented meat. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University. 83(1):9-15.
- Deba F., Dang Xuan T., Yasuda M., Tawata S., (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn var *radiata*. Food Control, 19(4): 346-352.
- Deiana M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L., Dessi M.A., (2003). Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. Journal of the American Oil Chemists' Society, 80(1):65-70.
- Delattre J., Beaudeau J-L, Bonnefont-Rousselot D., (2007). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Ed Tec et Doc, Lavoisier. 548p.
- Diallo D., Paulsen B.S., Liljeback T.H.A., Michaelsen T.E., (2001). Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. Journal of Ethnopharmacology, 74(2):159-171.
- Diogo C. V., Félix L., Vilela S., Burgeiro A., Barbosa I. A., Carvalho M. J., Oliveira P.J., Peixoto F.P., (2009). Mitochondrial toxicity of the phytochemicals daphnetoxin and daphnoretin—relevance for possible anti-cancer application. Toxicology in Vitro, 23(5):772-779.

- Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., Stocker P., (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2599-2606.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4):654–660.
- Djermane N., Gali L., ArhabR., Gherraf N., Bensouici C., Erenler R., Abdessamed A., (2020). Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, and enzyme inhibitory activities of *Erucaria uncata* and *Thymeleae hirsuta*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29:101834.
- Dob T., Chelghoum C., (2006). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria. *Flavour and fragrance journal*, 21(2): 343-347.
- Dohou N., Doumi L., Gmira N., Hmamouchi M., (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(4): 61-78.
- Dubeya N.K., Tiwaria T.N., Mandinb D., Andriamboavonjyc H., Chaumontb J., (2000). Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia*, 71, 567-569.
- Dupont F., (2004). *Botanique - Systématique Moléculaire*. Edition Masson, p110-125.
- El-Beheiry M.A.H., (2000). Evaluation of the organic composition of *Thymelaea hirsuta* populations in Egypt. *Bulletin of the Faculty of Science. Assiut University.D. Botany* 29 (1): 375-383.

- El-Massry K.F., El-Ghorab A.H., Farouk A., (2002). Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. Food Chemistry, 79(3):331-336.
- El-Naggar S.A., Abdel-Farid I.B., Elgebaly H.A., Germoush M.O., (2015). Metabolomic profiling, antioxidant capacity and in vitro anticancer activity of some compositae plants growing in Saudi Arabia. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 9(30) :764-774.
- El-Sayed M.A., Baabbad R., Balash A., Al-Hemdan N.A., Softah A., (2013). The potential anti *Helicobacter pylori* and antioxidant effects of *Artemisia judaica*. Functional Foods in Health and Disease, 3(9): 332-340.
- Evans F.J., Taylor S.E., (1983). Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti tumour diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, 44, 1-99.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. Organs, and their biological activities. Comptes Rendus de Biologies, 331(5) :372-379.
- Favier A., (2003). Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité Chimique, pp 108 -115.
- Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M., (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. Journal of Ethnopharmacology, 108(1):31-37.
- Ferrari, J.,(2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. ex A Rich. Thèse de doctorat. Université de Lausanne, 228p.

- Fournier P.V., (2010). Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France. Editeur Presses de la cité. 1048p.
- Frankel E. N., Meyer A.S., (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1940.
- Gast M., (1989). Armoise. *Encyclopédie berbère*, (6): 905-908.
- Génin A., (1989). La botanique appliquée à l'horticulture. Ed Lavoisier-Tec et Doc, 232p.
- Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot M.J., (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5):1370-1373.
- Ghanem H., Haba H., Marcourt L., Benkhaled M., Wolfender J.L., (2014). Microphynolides A and B, new spirogamma- γ - lactone glycosides from *Thymelaea microphylla*. *Natural Product Research*, 28(20):1732-1738.
- Goetz M.E., Luch A., (2008). Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Letters*, 266(1): 73-83.
- Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4): 1220-1234.
- Gouli A., Abid O., (2020). Screening phytochimique d'une plante médicinale *Artemisia absinthium* et l'étude théorique de leur activité biologique sur modèle biologique *Drosophila mélanogaster*. Mémoire de Master. Université Larbi Tebessi Tebessa.

- Guelcin İ., Mshvildadze V., Gepdiremen A., Elias R., (2004). Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta medica*, 70(6): 561-563.
- Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H., (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103: 1449-1456.
- Hale A.L., (2003). Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis. Doctoral dissertation, Texas A&M University. 245p.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1989). *Free radical in biology and medicine*. Clarendon Press, 152, 14. Université d'Oxford.
- Halliwell B., Whiteman M., (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*, 142(2):231-255.
- Hammiche V., Maiza K., (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3):358-67.
- Hayouni A., Abderrabba M., Bouix M., Hamdi M., (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3):1126–1134.
- Harbone J.B., Baxter H., Moss G.P., (1999). *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*. Editeurs Taylor et Francis.
- Hegnauer R., (1973). *Chemotaxonomie der pflanzen*. Birkhäuser Verlag, Basel.

- Heywood V.H., Brice F., (1996). Les Plantes à fleurs:306 familles de la flore mondiale. Editions Nathan, Paris.
- Hinneburg I., Dorman H.D., Hiltunen R., (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food chemistry*, 97(1): 122-129.
- Hu J.F., Bai S.P., Jia Z.J., (1996). Eudesmane sesquiterpenes from *Artemisia eriopoda*. *Phytochemistry*, 43(4):815-817.
- Huang D., Ou B., Prior R.L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):1841-1856.
- Hubert A.J., (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja, étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse: (INPT), 174 p.
- Hussain M.S., Fareed S., Saba AnsaribnM., Rahman A., Ahmad I. Z., Saeed M., (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4(1):10-20.
- Irshaid F.I., Tarawneh K.A., Jacob J.H., Alshdefat A.M., (2014). Phenol content, antioxidant capacity and antibacterial activity of methanolic extracts derived from four Jordanian medicinal plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(3):372-379.
- Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T., (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarians medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2):145-150.

- Jakupovic J., Chen Z.L., Bohlmann F., (1987). Artanomaloïde, a dimeric guaianolide and phenylalanine derivatives from *Artemisia anomala*. *Phytochemistry*, 26(10):2777-2779.
- Jerez M., Pinelo M., Sineiro J., Nunez M.J., (2006). Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*, 94(3): 406-414.
- Jung T., Bader N., Grune T., (2007). Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2) : 231-237.
- Kadri A., Zarai Z., Ben C.I., Gharsallah N., Damak M., Békir A., (2011). Chemical composition and in vitro antioxidant activities of *Thymelaea hirsuta* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(15): 2930-2935.
- Kamath V., Rajini P.S., (2007). The efficacy of cashewnut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chemistry*, 103, 428-433.
- Karou D., Dicko M.H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S., Traoré A.S., (2006). Activités antioxydantes et antimicrobiennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Thèse de doctorat, CRSBAN, Université Ouagadougou.
- Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2): 584-589.
- Kassi A.B.B., Ballo D., Kabran A.F., Sissouma D., Adjou A., (2020). Évaluation du pouvoir antioxydant et de la teneur en polyphénols totaux de six plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires. *Journal of Applied Biosciences*, 153, 15788-15797.

- Kerbab K., Mekhelfi T., Zaiter L., Benayache S., Benayache F., Picerno P., Mencherini T., Sansone F., Aquino R., Rastrelli L., (2015). Chemical composition and antioxidant activity of a polar extract of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Natural Product Research*, 29(7): 671-675.
- Ketoh G.K., Koumaglo H.K., Glitho I.A., Huignard J., (2006). Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia* ,77(7-8):506-510.
- Khafagy S.M., Gharbo S. A., Sarg T.M., (1971). Phytochemical investigation of *Artemisia herba alba*. *Planta medica*, 20(03): 90-96.
- Khafagy S.M., Seif El-Din A.A., Jakupovic J., Zdero C., Bohlmann F., (1988). Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Artemisia judaica*. *Phytochemistry*, 27(4)1125-1128.
- Khafagy S.M., Tosson S., (1968) .Crystallographic optical and chromatograph studies of judaicin bitter, principle of *Artemisia judaica* L. *Planta Medica.*, 16(4):446-449.
- Kim D., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H., Lee C.Y., (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51(22): 6509-6515.
- Kim H.P., Lee E.J., Kim Y.C., Kim J., Kim H.K., Park J-H., Kim S.Y., Kim Y.C., (2003). Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(3): 390-392.

- Kim Y.H., Lee S.H., (2018). Invertebrate acetylcholinesterases: Insights into their evolution and non-classical functions. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(1): 186-195.
- Koechlin-Ramonatxo C., (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 165-177.
- Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C., Abdelly C., (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8): 2083-2091.
- Kwak J. H., Jang W.Y., Zee O.P., Lee K.R., (1997). Artekeiskeanin A: a new coumarin-monoterpene ether from *Artemisia keiskeana*. *Planta medica*, 63(05):474-476.
- Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y., (2003). Cocoa has are more Phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25): 7292-7295.
- Lehucher-Michel, M.P., Lesgards J.F., Delubac O., (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, 30, 1076-1081.
- Levin D.A., (1976). Alkaloid-bearing plants: an ecogeographic perspective. *The American Naturalist*, 110(972): 261-284.
- Li H.B., Li D., Zhang Y., Gan R.Y., Song F.L., Chen F., (2011). Antioxidant properties of chinese medicinal plants in Gupta, D.S. (Eds): *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Science Publishers, USA, 331-362.
- Li J., Jiang Y., (2007). Litchi flavonoids: isolation, identification and biological activity. *Molecules*, 12(4):745-758.

- Li L., He S., Sun J.M., Davie J.R., (2004). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochemistry and Cell Biology*, 82(4):460-471.
- Libman A., Bouamanivong S., Southavong B., Sydara K., Soejarto D., (2005). Medicinal plants: an important asset to healthcare in a region of central Laos. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3):303-311.
- Liu C.Z., Murch S.J., EL-Demerdash M., Saxena P.K., (2003). Regeneration of the Egyptian medicinal plant *Artemisia judaica* L. *Plant Cell Reports*, 21(6):525–530.
- Lutge U., Kluge M., Bauer G., (2002). *Botanique* (3^{ème} Ed.). Technique et documentation. Lavoisier. Paris. 211p.
- Ma C., Wang H., Lu X., Xu G., Liu B., (2008). Metabolic fingerprinting investigation of *Artemisia annua* L. in different stages of development by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1186(1-2):412–419.
- Marouf A., Reynaud J., (2007). *La botanique de A à Z*. Ed. Dunod. Paris. 177p.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Edition Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.192p.
- Maire R., (1933). *Étude sur la flore et la végétation du Sahara Central*. Mémoires de la Société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord. N° 3. Mission du Hoggar.
- Maisuthisakul P., Pasuk R, Ritthiruangde J.P., (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Food Composition and Analysis*, 21, 229-240.

- Maiza K., Brac de la Perrière R.A., Hammiche V., (1996). Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. In : Schröder E. (ed.), Balansard G. (ed.), Cabalion P.(ed.), Fleurentin J. (ed.), Mazars G. (ed.). Médicaments et aliments : approche ethnopharmacologique. Paris p. 169-171.
- Mann C.M., Cox S.D., Markham J.L., (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Letters in Applied Microbiology, 30(4): 294-297.
- Marc F., Davin A., Degléne L., Ferrand C., (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. Erudit, M/S, 20(4):458-63.
- Markham K.R., (1982). Techniques of flavonoid identification (Biological techniques series). Academic Press, 113p.
- Marmouzi I., Bouchmaa N., Kharbach M., Ezzat S.M., Merghany R.N., Berkiks I., El Jemli M., (2021). *Thymelaea* genus: ethnopharmacology, chemodiversity, and bioactivities. South African Journal of Botany, 142, 75-192.
- Marston A., (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. Journal of Chromatography A, 1218(19) : 2676-2683.
- Martínez-Cayuela M., (1995). Oxygen free radicals and human disease. Biochimie, 77(3): 147-161.
- Mates J.M., Pérez-Gomez C., De Castro I.N., (1999). Antioxidants enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry, 32(8), 595-603.
- Matvieieva N., Drobot K., Duplij V., Ratushniak Y., Shakhovsky A., KyrpanesmiianT., Brindza J., (2019). Flavonoid content and antioxidant activity of *Artemisia vulgaris* L. "hairy" roots. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 49(1) :82-87.

- Mau J.L., Chang C.N., Huang S.J., Chen C.C., (2004). Antioxidants properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. Food Chemistry, 87(1):111-118.
- Maydani M., (2000). Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. The American Journal of Clinical Nutrition, 71, 1665S-1668S.
- Megdiche-Ksouri W., Trabelsi N., Mkadmini K., Bourgou S., Noumi A., Snoussi M., Barbria R., Tebourbi O., Ksouri R., (2015). *Artemisia campestris* phenolic compound have antioxidant and antimicrobial activity. Industrial Crops and Products, 63, 104-113.
- Mekhelfi T., Kerbab K., Guella G., Zaiter L., Benayache S., Benayache F., (2014). Phytochemical constituents of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Algeria. Der Pharmacia Lettre, 6(1):152-156.
- Merghem R., (2009). Eléments de biochimie végétale (16). Ed, Bahaeddine. Algérie.
- Messai L., (2011). Étude phytochimique d'une plante médicinale de l'est Algérien *Artemisia herba halba*. Thèse de doctorat-Université Mentouri Constantine, Algérie.
- Milane H., (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Pharmacochimie. Université Louis Pasteur-Strasbourg. 263p.
- Mirjalili M. H., Tabatabaei S. M. F., Hadian J., Ebrahimi S. N., Sonboli A., (2007). Phenological variation of the essential oil of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit from Iran. Journal of Essential Oil Research, 19(4): 326-329.

- Mohammed H.A., Qureshi K. A., Ali H.M., Al-Omar, M. S., Khan, O., Mohammed S.A.A., (2022). Bio-evaluation of the wound healing activity of *Artemisia judaica* L. as part of the plant's use in traditional medicine, phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, and antibiofilm properties of the plant's essential oils. *Antioxidants*, 11(2), 332.
- Mohammedi Z., (2013). Étude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Moon J., Shibamoto T., (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5) :1655-1666.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Parajó J.C., (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2):145-171.
- Morel Y., Barouki R., (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal*, 342 (3): 481-496.
- Mroczek D.K., Spiro III A., Turiano N.A., (2009). Do health behaviors explain the effect of neuroticism on mortality? Longitudinal findings from the VA normative aging study. *Journal of Research in Personality*, 43(4): 653-659.
- Mucciarelli M., Maffei M., (2002). Introduction to the genus *In Artemisia*. Edited Colin W. Wright C.W., Taylor and Francis.
- Naili M.B., Alghazeer R.O., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y., (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arabian Journal of Chemistry*, 3(2): 79-84.

- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L., (2000). Antibacterial Activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4): 247-256.
- Navarro J.M., Flores P., Garrido C., Martinez V., (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96(1) :66-73.
- Niranjan A., Barthwal J., Govindrajan R., Singh D.P., Amla D.V., (2009). Development and validation of an HPLC-UV-MS-MS method for identification and quantification of polyphenols in *Artemisia pallens* L. *Acta Chromatographica*, 21(1): 105–116.
- Noman L., Zellagui A., Hallis Y., Yaglioglu A.S., Demirtas I., Gherraf N., Rhouati S., (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of an endemic desert species *Thymelea microphylla* Coss. et Dur. *Der Pharmacia. Lettre*. 7(1):118-121.
- Owokotomo I.A., Ekundayo O., Abayomi T.G., Chukwuka A.V., (2015). In-vitro anticholinesterase activity of essential oil from four tropical medicinal plants. *Toxicology Reports*, 2, 850-857.
- Oyaizu M., (1986). Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Ozenda P., (1991). *Flore et végétation du Sahara*, 3 édition. CNRS, Paris, France.
- Öztürk M., Öztürk F.A., Duru M.E., Topcu G., (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 103(2): 623-630.
- Packerc L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., (1999). *Antioxidants food supplements in human health*. Edition Academic Press, 2, 35- 41.

- Pan Z.G., Liu C.Z., Murch S.J., El-demerdash M., Saxena K., (2003). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of the Egyptian medicinal plants *Artemisia judaica* L .and *Echinops spinosissimus* Turra. *Plant Science*, 165(4):681-687.
- Pelli K., Lyly M., (2003). Les antioxydants dans l'alimentation. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, 28 p.
- Perry R.A., Goodall D.W., (1979). *Arid land ecosystems: Structure, functioning and Management*. 878p.
- Pessini G.L., Dias Filho P.B., Nakamura C.V., Cortez D.A.G., (2003). Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnelli* (Miq).C.D.C. var. *pallescens* (C.D.C.) Yunk. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(8):1115-1120.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., (2002). Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4):233-239.
- Podsedek A., (2007). Natural antioxidant and antioxidant capacity of *Brassica vegetables*. *LWT- Food Science and Technology*,40(1): 1-11.
- Pratt C., Cornely K., (2019). *Biochimie*.2ème édition De Boeck supérieur, 720p.
- Prescott L.M., Willey J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J., (2018). *Microbiologie* (5ème édition). Traduction de Coyette J., Ed. De Boeck, 1120p.
- Prieto P., Pineda M., Aguliar M., (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.

- Quezel P., Santa S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales 2, CNRS, Paris, France.
- Ragae S., Abdel-Aal E.S.M., Noaman M., (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food chemistry*, 98(1): 32-38.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., (2000). *Biologie végétale* (6^{ème} édition). Traduction de Bouharmont J., Ed. De Boeck. 944p.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rice-Evans C.A., Miller N. J., Paganga G., (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends In Plant Sciences*, 2(4):152-159.
- Roberfroid M. B., (2002). Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2) : S139-S143.
- Rolland Y., (2004). Antioxydants Naturels Végétaux. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 11(6): 419- 424.
- Ross J.A., Kasum C.M., (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review Nutrition*, 22, 19-34.
- Royal R., (2002). Botanic Garden Edinburgh, Inverleith Row, Edinburgh, EH3 5LR, United Kingdom
- Saad S., Ouafi S., Meguellati H., Djemouai N., (2021). Chemical diversity analysis and biological activities evaluation of different polyphenolic extracts of *Marrubium deserti* De Noé from Algeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114494.

- Sahki A., Sahki R., (2004). Le Hoggar promenade botanique Ed. Ésope. 311p.
- Saleh N.A.M., El-Negoumy S.I., Abou-Zaid M.M., (1987). Flavonoid of *Artemisia judaica*, *Artemisia monosperma* and *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, 26(11):3059-3064.
- Sanchez-Moreno C., (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3): 121-137.
- Schwarz K., (2000). Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10):4874-4882.
- Seidel V., (2012). Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Methods in Molecular Biology*, 864, 27-41.
- Seladji M., Bekhechi C., Bendimerad N., (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 26(1):228-234.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K., (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.
- Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M., (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112(4): 885-888.
- Sharma S. K., Ali M., Singh R., (1996). New 9 β -lanostane-type triterpenic and 13, 14-seco-steroidal esters from the roots of *Artemisia scoparia*. *Natural Products*, 59(2): 181-184.

- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M., (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 1-26.
- Shelef L.A., (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6(1): 29-44.
- Shilin Y., Roberts M. F., Phillipson, J.D., (1989). Methoxylated flavones and coumarins from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 28(5):1509-1511.
- Singh M., Govindarajan R., Nath V., Singh R.A.K., Mehrotra S., (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* . *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 67-72.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventòs R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Skadhauge B., Gruber M.Y., Thomsen K.K., Von-Wettstein D., (1997). Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissues. *American Journal of Botany*, 84(4):494- 503.
- Skowrya M., Gallego M.G., Segovia F., Almajano M.P., (2014). Antioxidant properties of *Artemisia annua* extracts in model food emulsions. *Antioxidants*, 3(1): 116-128.
- Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C., (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology Medicine*, 33(5): 575-586.
- Seong M.K., Soo J.L., Venu Venkataram G.S., Sang E.H., Preethi V., KebedeT.D., Jin Young C ., Won Sup L ., Sung Chul S ., Gon Sup K., (2019). Polyphenol mixture of a native Korean variety of *Artemisia argyi* H. (Seomae

mugwort) and its anti-inflammatory effects. *International Journal of Molecular Medicine*,44(5):1741-1752

- Sorg O., (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327(7): 649-662.
- Stalikas C.D., (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18): 3268-3295.
- St-Gelais A., (2014). Étude de la composition chimique et de l'activité biologique de *Dirca palustris* L., Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi.137p.
- Su X., Duan J., Jian Y.M., Shi J., Kakuda Y., (2006). Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4): 348-353.
- Sun B., Richardo-da-Silva J.M., Spranger I.,(1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(10): 4267-4274.
- Tackholm V., (1974). *Student Flora of Egypt*.2nd ed. Cairo University, Beirrut Lebanon. Press Cooperative printing Co, 16, 581.
- Tan R.X., Lu H., Wolfender J.L., Yu T. T., Zheng W. F., Yang L., Hostettmann K., (1999). Mono-and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Medica*, 65 (01):064-067.
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A., (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, 95(2): 200-204.
- Tieppo J., Vercelino R., Dias A.S., Silva Vaz M.F., Silveira T.R., Marroni C.A., Marroni N.P., Henriques J., Picada J.N., (2007). Evaluation of the protective

effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7):1140-1146.

- Touati D., (1985). Contribution à la connaissance du profil biochimique des dicotylédones buissonnantes et arbustes de la Méditerranée. Thèse de 3ème cycle. Université Claude Bernard, Lyon I.
- Trabelsi N., Falleh H., Jallali I., Ben Daly A., Hajlaoui H., Smaoui A., Abdelly C., Ksouri R., (2012). Variation of phenolic composition and biological activities in *Limoniastrum monopetalum* L. organs. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1):87-96.
- Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C., (2010). Solvent Effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4): 632-639.
- Trabelsi N., Oueslati S., Henry-vitrac C., Waffo-Téguo P., Medini F., Mérillon J., Ksouri R., (2013). Phenolic contents and biological activities of *Limoniastrum guyonianum* fraction obtained by centrifugal partition chromatography. *Industrial Crops and Products*, 49,740-746.
- Trigui M., Hsouna A.B., Tounsi S., Jaoua S., (2013). Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41(1):150-157.
- Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F., Polat G., (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules Sciences*, 12(3):484-496.
- Uriarte-Pueyo I., Calvo M.I., (2018). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 18(34):5289-5302.

- Uttara B., Singh A., Zamboni P., (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7, 65-74.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 39(1): 44-84.
- Van Acker S.A., Van Balen G.P., Van den Berg D., Bast A., Van der Vijgh W.J., (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 56(8) :935-943.
- Van der Bank M., Fay M.F., Chase M.W., (2002). Molecular phylogenetics of *Thymelaeaceae* with particular reference to African and Australian genera. *Taxon*, 51(2):329-339.
- Vansant G., (2004). Radicaux libres et antioxydants: principe de base. Symposium « Antioxydant et Alimentation ». Institut Danone.
- Vuorela S., (2005). Analysis, isolation and bioactivities of rapeseed phenolics. Academic dissertation, University of Helsinki-Department of Applied Chemistry and Microbiology.
- Wagner H., Bladt S., (1996). *Plants Drug Analysis: A ThinLayer chromatography Atlas*, 2nd ed. Berlin: Springer, p 306–364.
- Wang H., Nair M.G., Strasburg G.M., Booren A.M., Gray J.I., (1999). Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(3):840-844.

- Wijngaard H., Hossain M. B., Rai D. K., Brunton N., (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46(2): 505-513.
- Wolf J.T., Ross D., Cohen G.M., (1994). A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in the thymocytes. *FEBS Letters*, 352(1): 58-62.
- Yahyaoui M., Bouajila J., Cazaux S., Abderrabba M., (2018). The impact of regional locality on chemical composition, anti-oxidant and biological activities of *Thymelaea hirsuta* L. extracts. *Phytomedicine*, 41,13-23.
- Yi Z.B., Yu Y., Liang Y.Z., Zeng B., (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT-Food Science and Technology*, 41(4): 597-603.
- Zeragui B., Hachem K., Halla N., Kahloula K., (2019). Essential Oil from *Artemisia judaica* L. (ssp.*sahariensis*) flowers as a natural cosmetic preservative: chemical composition, and antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(3):685-694.
- Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L., Lin Y., Fan W., Gu G., (2006). Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(19):7277-7286.
- Zheng W.F., Tan R.X., Yang L., Liu Z.L., (1996). Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Medica*, 62(02): 160-162.
- Zhu Y., Zhang L.X., Zhao Y., Huang G.D., (2010). Unusual sesquiterpene lactones with new carbon skeleton and new acetylenes from *Ajania przewalskii*. *Food Chemistry*, 118(2), 228-238.

ANNEXES

1. Temps de rétention des standards utilisés dans l'analyse par HPLC-DAD-UV

Standards	Temps de rétention
Acide gallique	3,67
Acide tannique	3,69
Acide protocatéchique	4,16
Catéchine hydrate	4,24
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	4,33
Acide gentisique	5,48
Acide caféique	5,56
Acide vanillique	6,02
Résorcinol	6,12
Epicatéchine	6,38
Acide chlorogénique	16,258
Gallate de méthyle	6,68
Lutéoline	42,832
Résorcinol	11,187
Acide p-coumarique	24,181
Myricétine	34,414
Acide sinapique	25,637
kaempferol 3-O-rutinoside	35,142
Acide syringique	19,306
Isoquercétine	30,975
Lutéoline 7-O glucoside	29,506
Apigénine	46,914
kaempférol	45,943
Acide Trans-cinnamique	38,548
Catéchine	14,756
Resvèratrol	31,678
Acide trans 3-hydroxycinnamic	27,45
Polydatin resvèratrol 3- O- glucoside	23,805
Flavonol	23,68
Flavonose	23,78

2. Liste des Publications & Communications

Ce travail de thèse a fait l'objet de deux articles scientifiques et cinq participations au congrès internationaux.

Articles publiés :

Allam H., Benamar H., Ben Mansour R., Ksouri R., Bennaceur M., (2019). Phenolic composition, antioxidant, and antibacterial activities of *Artemisia judaica* subsp. sahariensis. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 25(4), 347-362.

Allam H., Bennaceur M., Ksouri R., Sahki R., Marouf A., Benamar H., (2020). Identification of Phenolic Compounds and Assessment of the Antioxidant and Antibacterial Properties of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Western Algerian Sahara (Ain-Sefra Province). *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(3).

Communications Internationales :

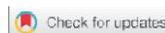
Allam H., Bennaceur M., Benamar H. caractérisation phytochimiques des extraits de deux plantes sahariennes (*Artemisia* spp. et *Thymelaea* spp) et étude de leur potentiel antioxydant et antimicrobien. Premier congrès international de biotoxycologie et bioactivité (First International Congress Biotoxicology and Bioactivity). Oran le 26,27 novembre 2014.

Allam H., Bennaceur M., Benamar H. Etude de deux plantes sahariennes du hoggar: activités antiradicalaires et antibactériennes. Premier colloque international de biotechnologie végétale et microbienne. Oran le 2 ,3 décembre 2014.

Allam H ., Bennaceur M., Benamar H. Identification des polyphénols des plantes médicinales, évaluation de leurs activités antioxydantes et étude de leurs activités biologiques. 2^{ème} journée internationale d'agronomie. 15 Avril 2015-Tlemcen-Algérie.

Allam H ., Bennaceur M., Benamar H. Phytochimie et Activités Biologiques des Extraits de Deux Plantes Sahariennes (*Artemisia* spp. et *Thymelaea* spp).The first international congress of Nutrition and Food Science-FICNFS. 20-22 November 2015, TLEMCCEN – ALGERIA.

Allam H ., Bennaceur M., Benamar H. Etude des activités biologiques d'*Artemisia* ssp du Sahara algérien et identification de ses composés phénoliques. Fifth International Symposium on Medicinal & Aromatic Plants SIPAM 2016 Djerba Tunisie.



Phenolic Composition, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Artemisia Judaica* Subsp. *Sahariensis*

Hanane Allam^{a,b}, Houari Benamar^{a,c}, Rim Ben Mansour^d, Riadh Ksour^d, and Malika Bennaceur^{a,e}

^aDepartment of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Oran1, Oran, Algeria; ^bLaboratory of Natural Products, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, Life, Earth and Universe Sciences, University of Tlemcen Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria; ^cDepartment of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria; ^dLaboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, Hammam-Lif, Tunisia; ^eDepartment of Biology and Physiology of Organisms, University of Science and Technology Houari Boumediene, Laboratory of Research in Arid Areas, Algiers, Algeria

ABSTRACT

Phytochemical profile of solvent extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis* was determined and evaluated for biological activities. The HPLC-UV-DAD analysis identified phenolic acids, flavonoids, and stilbenes. The greatest amount of phenolics and flavonoids was found in the methanol extract followed by ethyl acetate extract. The highest antioxidant and antimicrobial activities were observed in the methanol extract followed by the ethyl acetate extract.

ARTICLE HISTORY

Received 24 March 2018

KEYWORDS

HPLC-UV-DAD; biological activities; phytochemical screening; flavonoids; aerial part extracts

Introduction

Artemisia is a member of Asteraceae that comprises about 1000 genera and over 20,000 species.^[1] *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis* is a perennial fragrant small shrub with pubescent leaves, and inflorescence is a densely branched panicle.^[2,3] The plant is an endemic species that grows in arid regions, commonly in the Hoggar Mountains, Sahara of Algeria; it is called “Tehereglet” in Tamahaq and “Shih” in Arabia.

The aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* are used as infusion and decoction preparation by the local people in Hoggar for internal use to treat helminthiases, digestive diseases (vomits, constipation, and colics), nervous diseases, respiratory diseases, fever, jaundice, and dysmenorrhea; the powder of aerial parts is used for treatment of allergies, mycosis, wounds, and dandruff.^[4–6]

The essential oil present in the extract of this subspecies has been studied^[7], and several compounds have been characterized in *A. judaica* including cirsimaritin, *trans*-ethyl cinnamate, and piperitone.^[8,9] Numerous biological activities were highlighted from various extracts of *A. judaica*, such

CONTACT Houari Benamar  houaribenamar@hotmail.com  Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Oran1, Oran, Algeria

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/whsm.

as anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antifungal, antiangiogenic, insecticidal and antifeedant activities.^[8,9] The aim of this study was to determine the phytochemical profile of solvent extracts from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* and to evaluate the antioxidant and antibacterial activities as part of a larger study on Algerian plants.^[10,11]

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

n-hexane, ethyl acetate, ethanol, methanol, acetonitrile, chloroform, dimethyl sulfoxide (DMSO), trifluoroacetic acid, trichloroacetic acid, sulfuric acid, gallic acid, chlorogenic acid, syringic acid, *para*-coumaric acid, *trans*-3-hydroxycinnamic acid, *trans*-cinnamic acid, ascorbic acid, linoleic acid, quercetin, kaempferol, catechin, apigenin, luteolin 7-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-rutoside, resveratrol 3-*O*-glucoside, resveratrol, vanillin, β -carotene, potassium persulfate, potassium ferricyanide, ferric chloride, sodium phosphate, ammonium molybdate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), trolox, tween 40, hydrogen peroxide, Mueller-Hinton agar, ampicillin, oxacillin, and gentamicin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). TLC silica gel 60 F254 aluminum plates were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of analytical grade purchased from Sigma.

Plant Material

Plant materials were collected in March 2014 from Tamanrasset, Algeria, identified at the Institut national de recherche forestière, Tamanrasset, Algeria and a voucher specimen (INRF.2014.6) deposited. The aerial parts were dried in a well-ventilated room at 30°C and stored in the dark until use.

Extraction

The dried powder of aerial parts (100 g) was first defatted by *n*-hexane (600 mL) at room temperature for 24 h three times, and then the residue was extracted successively with ethyl acetate and methanol in the same way, filtered through a filter paper. The organic solvent was removed under reduced pressure at 40°C, to yield ethyl acetate and methanol extracts, respectively. For aqueous extract, the dried powder of aerial parts (50 g) was extracted three times under reflux by distilled water (500 mL) for 30 min. The extracts were filtered through filter paper, combined and lyophilized to afford the aqueous extract.

Phytochemical Analysis

Phytochemical analysis^[12] was done to detect the presence of different plant secondary metabolite classes.

Identification of Phenolic Compounds Using HPLC-UV-DAD

HPLC-UV-DAD analysis was performed on LC Agilent Technologies 1100 Infinity series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an auto-sampler model 1100, a quaternary pump model 1100, and diode array detector (DAD) model 1100. A C18 column (250 mm × 4.0 mm, 5 μm, Bischoff) was used for analysis. The mobile phase was composed of two solvents: 0.025% trifluoroacetic acid in H₂O and acetonitrile. The sample was prepared at a concentration of 25 mg mL⁻¹ in methanol/H₂O (1:1) and filtered through a 0.45 μm Millipore filter. The elution program at 1 mL min⁻¹ was as follows: 10–50% B (0–40 min), 50–100% B (40–41 min), 100% B (41–50 min), 100–10% B (50–55 min), and 10% B (55–59 min). The injection volume was 25 μL and peaks were monitored at 280 nm. Peaks were identified by congruent retention times and UV spectra and compared with those of the standards. The contents of the identified compounds were obtained from calibration curve with standards.

Quantification of Total Phenolic Content (TPC)

The total phenolic content (TPC) of extracts was determined.^[13]

Quantification of Total Flavonoid Content (TFC)

The total flavonoid content (TFC) of extracts was estimated.^[14]

Quantification of Total Condensed Tannin Content (TCTC)

Proanthocyanidins were measured using the modified vanillin assay.^[15] To 50 μL of suitably diluted samples, 3 mL of methanol vanillin solution (4%) and 1.5 mL of concentrated sulfuric acid were added. The mixture was let to stand for 15 min and the absorption measured at 500 nm against a methanol blank. The amount of total condensed tannin was expressed as mg catechin equivalents (CE) g⁻¹ dried extract (DE). Each experiment was performed in three replicates.

Antioxidant Activities

DPPH Radical Scavenging Activity

The DPPH[•] radical scavenging activity was measured as described.^[16] Methanolic solution (05 μL) of each sample at five different concentrations

was added to 915 μL of methanol and then 200 μL of DPPH solution was added (0.022% in methanol). The mixture was incubated at room temperature in the dark, and the absorbance of the reaction mixture was measured at 517 nm after 30 min, against a blank of methanol without DPPH. The DPPH solution without sample solution was used as control. Quercetin, ascorbic acid, and BHT were used as reference compounds. Scavenging activity was determined as^[8]:

$$\% \text{ scavenging activity} = \frac{1}{4} 100 \times \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}$$

The percentage of scavenging activity was then plotted against the antioxidant concentration to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial solution of DPPH by 50% (IC_{50}). Each experiment was performed in three replicates.

ABTS^{•+} Radical Cation Scavenging Activity

ABTS^{•+} radical was produced by mixing 5 mL of 7 mM ABTS solution and 5 mL of 2.45 mM potassium persulfate. The mixture was stored in the dark for 16 h and diluted with ethanol to get an absorbance of 0.7 at 734 nm. The reaction medium comprised 950 μL of ABTS^{•+} solution and 50 μL of each sample at various concentrations. The mixture was homogenized and its absorbance recorded at 734 nm after 6 min.^[17] BHT and trolox were used as reference compounds. ABTS scavenging ability was expressed as IC_{50} , and the inhibition percentage of ABTS^{•+} radical was calculated using the above formula.^[8]

Reducing Power Activity (RPA)

The ability of the plant extracts to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} was assayed.^[18] Sample solutions at different concentrations were mixed with 2.5 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 mL of potassium ferricyanide (1%). The mixture was incubated at 50°C for 20 min. Afterward, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added, and the mixture was centrifuged for 10 min at 1000 \times g. Supernatant (2.5 mL) was mixed with distilled water (2.5 mL) and 0.5 mL of ferric chloride solution (0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm. Higher absorbance of the reaction mixture indicated greater reducing power. The EC_{50} value is the extract concentration at which the absorbance was 0.5 for the reducing power and was calculated from the graph of absorbance at 700 nm against the extract concentrations. BHA and trolox were used as positive controls.

β -carotene/linoleic Acid Assay^[19]

1 mg of β -carotene was dissolved in 2 mL of chloroform and introduced into a flask containing 25 μL of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. The chloroform was completely evaporated using a vacuum evaporator. Then, 100 mL of hydrogen peroxide was added slowly with vigorous stirring.

2.5 mL of this new solution was transferred into tubes and 350 μL of each extract was added (1 mg mL^{-1} in methanol); three repetitions were performed for each extract. The test tubes were incubated in dark at laboratory temperature. Two control tubes were also prepared by the same procedure, one containing an antioxidant reference BHT (positive control) and the other without antioxidant (negative control), where the sample was replaced by 350 μL of methanol. Absorbance was immediately measured at 490 nm. Other readings were measured at different time intervals (2, 4, 6, 12, and 48 h). The relative antioxidant activity (RAA) of the extracts after 48 h was calculated as:

$$\text{RAA\%} = \frac{\text{Abs}_{48\text{h sample}}}{\text{Abs}_{48\text{h BHT}}} \times 100$$

where $\text{Abs}_{48\text{h sample}}$ is the absorbance of the sample after 48 h and $\text{Abs}_{48\text{h BHT}}$ is that of BHT after 48 h.

Determination of Total Antioxidant Capacity (TAC)

Total antioxidant capacity (TAC) of extracts was evaluated through the assay of a green phosphate/ Mo^{5+} complex.^[20] An aliquot (0.1 mL) of diluted extracts was combined with 1 mL of reagent solution (0.3 N sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). Methanol was used as the blank. The tubes were incubated in a boiling water bath for 90 min. Then, the samples were cooled to room temperature, and the absorbance was measured at 695 nm against blank. TAC was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) g^{-1} DE. All samples were analyzed in triplicate.

Antibacterial Activity

Bacterial Strains

The extracts were individually tested against a panel of six bacteria species, one Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and five Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). All the bacterial strains were obtained from the Bacteriology Laboratory of Saidalgroup, SPA, Algiers, Algeria.

Disc Diffusion Method

Antimicrobial susceptibility testing was carried out by disc diffusion method^[21] to assess the presence of antibacterial activities in plant extracts. A bacterial culture (adjusted to 0.5 McFarland standard) was used to lawn Mueller–Hinton agar plates evenly using a sterile swab. The plates were dried and then used for the sensitivity test. The discs which had been impregnated with a series of plant extracts (1 mg mL^{-1}) were placed on the Mueller–Hinton agar surface. Each test plate comprised of five discs; one positive

control, which is a standard commercial antibiotic disc, one negative control, and three treated discs. The plates were then incubated at 37°C for 18 to 24 h depending on the species of bacteria used in the test. After the incubation, the plates were examined for inhibition zone. The inhibition zone was measured using calipers and recorded. The test was repeated three times to ensure reliability. Ampicillin (10 µg/disc), oxacillin (1 µg/disc), and gentamicin (10 µg/disc) were used as positive controls against bacteria. The negative control was DMSO.

Statistical Analysis

All the tests were carried out in triplicate. Results were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey and Student-Newman-Keul's post hoc test ($P < .05$) using SPSS V20.

Results

Phytochemical Screening

The phytochemical screening of plant extracts showed the presence of flavonoids, phenolic acids, tannins, coumarins, saponins, sesquiterpenes, cardiotonic glycosides, and alkaloids. The extracts did not contain lignans, naphthoquinones, free quinones, anthracene derivatives, and anthraquinones.

HPLC-UV-DAD Analysis

Eleven compounds were identified, with kaempferol^[22] (20.9 mg g⁻¹ DE), resveratrol 3-*O*-glucoside^[23] (5.045 mg g⁻¹ DE), resveratrol^[21] (2.835 mg g⁻¹ DE), *trans*-3-hydroxycinnamic acid^[24] (2.704 mg g⁻¹ DE), and *para*-coumaric acid^[25] (1.342 mg g⁻¹ DE) as the major compounds; the flavonoid kaempferol^[22] was identified in all extracts (Table 1 & Figure 1).

Total Phenolic, Flavonoid, and Tannin Contents

The results obtained show that the TPC varied between 174.82 ± 0.38 and 248.93 ± 0.34 mg GAE g⁻¹ DE in the extracts (Table 2). The highest amount of TPC was found in the methanolic extract (248.93 ± 0.34 mg GAE g⁻¹ DE).

A. judaica subsp. *sahariensis* extracts contained flavonoids ranging from 66.43 ± 0.19 to 75.75 ± 0.29 mg CE g⁻¹ DE depending on the solvent (Table 2). The methanolic extract had the highest TFC.

Table 1 Phytochemical profile from HPLC-UV-DAD analysis of phenolic compounds in solvent extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis*

Compounds	Solvent		
	Ethyl acetate (mg g ⁻¹ DE)	Methanol (mg g ⁻¹ DE)	Aqueous (mg g ⁻¹ DE)
Chlorogenic acid (1)	-	-	0.477
Syringic acid (2)	0.688	-	0.132
Resveratrol 3-O-glucoside (3)	-	5.045	-
<i>para</i> -coumaric acid (4)	1.342	-	0.602
<i>trans</i> -3-hydroxycinnamic acid (5)	-	2.704	-
Luteolin 7-O-glucoside (6)	-	0.923	-
Resveratrol (7)	-	2.835	0.875
Kaempferol 3-O-rutinoside (8)	-	-	0.211
<i>trans</i> -cinnamic acid (9)	-	0.11	-
Kaempferol (10)	20.9	0.134	0.12
Apigenin (11)	0.256	-	-

Data are expressed as mg g⁻¹ dried extract (DE).

- = absent.

The aqueous extract contained a higher amount of condensed tannins than the other extracts, and the amounts of condensed tannins of the plant extracts were in the order of aqueous extract > methanolic extract > ethyl acetate extract (Table 2).

Antioxidant Activities

DPPH Radical Scavenging Activity

The extracts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* showed scavenging activity in a concentration-dependent manner (Table 3). The methanolic and ethyl acetate extracts were the most active. The activity of all extracts was less than the standard antioxidants quercetin, ascorbic acid, and BHT.

ABTS^{•+} Scavenging Activity

The ability of the extracts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* to quench ABTS^{•+} was concentration dependent as observed by the decolorization of ABTS^{•+} (Table 3). The methanolic and ethyl acetate extracts displayed the highest activity, while the aqueous extract had the lowest activity. The positive controls Trolox and BHT displayed a stronger effect than the plant solvent extracts.

Reducing Power Activity

In the RPA assay, the highest activity was noted for methanolic extract, followed by ethyl acetate and aqueous extracts (Table 3). The positive standards BHA and trolox had higher RPA than the plant solvent extracts.

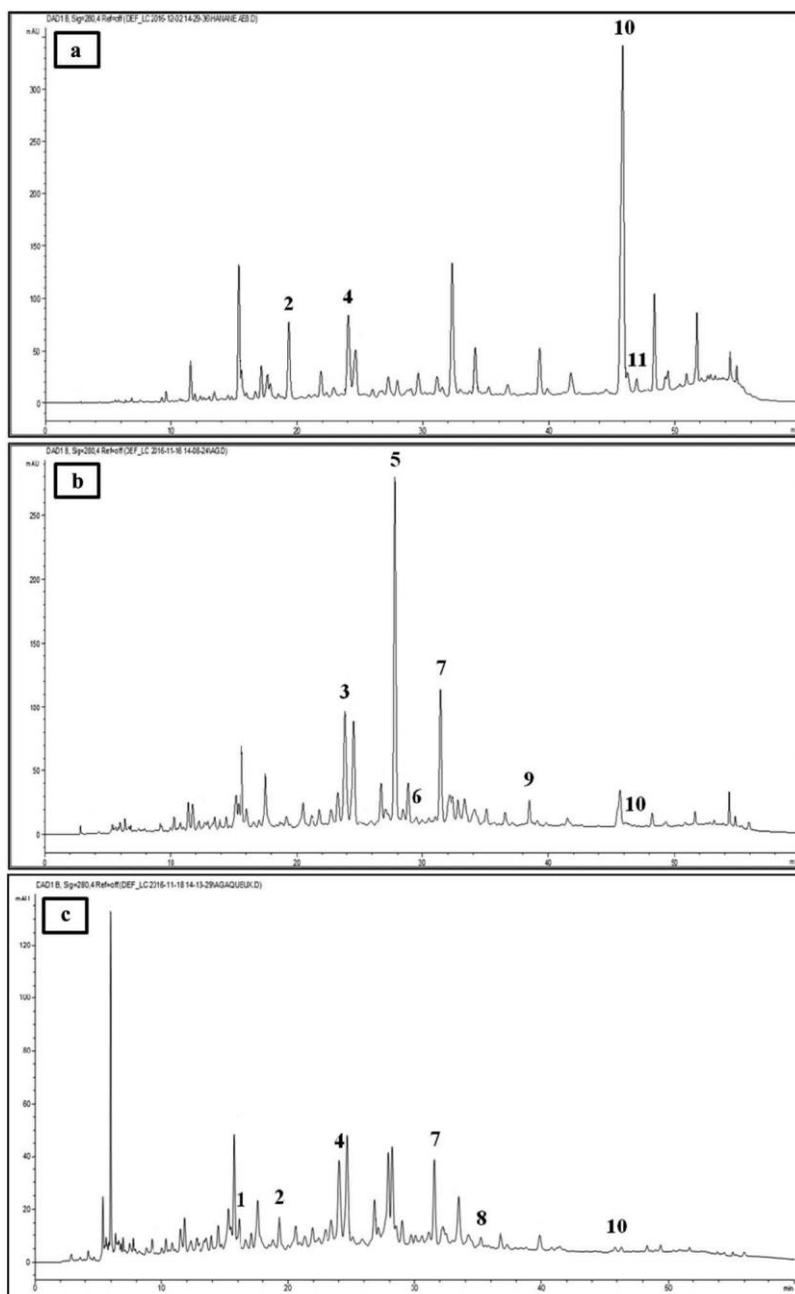


Figure 1. HPLC-UV-DAD chromatograms of ethyl acetate extract (a), methanol extract (b), and aqueous extract (c) of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis* at 280 nm. Chlorogenic acid (1), syringic acid (2), resveratrol 3-*O*-glucoside (3), *para*-coumaric acid (4), *trans*-3-hydroxycinnamic acid (5), luteolin 7-*O*-glucoside (6), resveratrol (7), kaempferol 3-*O*-rutinoside (8), *trans*-cinnamic acid (9), kaempferol (10), and apigenin (11).

Table 2 Total phenolic, flavonoid, and tannin contents of extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis*

Solvent	TPC (mg GAE g ⁻¹ DE) ^a	TFC (mg CE g ⁻¹ DE) ^a	TC (mg CE g ⁻¹ DE) ^a
Ethyl acetate	227.27 ± 0.19 ^a	75.75 ± 0.29 ^a	35.55 ± 0.25 ^a
Methanol	248.93 ± 0.34 ^b	90.18 ± 0.20 ^b	37.68 ± 0.12 ^b
Aqueous	174.82 ± 0.38 ^c	66.43 ± 0.19 ^c	44.60 ± 0.17 ^c

^aStandard error of the mean of three assays.

^{a-c}Differences within columns (means not followed by the same letter are different [$p < 0.05$]). TPC: Total phenolic content, TFC: Total flavonoid content, TCTC: Total condensed tannin content.

Table 3 Antioxidant activities of extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis* by different assays

Extracts	DPPH [•] radical IC ₅₀ (μg mL ⁻¹) ^{B,C}	ABTS ^{••} radical IC ₅₀ (μg mL ⁻¹) ^{B,C}	RPA EC ₅₀ (μg mL ⁻¹) ^{B,D}	TAC (mg GAE g ⁻¹ DE) ^{B,E}
Ethyl acetate	11.62 ± 0.31 ^a	18.09 ± 0.19 ^a	43.90 ± 0.81 ^a	261.06 ± 0.19 ^a
Methanol	10.23 ± 0.09 ^b	15.07 ± 0.16 ^b	35.19 ± 0.15 ^b	339.63 ± 0.72 ^b
Aqueous	15.67 ± 0.18 ^c	27.23 ± 0.17 ^c	57.52 ± 0.04 ^c	247.24 ± 0.29 ^c
Quercetin ^A	4.67 ± 0.03 ^d	n.t.	n.t.	-
Ascorbic acid ^A	5.16 ± 0.03 ^d	n.t.	n.t.	-
BHT ^A	5.32 ± 0.02 ^d	3.55 ± 0.02 ^d	n.t.	-
BHA ^A	n.t.	n.t.	3.01 ± 0.02 ^d	-
Trolox ^A	n.t.	2.43 ± 0.03 ^e	4.89 ± 0.02 ^e	-

^ACompounds used as positive control. ^BStandard error of the mean of three assays.

^CConcentration that shows 50% activity.

^DThe effective concentration at which the absorbance is 0.5 for reducing power activity (RPA).

^ETotal antioxidant capacity (TAC) expressed as mg gallic acid equivalents g⁻¹ dried extract (mg GAE g⁻¹ DE). n.t.: not tested. ^{a-e} Differences within columns (means not followed by the same letter are different [$p < 0.05$]).

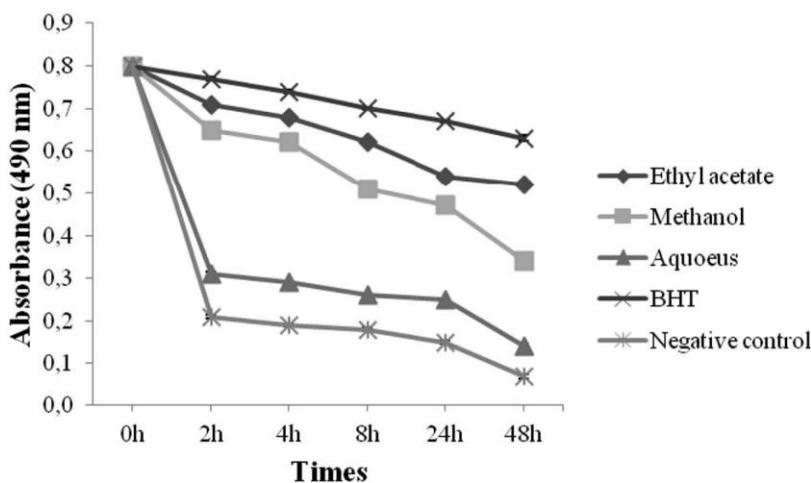


Figure 2. Absorbance change of β-carotene at 490 nm in the presence of extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis*, BHT, and the negative control. Data are mean ± standard error of the mean of triplicate measurements.

β-carotene/linoleic Acid Bleaching Activity

The inhibition capacity measured in the ethyl acetate extract after 48 h was better than that in methanolic and aqueous extracts (Fig. 2). However,

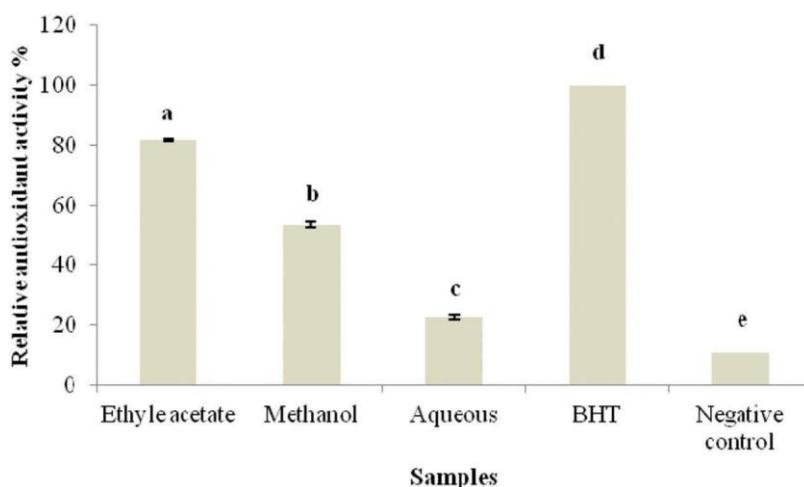


Figure 3. Relative antioxidant activity of extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis* BHT and negative control. Data are mean \pm standard error of the mean of triplicate measurements. ^{a-e} Differences within-samples (Means not followed by the same letter are different) ($p < .05$).

synthetic antioxidant (BHT) showed the highest inhibition capacity at 48 h. The less polar extract, ethyl acetate (81.59%) is more active than the polar extracts, methanol (53.70%) and aqueous (22.61%) (Fig. 3).

Determination of TAC

The phosphomolybdenum method was based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the antioxidant compounds and the formation of a green phosphate/Mo(V) complex with a maximal absorption at 695 nm.^[20] By using this method, the results indicated that the methanolic extract of *A. judaica* subsp. *sahariensis* had the highest TAC, while the aqueous extract had the lowest TAC.

Antibacterial Activity

The plant solvent extracts were active against bacterial strains with inhibition zones between 10.67 ± 1.20 and 22.33 ± 0.67 mm (Table 4). The greatest activity was observed against *P. vulgaris* for aqueous extract with inhibition zone diameter of 22.33 ± 0.67 mm. The lowest activity was observed against *P. mirabilis* for ethyl acetate extract with inhibition zone diameter of 10.67 ± 1.20 mm. In contrast, the most resistant bacterial strain was *K. pneumoniae*. The ethyl acetate extract was ineffective against *P. vulgaris*, while the aqueous extract was effective only against *E. coli* and *P. vulgaris*. Methanol and ethyl acetate extracts were more active against *E. coli* and *P. aeruginosa* than the positive controls gentamicin and ampicillin.

Table 4 Antibacterial activity of extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis* estimated by diameter of inhibition (mm)

Extracts	<i>Staphylococcus aureus</i> ^B	<i>Escherichia coli</i> ^B	<i>Proteus mirabilis</i> ^B	<i>Proteus vulgaris</i> ^B	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^B
Ethyl acetate	21.00 ± 1.00 ^a	19.67 ± 0.67 ^a	10.67 ± 1.20 ^a	n.a.	11.00 ± 0.58 ^a
Methanol	16.33 ± 0.67 ^b	13.67 ± 0.33 ^b	19.67 ± 0.88 ^b	19.00 ± 0.00 ^a	12.67 ± 0.33 ^a
Aqueous	n.a.	11.33 ± 0.88 ^b	n.a.	22.33 ± 0.67 ^b	n.a.
Oxacillin ^A	n.a.	n.a.	29.33 ± 0.33 ^c	n.a.	n.a.
Gentamicin ^A	37.33 ± 0.67 ^c	8.67 ± 0.33 ^c	n.a.	24.33 ± 0.33 ^c	n.a.
Ampicillin ^A	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7.33 ± 0.33 ^b

^ACompounds used as positive control. ^BStandard error of the mean of three assays. n.a.: not active. ^{a-c}Differences within columns (means not followed by the same letter are different [$p < 0.05$]).

Discussion

The present study showed qualitatively the presence of different compounds belonging to several classes of plant secondary metabolites in the *A. judaica* subsp. *sahariensis* solvent extracts including flavonoids, phenolic acids, coumarins, tannins, saponins, sesquiterpenes, cardiotonic glycosides, and alkaloids. The results showed that methanol extract possessed a higher number of plant secondary metabolites compared to other solvent extracts. This was consistent with findings on leaf extracts of *A. nilagirica*^[23], where methanolic extract had a large number of plant secondary metabolites compared to other solvent extracts. Among the plant secondary metabolites detected in the plant extracts, phenolics and flavonoids have diverse pharmacological activities, including antioxidant activity.^[26,27] The detection of phenolics, flavonoids, alkaloids, and saponins in plant extracts was associated with their antibacterial activity.^[25,28]

The HPLC-UV-DAD analysis of the extracts revealed the presence of four flavonoids, five phenolic acids, and two stilbenes. Flavonoids kaempferol^[22] and apigenin^[16] have been reported as antioxidants.^[29] Phenolic acids chlorogenic acid^[8] and *para*-coumaric acid^[25] have also been implicated as antioxidants.^[29] Phenolic compounds similar to those identified in this study have been characterized in *A. campestris* L.^[30]

The results indicate the influence of the solvent on the extractability of phenolic compounds. For instance, the methanolic extract was rich in phenolic compounds compared to the other extracts, and thus, methanol was the best solvent to extract phenolic compounds from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis*. The ethyl acetate was more effective on extraction of phenolic compounds than water as a solvent. It was reported that TPC in aqueous and methanolic extracts from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* was higher than that of aqueous and methanolic extracts from aerial parts of *A. annua*.^[22] Methanol was the best solvent to extract flavonoids from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* followed by ethyl acetate, and water. The TFC of ethyl acetate extract from aerial parts of

A. judaica subsp. *sahariensis* was higher than that of ethyl acetate extract from aerial parts of *A. judaica* var. *Sinaitica* tackholm.^[1] The highest amount of condensed tannins was found in aqueous extract from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* followed by methanol and ethyl acetate extracts. The amount of condensed tannins recorded in the past^[30] for methanolic extracts of aerial parts of *A. campestris*^[30] was lower than that noted in the present study.

The DPPH[•] free radical is scavenged in the presence of antioxidant agents due to the hydrogen donation by antioxidants. DPPH reacts with antioxidants and produces a yellow-colored solution (2,2'-phenyl-1-picrylhydrazine). The DPPH antioxidant study on the extracts from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* showed that all extracts exhibited antioxidant activity. It should be noted that the increase in antioxidant activity was accompanied by an increase in the amounts of phenolic compounds and flavonoids. Therefore, the low IC₅₀ recorded for methanolic extract indicated that it contained a high amount of phenolic compounds and flavonoids. In previous studies, the DPPH scavenging potentials were reported for some extracts from aerial parts of *A. judaica* in ethyl acetate.^[1] The flavonoid apigenin^[16] identified in the ethyl acetate extract was reported to possess DPPH antioxidant activity^[26], and this compound may be responsible for the observed antioxidant activity in ethyl acetate extract.

The proton radical scavenging action is known to be one of the mechanisms of antioxidation. ABTS^{•+} is a free radical widely used to evaluate the potential of plant samples to reduce the ABTS^{•+} into its native form. In this assay, the methanol extract of aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* exhibited a high scavenging action against active ABTS^{•+} free radical in a concentration-dependent manner, showing a direct role in trapping free radicals. The presence of phenolics and flavonoids in high amounts in this extract may be responsible for the free-radical scavenging activity. Though methanol was the most active extract, the activity was less than the positive controls trolox and BHT. In the same test system, the IC₅₀ value was found to be 55 µg mL⁻¹ in aerial parts extract of *A. sieberi*.^[31]

The capacity of extracts from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ was measured by RPA assay. The methanolic extract showed higher RPA than the ethyl acetate extract and followed by aqueous extract, signifying that the methanolic extract contained higher amounts of phenolic compounds that were capable to provide electrons in antioxidant systems than the other extracts. On a similar note, in a previous study on *A. campestris*^[30], the RPA of methanolic extract from aerial parts was lesser than that of methanolic extract of the present study.

In the β-carotene/linoleic acid model system, a discoloration of β-carotene is produced in the absence of an antioxidant. This assay is widely used to evaluate the antioxidant activity of plant samples. The present study showed

high antioxidant for ethyl acetate from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* by scavenging the linoleate free radicals in the β -carotene/linoleic acid model system. The results suggest that the ethyl acetate extract contained less polar compounds responsible for the observed activity. However, the high activity recorded in the ethyl acetate extract can be explained by the presence of kaempferol^[22] and apigenin^[16] in high amounts in this extract; these two phenolic compounds were reported to inhibit the oxidation of β -carotene.^[26,27]

The phosphomolybdenum assay is used for the quantitative estimation of antioxidant activity, through the formation of the phosphomolybdenum complex. In the present work, TAC of extracts from aerial parts of *A. judaica* subsp. *sahariensis* was expressed as the number of GAE. The TAC of extracts varied with solvent. The methanolic extract showed the best TAC compared to the other extracts. The TAC of methanolic extract was lesser than that of methanolic extract reported for aerial parts of *A. campestris*.^[30]

The antioxidant activities of the extracts were attributed to the phenolic compounds present.^[24] The difference in the antioxidant activities may also be attributed to the structural diversity as well as to the interactions in the extracts of the phenolic compounds.

The results of the present study showed that the solvent extracts of *Artemisia judaica* subsp. *sahariensis* had the potency to inhibit all bacterial strains tested except *K. pneumoniae* which is resistant to many antibiotics.^[32] This is in agreement with the previous reports of antibacterial activity of methanolic extracts of *A. campestris* against *E. coli*, and *S. aureus*^[30] and methanolic extracts of *A. sieberi* against *E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, and *P. aeruginosa*.^[31] Phenolic compounds kaempferol^[22] and resveratrol^[21] may also be responsible for the observed antimicrobial activity.^[33,34]

Acknowledgments

The authors wish to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for financial support (Project Cnepru No. D01N01UN310120140007); CNEPRU [D01N01UN310120140007].

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for financial support (Project Cnepru No. D01N01UN310120140007); CNEPRU [D01N01UN310120140007].

ORCID

Houari Benamar  <http://orcid.org/0000-0002-8987-2635>

References

- [1] Bakr, R. O.; Microscopical and Phytochemical Investigation of Egyptian *Artemisia Judaica* L. Var. *Sinaitica* Tackholm and Its Free Radical Scavenging Activity. *Int.J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **2014**, *6*(4), 698–703.
- [2] Dob, T.; Chelghoum, C. Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia Judaica* L. From Algeria. *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*(2), 343–347. DOI: [10.1002/\(ISSN\)1099-1026](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1099-1026).
- [3] Quezel, P.; Santa, S. *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Desertiques Meridionales [New Flora of Algeria and Meridional desert regions], Tome II*; CNRS: Paris, **1963**; Vol. II. pp 990
- [4] Benchelah, A.-C.; Bouziane, H.; Maka, M. Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. *Phytothérapie.* **2004**, *2*(6), 191–197. DOI: [10.1007/s10298-004-0052-z](https://doi.org/10.1007/s10298-004-0052-z).
- [5] Hammiche, V.; Maiza, K. Traditional Medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105*(3), 358–367. DOI: [10.1016/j.jep.2005.11.028](https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.028).
- [6] Ramdane, F.; Mahammed, M. H.; Hadj, M. D. O.; Chanai, A.; Hammoudi, R.; Hillali, N.; Mesrouk, H.; Bouafia, I.; Bahaz, C. Ethnobotanical Study of Some Medicinal Plants from Hoggar, Algeria. *J. Med. Plants Res.* **2015**, *9*(30), 820–827. DOI: [10.5897/JMPR2015.5805](https://doi.org/10.5897/JMPR2015.5805).
- [7] Charchari, S.; Hamadi, S. Kinetic Study of *Artemisia Judaica* L. Essential Oil Steam Distillation. *Jeobp.* **2007**, *10*(4), 304–309.
- [8] Abdelgaleil, S. A. M.; Abbassy, M. A.; Belal, A.-S. H.; Abdel Rasoul, M. A. A. Bioactivity of Two Major Constituents Isolated from the Essential Oil of *Artemisia Judaica* L. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*(13), 5947–5950. DOI: [10.1016/j.biortech.2007.10.043](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.043).
- [9] Abu-Darwish, M. S.; Cabral, C.; Gonçalves, M. J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M. T.; Zulficar, A.; Khan, I. A.; Efferth, T.; Salgueiro, L. Chemical Composition and Biological Activities of *Artemisia Judaica* Essential Oil from Southern Desert of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *191*, 161–168. DOI: [10.1016/j.jep.2016.06.023](https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.023).
- [10] Benamar, H.; Rarivoson, E.; Tomassini, L.; Frezza, C.; Marouf, A.; Bennaceur, M.; Nicoletti, M. Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antiacetylcholinesterasic Activities of the Leaf Extracts of *Rhamnus Lycioides* Subsp. *Oleoides* (L.) Jahand. & Maire in Different Solvents. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *x*(x), x–x.
- [11] Rached, W.; Benamar, H.; Bennaceur, M.; Marouf, A. Screening of the Antioxidant Potential of Some Algerian Indigenous Plants. *J. Biol. Sci.* **2010**, *10*(4), 316–324. DOI: [10.3923/jbs.2010.316.324](https://doi.org/10.3923/jbs.2010.316.324).
- [12] Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography Atlas*; 2nd; Springer: Berlin, **1996**; pp 1–364.
- [13] Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178.
- [14] Kim, D.; Chun, O. K.; Kim, Y. J.; Moon, H.; Lee, C. Y. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*(22), 6509–6515. DOI: [10.1021/jf0343074](https://doi.org/10.1021/jf0343074).
- [15] Sun, B.; Richardo-da-Silvia, J. M.; Spranger, I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*(10), 4267–4274. DOI: [10.1021/jf980366j](https://doi.org/10.1021/jf980366j).

- [16] Cavin, A.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; Potterat, O. Antioxidant and Lipophilic Constituents Of. *Tinospora Crispa*. *Planta Med.* **1998**, *64*(5), 393–396. DOI: [10.1055/s-2006-957466](https://doi.org/10.1055/s-2006-957466).
- [17] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*(9–10), 1231–1237.
- [18] Oyaizu, M.;. Studies on Products of Browning Reactions: antioxidative Activities of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japan J. Nutr.* **1986**, *44*(6), 307–315. DOI: [10.5264/eiyogakuzashi.44.307](https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307).
- [19] Kartal, N.; Sokmen, M.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sokmen, A. Investigation of the Antioxidant Properties of *Ferula Orientalis* L. Using a Suitable Extraction Procedure. *Food Chem.* **2007**, *100*(2), 584–589. DOI: [10.1016/j.foodchem.2005.09.084](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.084).
- [20] Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphor Molybdenum Complex: specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.* **1999**, *269*(2), 337–341. DOI: [10.1006/abio.1999.4019](https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019).
- [21] Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Tenckhoff, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*(4), 493–496.
- [22] Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sci.* **2004**, *74* (17), 2157–2184. DOI: [10.1016/j.lfs.2003.09.047](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047).
- [23] Ahameethunisa, A. R.; Hopper, W. Antibacterial Activity of *Artemisia Nilagirica* Leaf Extracts against Clinical and Phytopathogenic Bacteria. *BMC Complement Altern. Med.* **2010**, *10*, 6. DOI: [10.1186/1472-6882-10-61](https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-61).
- [24] Al-Mustafa, A. H.; Al-Thunibat, O. Y. Antioxidant Activity of Some Jordanian Medicinal Plants Used Traditionally for Treatment of Diabetes. *Pak. J. Biol. Sci.* **2008**, *11*(3), 351–358.
- [25] Akharaiyi, F. C.; Boboye, B.; Adetuyi, F. C. Antibacterial, Phytochemical and Antioxidant Activities of the Leaf Extracts of *Gliricidia Sepium* and *Spathodea Campanulata*. *W. Appl. Sci. J.* **2012**, *16*(4), 523–530.
- [26] Sharififar, F.; Dehghn-Nudeh, G.; Mirtajaldini, M. Major Flavonoids with Antioxidant Activity from *Teucrium Polium* L. *Food Chem.* **2009**, *112*(4), 885–888. DOI: [10.1016/j.foodchem.2008.06.064](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.064).
- [27] Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A. R.; Simonie, M.; Knez, Z. Phenols, Proanthocyanidins, Flavones and Flavonols in Some Plant Materials and Their Antioxidant Activities. *Food Chem.* **2005**, *89*(2), 191–198. DOI: [10.1016/j.foodchem.2004.02.025](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025).
- [28] Ruiz-Terán, F.; Medrano-Martínez, A.; Navarro-Ocaña, A. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Plant Extracts Used in Traditional Medicine in Mexico. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*(12), 1886–1893. DOI: [10.5897/AJB2008.000-5034](https://doi.org/10.5897/AJB2008.000-5034).
- [29] Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*(4), 152–159. DOI: [10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
- [30] Megdiche-Ksouri, W.; Trabelsi, N.; Mkadmini, K.; Bourgou, S.; Noumi, A.; Snoussi, M.; Barbria, R.; Tebourbi, O.; Ksouri, R. *Artemisia Campestris* Phenolic Compounds Have Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *63*, 104–113. DOI: [10.1016/j.indcrop.2014.10.029](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.029).
- [31] Irshaid, F. I.; Tarawneh, K. A.; Jacob, J. H.; Alshdefat, A. M. Phenol Content, Antioxidant Capacity and Antibacterial Activity of Methanolic Extracts Derived from Four Jordanian Medicinal Plants. *Pak. J. Biol. Sci.* **2014**, *17*(3), 372–379.

- [32] Nascimento, G. G. F.; Locatelli, J.; Freitas, P. C.; Silva, G. L. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Pytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. *Brazilian J. Microbiol.* **2000**, *31*(4), 247–256. DOI: [10.1590/S1517-83822000000400003](https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003).
- [33] Paulo, L.; Ferreira, S.; Gallardo, E.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. Antimicrobial Activity and Effects of Resveratrol on Human Pathogenic Bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*(8), 1533–1538. DOI: [10.1007/s11274-010-0325-7](https://doi.org/10.1007/s11274-010-0325-7).
- [34] Teffo, L. S.; Aderogba, M. A.; Eloff, J. N. Antibacterial and Antioxidant Activities of Four Kaempferol Methyl Ethers Isolated from *Dodonaea Viscosa* Jacq. Var. *Angustifolia* Leaf Extracts. *S. Afr. J. Bot.* **2010**, *76*(1), 25–29. DOI: [10.1016/j.sajb.2009.06.010](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.06.010).

Identification of Phenolic Compounds and Assessment of the Antioxidant and Antibacterial Properties of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Western Algerian Sahara (Ain-Sefra Province)

Hanane Allam^{1,2}, Malika Bennaceur^{1,3}, Riadh Ksouri⁴, Rabéa Sahki⁵, Abderrazak Marouf⁶, Houari Benamar^{1,3,7,*}

¹ Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Oran1, El M'Naouer, Oran, Algeria

² Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, Life, Earth and Universe Sciences, University of Tlemcen Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria

³ Laboratory of Research in Arid Areas, Department of Biology and Physiology of Organisms, Faculty of Biological Sciences, University of Science and Technology Houari Boumediene, El Alia, Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

⁴ Laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria, Hammam-Lif, Tunisia

⁵ National Institute of Forest Research, Tamanrasset, Algeria

⁶ Department of Natural Sciences and Life, Institute of Science and Technology, University Center of Naama, Naama, Algeria

⁷ Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Site III, Algeria

ABSTRACT

Thymelaea microphylla is a medicinal plant commonly used in the Algerian Sahara traditional medicine and has a chemical composition with therapeutic properties. In the current study, the antioxidant activities of the ethyl acetate, methanol, and aqueous extracts from aerial parts of *T. microphylla* were evaluated by means of phosphomolybdenum, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), β -carotene bleaching, and reducing power assays. Antibacterial effect was also determined using disc diffusion method. The tested samples exhibited an important antioxidant effects by scavenging free radicals, inhibition of β -carotene oxidation, and by acting as reducing agents. The high antioxidant capacity was found in extracts with high phenolic content. Methanol extract with high content of phenolic compounds and flavonoids showed the best antioxidant effect. The extracts showed also antibacterial activity against human pathogenic bacteria. Methanol extract was the most active among the tested extracts against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The high-pressure liquid chromatography (HPLC)-UV-diode array detector (DAD) analysis leads to the identification of phenolic acids, flavonoid glycosides and aglycones. The results suggest a possible application of *T. microphylla* as a potential natural source of bioactive compounds with antioxidant and antibacterial activities.

Keywords Aerial Part Extracts, Biological Activities, Flavonoids, HPLC-UV-DAD, Phenolic Compounds, Phytochemical Analysis.

1. INTRODUCTION

Thymelaeaceae is a small family comprising about 1200 species with 67 genera. The species of this family are

* houaribenamar@hotmail.com;

houari.benamar@univ-mosta.dz

Received on 27/4/2019 and Accepted for Publication on 12/2/2020.

distributed in tropical and temperate zones of the earth¹. The genus *Thymelaea* contains 30 species of evergreen shrubs, and eight are distributed in Algeria. *T. microphylla* Coss. et Dur. is an under shrub with dioic flowers and clusters. The leaves are very small, ovoid, scattered and distant on the branches. The stems are highly branched². It is a rare medicinal plant endemic to Algeria, occurs in the arid and desert zones of Algeria³ and is called "Methnane".

This species has been used in folk medicine in Algeria for the treatment of hair loss, depression, abscess, wounds and various cutaneous conditions such as erysipelas, pimples, skin cancer, inflammations, diabetes, helminthiasis, and infections in the urinary tract⁴⁻⁷.

A variety of biological activities have been reported in the literature for *T. microphylla* from Algeria, including antiproliferative (aerial parts)⁸, hypoglycemic and anti-inflammatory activities (leaves and flowers)^{7,9}.

Previous chemical studies on the aerial parts of *T. microphylla* have reported the presence of dihydroxylated monoterpenes and monoterpene glucosides, triterpenoids, spiro- γ -lactone glycosides, phytosterols, phenolic acid derivatives, phenylpropanoid glucosides, simple coumarins, bis-coumarins, lignans, flavonoid glucosides, biflavonoids, ionol glucosides, benzyl alcohol glucosides, and alkaloids^{3,5,8,10-12}.

In continuation of our ongoing research program on the exploitation of Algerian plants^{13,14}, we describe herein the antioxidant and antibacterial activities of different extracts from aerial parts of *T. microphylla*. Also, in this study, the total phenolic, flavonoid and tannin contents, and the phenolic profile of extracts were determined.

2. Materials and methods

Chemicals and reagents

n-hexane, ethyl acetate, ethanol, methanol, acetonitrile, chloroform, dimethyl sulfoxide (DMSO), trifluoroacetic acid (TFA), trichloroacetic acid (TCA), sulfuric acid, gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, sinapic acid, syringic acid, *trans*-3-hydroxycinnamic acid, *trans*-cinnamic acid, ascorbic acid, linoleic acid, quercetin, isoquercitrin, catechin, apigenin, myricetin, kaempferol 3-*O*-rutinoside, resorcinol, vanillin, β -carotene, potassium persulfate, potassium ferricyanide, ferric chloride, sodium phosphate, ammonium molybdate, DPPH, ABTS, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), trolox, tween 40, hydrogen peroxide, Mueller-Hinton agar, ampicillin, oxacillin, and gentamicin were purchased from

Sigma (St. Louis, USA). Thin layer chromatography (TLC) silica gel 60 F254 aluminium plates were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals, if not specified, were purchased from Sigma-Aldrich.

Plant material

T. microphylla was collected in march 2015 from Ain-Sefra, Naama, Algeria. The species was identified by one of the author (AM). A voucher specimen of the plant (OUE.2015.C10) was deposited in the collections of the laboratory of the first author. The aerial parts were dried in a well-ventilated room at a temperature of 30°C and stored in the dark until use.

Extraction

The dried powder of aerial parts (100 g) was first defatted by *n*-hexane (600 ml) at room temperature for 24 h three times, and then the residue was extracted successively with ethyl acetate and methanol in the same way. All extracts were filtered through a filter paper. The organic solvent was removed under reduced pressure at 40°C, to yield ethyl acetate and methanol extracts, respectively. For aqueous extract, dried powder of aerial parts (50 g) was extracted three times under reflux by distilled water (500 ml) for 30 min. The extracts were filtered through filter paper, combined and lyophilized to afford the aqueous extract.

Phytochemical analysis

Phytochemical analysis was performed according to Wagner and Bladt, 1996⁽¹⁵⁾ to detect the presence of different plant secondary metabolite classes.

Identification of phenolic compounds using HPLC-UV-DAD

HPLC-UV-DAD analysis was performed on LC Agilent Technologies 1100 Infinity series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an auto-sampler model 1100, a quaternary pump model 1100, and diode array detector model 1100. A C18 column (250 mm \times 4.0 mm, 5 μ m, Bischoff Analysentechnik GmbH, Leonberg, Germany) was used for analysis. The mobile phase was composed of two solvents; (A): 0.025% TFA in

H₂O and (B): acetonitrile. The sample was prepared at concentration of 10 mg/ml in methanol/H₂O (1:1) and filtered through a 0.45 µm Millipore filter (Millipore Corp., Bedford, Mass., USA). The elution program at 1 ml/min was as follows: 10-50% B (0-40 min), 50-100% B (40-41 min), 100% B (41-50 min), 100-10% B (50-55 min), 10% B (55-59 min). The injection volume was 10 µL and peaks were monitored at 280 nm. Peaks were identified by congruent retention times and UV spectra, and compared with those of the standards. The contents of the identified compounds were obtained from calibration curve with standards.

Quantification of total phenolic content (TPC)

The total phenolic content (TPC) of extracts was determined according to Singleton et al., 1999⁽¹⁶⁾.

Quantification of total flavonoid content (TFC)

The total flavonoid content (TFC) of extracts was estimated by the method described by Kim et al., 2003⁽¹⁷⁾.

Quantification of total condensed tannin content (TCTC)

Proanthocyanidins were measured using the modified vanillin assay described by Sun et al., 1998⁽¹⁸⁾. To 50 µl of suitably diluted samples, 3 ml of methanol vanillin solution (4%) and 1.5 ml of concentrated sulfuric acid were added. The mixture was allowed to stand for 15 min and the absorbance was measured at 500 nm against methanol as a blank. The amount of total condensed tannin was expressed as mg catechin equivalents (CE)/g dried extract (DE).

Antioxidant activities

Determination of total antioxidant capacity (TAC)

Total antioxidant capacity (TAC) of extracts was evaluated through the assay of a green phosphate/Mo⁵⁺ complex according to the method described by Prieto et al., 1999⁽¹⁹⁾. An aliquot (0.1 ml) of diluted extracts was combined with 1 ml of reagent solution (0.3 N sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). Methanol was used instead of sample for the

blank. The tubes were incubated in a boiling water bath for 90 min. Then, the samples were cooled to room temperature and the absorbance was measured at 695 nm with a UV-visible spectrophotometer (Optizen 2120 UV, Mecasys Co., Ltd, Korea) against blank. TAC was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g dried extract (DE).

DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical scavenging activity was measured according to the procedure described by Cavin et al., 1998⁽²⁰⁾. Methanolic solution (5 µl) of each sample at five different concentrations was added to 915 µl of methanol and then 200 µl of DPPH solution were added (0.022% in methanol). The mixture was incubated at room temperature in the dark and the absorbance of the reaction mixture was measured at 517 nm after 30 min, against a blank of methanol without DPPH. The DPPH solution without sample solution was used as control. Quercetin, ascorbic acid, and BHT were used as reference compounds. Scavenging activity was determined by the following equation (1):

$$\text{scavenging activity(\%)} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \quad (1)$$

The percentage of scavenging activity was then plotted against the antioxidant concentration to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial solution of DPPH by 50% (IC₅₀).

2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation scavenging activity

ABTS radical cation was produced by mixing 5 ml of 7 mM ABTS solution and 5 ml of 2.45 mM potassium persulfate. The mixture was stored in the dark for 16 h and diluted with ethanol to get an absorbance of 0.7 at 734 nm. The reaction medium comprised 950 µl of ABTS solution and 50 µl of each sample at various concentrations. The reaction medium was homogenized and its absorbance was recorded at 734 nm after 6 min⁽²¹⁾. BHT and trolox were used as reference compounds. ABTS scavenging ability was expressed as IC₅₀, the inhibition percentage of ABTS

radical cation was calculated using the above formula (1).

β -carotene/linoleic acid assay

According to Kartal et al., 2007⁽²²⁾, 1 mg of β -carotene was dissolved in 2 ml of chloroform. The solution of β -carotene-chloroform was introduced into a flask containing 25 μ l of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. The chloroform was completely evaporated by using a vacuum evaporator. Then, 100 ml of hydrogen peroxide were added slowly with vigorous stirring. 2.5 ml of this new solution were transferred into tubes and 350 μ l of each extract were added (1 mg/ml in methanol). The test tubes were incubated in darkness at laboratory temperature. Two control tubes were also prepared with the same procedure, one containing an antioxidant reference BHT (positive control) and the other without antioxidant (negative control), where the sample was replaced by 350 μ l of methanol. Absorbance was immediately measured at 490 nm. Other readings were recorded at different time intervals (2, 4, 6, 12, and 48 h). The relative antioxidant activity of the extracts (RAA) after 48 h was calculated according to the following equation:

$$RAA(\%) = (Abs_{48h\ sample} / Abs_{48h\ BHT}) \times 100$$

Where Abs_{48h sample} is absorbance of sample after 48 h and Abs_{48h BHT} is that of BHT after 48 h.

Reducing power activity (RPA)

The ability of the plant extracts to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} was assayed by the method of Oyaizu, 1986⁽²³⁾. Sample solutions at different concentrations were mixed with 2.5 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 ml of potassium ferricyanide (1%). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. Afterwards, 2.5 ml of TCA (10%) were added and the mixture was centrifuged for 10 min at 1000 \times g. Supernatant (2.5 ml) was mixed with distilled water (2.5 ml) and 0.5 ml of ferric chloride solution (0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm. Higher absorbance of the reaction mixture indicated greater reducing power. The EC_{50} value is the extract concentration at which the absorbance was 0.5 for the reducing power and was calculated from the graph of

absorbance at 700 nm against the extract concentrations. BHA and trolox were used as positive controls.

Antibacterial activity

Bacterial strains

The extracts were individually tested against a panel of six bacteria species, one Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and five Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Proteus vulgaris* ATCC 8427, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). All of the bacterial strains were obtained from the Bacteriology Laboratory of Saidalgroup, SPA, Algiers, Algeria.

Disc diffusion method

Disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing was carried out according to the standard method by Bauer et al., 1966⁽²⁴⁾ to assess the presence of antibacterial activity in plant extracts. A bacterial culture (which has been adjusted to 0.5 McFarland standard) was used to lawn Mueller-Hinton agar plates evenly using a sterile swab. The plates were dried and then used for the sensitivity test. The discs, which had been impregnated with a series of plant extracts (dissolved completely in DMSO at concentration of 1 mg/ml), were placed on the Mueller-Hinton agar surface. Each test plate comprised five discs; one positive control, which is a standard commercial antibiotic disc, one negative control, and three treated discs. The plates were then incubated at 37°C for 18 to 24 h depending on the species of bacteria used in the test. After the incubation, the plates were examined for inhibition zone. The inhibition zone was measured using calipers and recorded. Ampicillin (10 μ g/disc), oxacillin (1 μ g/disc), and gentamicin (10 μ g/disc) were used as positive controls against bacteria. The negative control was DMSO.

Statistical analysis

All the tests were carried out in triplicate. Results were expressed as mean \pm standard error mean (S.E.M.). Statistical analysis was performed by one-way analysis of

variance (ANOVA) followed by Tukey and Student-Newman-Keul's post hoc test for multiple comparisons. Statistical analysis was performed by using IBM SPSS statistics V24 software from IBM. A value of $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

Phytochemical screening

The phytochemical analysis of plant extracts showed the presence of numerous classes of plant phytochemicals, namely flavonoids, phenolic acids, tannins, coumarins, saponins, sesquiterpenes, and cardiotonic glycosides. On the other hand, the extracts were negative to alkaloids, lignans, anthracene derivatives and anthraquinones, naphthoquinones, and free quinones (Table 1).

HPLC-UV-DAD analysis

The peak chromatograms of different extracts of *T. microphylla* resulting from the HPLC-UV-DAD analysis are shown in Figure 1. The amounts of the detected compounds are presented in Table 2. Thirteen phenolic compounds were identified, with kaempferol 3-*O*-rutoside (**10**) (4.849 mg/g DE) and *trans*-3-hydroxycinnamic acid (**6**) (4.744 mg/g DE) as the major compounds among the quantified phenolic compounds. Furthermore, the flavonoid glycoside kaempferol 3-*O*-rutoside (**10**) was identified in all extracts.

Total phenolic, flavonoid and tannin contents

The total phenolic, flavonoid, and tannin contents of extracts are shown in Table 3. High TPC were obtained in methanol and ethyl acetate extracts with values of 317.08 ± 0.86 and 218.61 ± 0.56 mg GAE/g DE, respectively, while the lowest content (184.67 ± 0.38 mg GAE/g DE) was recorded with the water extract.

Flavonoids were also quantified. Ethyl acetate and aqueous extracts showed low contents of flavonoids (89.73 ± 0.23 and 66.79 ± 0.50 mg CE/g DE, respectively), whereas methanol extract gave a significant high content (172.27 ± 0.58 mg CE/g DE).

TCTC varied from 33.08 ± 0.93 mg CE/g DE recorded

in the water extract to 96.39 ± 0.67 mg CE/g DE in the ethyl acetate extract. As shown in Table 3, these amounts varied significantly with type of solvent and ethyl acetate extract showed the highest TCTC.

Antioxidant activities

The antioxidant activities of the different extracts from the aerial parts of *T. microphylla* were evaluated using different assays and the results are shown in the Table 4, Figure 2 A and B.

Determination of total antioxidant capacity

The TAC of the methanol and aqueous extracts of *T. microphylla* (226.40 ± 1.15 and 204.76 ± 0.76 mg GAE/g DE, respectively) evaluated by phosphomolybdenum method was higher than that of the ethyl acetate extract (186.75 ± 0.69 mg GAE/g DE) (Table 4).

DPPH radical scavenging activity

The antioxidant potentials measured by the DPPH assay are shown in Table 4. The methanol extract was more efficient in the reduction of DPPH[•] with an IC₅₀ value of 7.50 ± 0.21 µg/ml, than the ethyl acetate and aqueous extracts that gave an IC₅₀ of 9.86 ± 0.11 and 12.80 ± 0.23 µg/ml, respectively. The activity of all extracts was less than quercetin (IC₅₀ of 4.67 ± 0.03 µg/ml), ascorbic acid (IC₅₀ of 5.16 ± 0.03 µg/ml), and BHT (IC₅₀ of 5.32 ± 0.02 µg/ml), used as reference antioxidants in this test.

ABTS radical cation scavenging activity

The capacity of the extracts from aerial parts of *T. microphylla* to scavenge free radicals was also measured by their ability to quench ABTS^{•+}. Table 4 depicts the concentration-dependent decolorization of ABTS^{•+}, given as IC₅₀ values. As showed in Table 4, methanol and ethyl acetate extracts showed the highest capacity with IC₅₀ values of 15.80 ± 0.40 and 17.80 ± 0.35 µg/ml, respectively. Water extract was found to be the weakest in ABTS radical cation scavenging (IC₅₀ of 31.10 ± 0.71 µg/ml). The positive controls trolox and BHT displayed a stronger effect (IC₅₀ of 2.43 ± 0.03 and 3.55 ± 0.02 µg/ml, respectively).

β -carotene/linoleic acid bleaching activity

The kinetics of bleaching of β -carotene in the presence of extracts of *T. microphylla*, BHT, and negative control are shown in Figure 2 A. The inhibition capacity followed the same trail than that of the methods cited above, methanol extract exhibited an interesting β -carotene bleaching inhibition after 48 h and was more efficient than the ethyl acetate and water extracts. However, standard antioxidant (BHT) showed the highest inhibition capacity at 48 h. On the one hand, it can be seen in Figure 2 B that the extract rich in phenolic compounds and flavonoids, that is, methanol extract (RAA of 80.54%) is more active than the other extracts.

Reducing power activity

The results of RPA assay are shown in Table 4. Iron ion reduction capacity of the extracts was expressed as values of absorbance at 0.5; determined from absorbance curves at the wavelength of 700 nm. The RPA was found to be concentration dependent (results not shown). The results indicated that the highest activity was noted for methanolic extract of *T. microphylla* (EC_{50} of 30.44 ± 0.58 μ g/ml), followed by ethyl acetate extract (EC_{50} of 38.25 ± 0.55 μ g/ml). The lowest EC_{50} value was recorded with aqueous extract (EC_{50} of 43.89 ± 0.02 μ g/ml). BHA and trolox used as references antioxidants showed a strong reducing power of iron ion (EC_{50} of 3.01 ± 0.02 and 4.89 ± 0.02 μ g/ml, respectively).

Antibacterial activity

The three extracts of *T. microphylla* were screened for their antibacterial effects against standard strains of *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*. The results of the extracts are presented in Table 5. The effect of extracts was compared to the standard agents. According to the results obtained, all extracts exhibited inhibition zones against *S. aureus* with high activity for aqueous extract (diameter inhibition of 36.00 ± 0.58 mm) compared to the standard agent gentamicin (diameter inhibition of 13.00 ± 0.00 mm). There was antibacterial activity with ethyl acetate and

methanol extracts against *P. vulgaris* (diameter inhibition of 14.00 ± 0.58 and 20.67 ± 0.67 mm, respectively). The methanol extract was also active against *P. mirabilis* with diameter inhibition of 7.33 ± 0.33 mm. However, all extracts were inactive against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*. No activity was recorded for standard agents against *K. pneumoniae*.

4. Discussion

The results of phytochemical screening of extracts from areal parts of *T. microphylla* indicate the presence of flavonoids, phenolic acids, tannins, cardiotoxic glycosides, and saponins which corroborated to the earlier report by Dehimi et al., 2016⁽⁹⁾. However, the extracts revealed the absence of alkaloids. Alkaloids were tested negative in extracts of *T. microphylla* as reported previously⁹. The identified plant secondary metabolites like flavonoids, phenolic acids, tannins, and terpenoids have been reported to have *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities²⁵⁻²⁷.

The HPLC-UV-DAD analysis of different extracts showed the existence of six flavonoids, six phenolic acids, and one diphenol. Flavonoids like catechin (**2**), luteolin (**12**), and apigenin (**13**) have been reported to have antioxidant effect²⁸. Phenolic acids such as chlorogenic acid (**3**) have also been implicated in antioxidant activity²⁸. Chlorogenic acid (**3**) and *trans*-cinnamic acid (**11**) were characterized in extract of *T. hirsuta* L.²⁹.

The phenolics were quantified in the ethyl acetate, methanol, and aqueous extracts as possible sources of bioactive substances. The results indicate significantly the effect of the solvent on the extractability of phenolics, flavonoids, and proanthocyanidins. Phenolic compounds were effectively extracted by organic solvents, methanol and ethyl acetate than the water, which gave low amount of phenolics. The results are consistent with that of Benhammou et al., 2009⁽³⁰⁾, who obtained highest contents of phenolic compounds in methanol extract, while lowest levels were obtained with water extract. Dehimi et al., 2016⁽⁹⁾ have obtained very low levels of

total flavonoids and proanthocyanidins in methanol extract of stem and leaf of *T. microphylla* compared to the obtained results in this study for methanol extract. Therefore, the previous reports have indicated that abiotic stresses widely present in the arid zones may be responsible for the increase of phenolics. These compounds are synthesized for a defense against oxidative stress, caused by the production of reactive oxygen species in these environmental conditions^{31,32}. The phenolics levels of *T. microphylla* in various extracts were reported by several authors. Belyagoubi-Benhammou et al., 2014⁽³³⁾ have quantified total phenolic compounds in methanol extract and was estimated at 257 mg GAE/g DE. In another study, various extracts of *T. microphylla* were evaluated for amounts of phenolic compounds. The amounts were estimated in hexane, acetone, ethanol, and water extracts at 16.56; 47.59; 37.26; and 60.45 mg GAE/g DE, respectively⁹.

The extracts were found to show an antioxidant effect by scavenging free radicals, prevent the β -carotene bleaching, and act as reducing agents, which probably is due to the phenolic compounds level in all tests. Thus, methanol and ethyl acetate with significant high levels of phenolics showed high antioxidant activity. This finding is in concordance with previous studies where the strong antioxidant activity was found in plant extracts rich in phenolics^{34,35}. Polyphenolic compounds were widely evaluated for their antioxidant effect and were found to prevent from several diseases, by their ability to counteract free radicals produced during oxidative stress. Phenolic compounds can also act as reductones, by donating the electrons and reacting with free radicals to convert them to more stable product and to terminate free radical chain reaction³⁶. These capacities are usually associated to their structure bearing hydroxyl groups, which are able to donate a hydrogen atom³⁷. Furthermore, despite the high polarity of methanol extract, it showed inhibition of β -carotene oxidation. This result can be attributed to the high amount of phenolics of the methanol extract which contribute to the

scavenging of free radicals; this test is known for its specificity to the molecules with low polarity³⁸.

Some authors have reported the antioxidant effects of *T. microphylla* evaluated for several extracts and by numerous methods. High IC₅₀ values in DPPH test have been obtained with the water and ethanol extracts prepared from leaves and flowers of *T. microphylla* (100 and 200 μ g/ml, respectively)⁷. By the same method, Kerbab et al., 2015⁽³⁾ have reported the IC₅₀ value of 180.80 μ g/ml for hydroalcoholic extract of areal parts. Dahamna et al., 2015⁽⁷⁾ have also studied the antioxidant effect of water and ethanol extracts prepared from leaves and flowers evaluated by β -carotene bleaching test (RAA values of 46.40% and 77.86%, respectively were found). The antioxidant activity has been studied by ABTS method and the IC₅₀ values of 0.39 and 0.67 μ g/ml were obtained for water and acetone extracts of leaves and flowers, respectively⁹. Benhammou et al., 2009⁽³⁰⁾ have evaluated the RPA of water extract obtained from leaves and have reported the EC₅₀ value of 690 μ g/ml. Belyagoubi-Benhammou et al., 2014⁽³³⁾ have expressed the TAC as ascorbic acid equivalents for the methanol extract of leaf and stem and value of 14.56 mg acid ascorbic equivalents/g DE was obtained. Besides, organic extracts from other plants have been demonstrated to show also *in vitro* antioxidant activities^{39,40}.

The results of the present work showed that, the different extracts had antibacterial activity against bacteria tested except *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*. In fact, *K. pneumoniae* is known to have resistance to several antibiotics⁴¹. In addition, Dahamna et al., 2015⁽⁷⁾ have reported negative antibacterial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* for aqueous and ethanol extracts of leaves and flowers of *T. microphylla*. Noman et al., 2015⁽⁴²⁾ have studied the antibacterial activity of dichloromethane-methanol extract prepared from areal parts of *T. microphylla* against *S. aureus* and the inhibition diameter zone was 10.25 mm at 1 mg/ml. Aqueous extract from the areal parts of *Centaurea cyanoides* Wahlenb has been also

reported to possess antibacterial activity against *S. aureus*⁴³.

5. Conclusion

The results show that among identified compounds, kaempferol 3-*O*-rutinoside (**10**) was major compound and present in all extracts. The results of antioxidant activities indicated that extracts had effective and powerful antioxidant activity, scavenging effect, reducing power, and prevent β -carotene bleaching in all antioxidant assays

tested. The extracts showed interesting antibacterial activity especially against *S. aureus*. For this reason, the extracts of *T. microphylla* may represent potential source of antioxidant and antibacterial agents.

Acknowledgement

The authors would like to thank the University of Oran1 (Project PRFU number D01N01UN310120190003), LRZA, DGRSDT, Algeria, for the financial support.

Table 1. Secondary metabolites analysis of different extracts of *T. microphylla*.

Secondary metabolites	Ethyl acetate	Methanol	Aqueous
Flavonoids	+++	+++	++
Phenolic acids	+++	+++	++
Alkaloids	-	-	-
Sesquiterpenes	-	+	-
Cardiotonic glycosides	+	+	-
Coumarins	-	+	-
Lignans	-	-	-
Saponins	-	+	-
Tannins	-	+	+
Anthracene derivatives, anthraquinones	-	-	-
Naphtoquinones, free quinones	-	-	-

+ = weak; ++ = medium; +++ = strong; - = absent.

Table 2. HPLC-UV-DAD analysis of phenolics in different extracts of *T. microphylla*.

Compounds	Ethyl acetate (mg/g DE)	Methanol (mg/g DE)	Aqueous (mg/g DE)
Resorcinol (1)	-	0.252	-
Catechin (2)	-	-	2.601
Chlorogenic acid (3)	-	-	0.528
Syringic acid (4)	-	-	0.023
Sinapic acid (5)	-	-	0.605
<i>trans</i> -3-hydroxycinnamic acid (6)	4.744	-	-
Isoquercitrin (7)	-	-	0.489
Ellagic acid (8)	0.837	-	-
Myricetin (9)	-	0.208	0.163
Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinoside (10)	3.253	4.849	0.582
<i>trans</i> -cinnamic acid (11)	1.074	-	-
Luteolin (12)	-	3.959	-
Apigenin (13)	-	0.053	-

Data are expressed as mg/g dried extract (DE). - = absent.

Table 3. Total phenolic, flavonoid, and tannin contents of different extracts of *T. microphylla*.

Extracts	TPC (mg GAE/g DE)	TFC (mg CE/g DE)	TCTC (mg CE/g DE)
Ethyl acetate	218.61 ± 0.56 ^a	89.73 ± 0.23 ^a	96.39 ± 0.67 ^a
Methanol	317.08 ± 0.86 ^b	172.27 ± 0.58 ^b	62.14 ± 0.54 ^b
Aqueous	184.67 ± 0.38 ^c	66.79 ± 0.50 ^c	33.08 ± 0.93 ^c

Values are expressed as standard error of the mean of three assays. ^{a-c}Differences within columns (samples not connected by the same letter are statistically different at $p < 0.05$ as determined by Tukey and Student-Newman-Keul's multiple range tests). TPC: Total phenolic content, TFC: Total flavonoid content, TCTC: Total condensed tannin content. mg gallic acid equivalents/g dried extract (mg GAE/g DE), mg catechin equivalents/g dried extract (mg CE/g DE).

Table 4. Antioxidant activities of extracts of *T. microphylla* by different assays.

Extracts	Total antioxidant capacity	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate radical	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical	Reducing power activity
Ethyl acetate	186.75 ± 0.69 ^a	9.86 ± 0.11 ^a	17.80 ± 0.35 ^a	38.25 ± 0.55 ^a
Methanol	226.40 ± 1.15 ^b	7.50 ± 0.21 ^b	15.80 ± 0.40 ^b	30.44 ± 0.58 ^b
Aqueous	204.76 ± 0.76 ^c	12.80 ± 0.23 ^c	31.10 ± 0.71 ^c	43.89 ± 0.02 ^c
Quercetin ^A	-	4.67 ± 0.03 ^d	n.t.	n.t.
Ascorbic acid ^A	-	5.16 ± 0.03 ^{d,e}	n.t.	n.t.
BHT ^A	-	5.32 ± 0.02 ^e	3.55 ± 0.02 ^d	n.t.
BHA ^A	-	n.t.	n.t.	3.01 ± 0.02 ^d
Trolox ^A	-	n.t.	2.43 ± 0.03 ^d	4.89 ± 0.02 ^d

^ACompounds used as positive control. Values are expressed as standard error of the mean of three assays. Total antioxidant capacity is expressed as mg gallic acid equivalents/g dried extract. ^DRadical scavenging activity is expressed as concentration that shows 50% activity (µg/ml). Reducing power activity is expressed as effective concentration (µg/ml) at which the absorbance is 0.5. n.t.: not tested. ^{a-e}Differences within columns (samples not connected by the same letter are statistically different at $p < 0.05$ as determined by Tukey and Student-Newman-Keul's multiple range tests).

Table 5. Antibacterial activity of extracts of *T. microphylla* estimated by diameter of zone of inhibition (mm).

Extracts	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ethyl acetate	14.00 ± 0.58 ^a	n.a.	n.a.	14.00 ± 0.58 ^a	n.a.
Methanol	26.67 ± 0.67 ^b	n.a.	7.33 ± 0.33 ^a	20.67 ± 0.67 ^b	n.a.
Aqueous	36.00 ± 0.58 ^c	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Oxacillin ^A	n.a.	n.a.	29.33 ± 0.33 ^b	n.a.	n.a.
Gentamicin ^A	13.00 ± 0.00 ^a	8.67 ± 0.33	n.a.	24.33 ± 0.33 ^c	n.a.
Ampicillin ^A	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7.33 ± 0.33

^ACompounds used as positive control. Values are expressed as standard error of the mean of three assays. n.a.: not active. ^{a-c}Differences within columns (samples not connected by the same letter are statistically different at $p < 0.05$ as determined by Tukey and Student-Newman-Keul's multiple range tests).

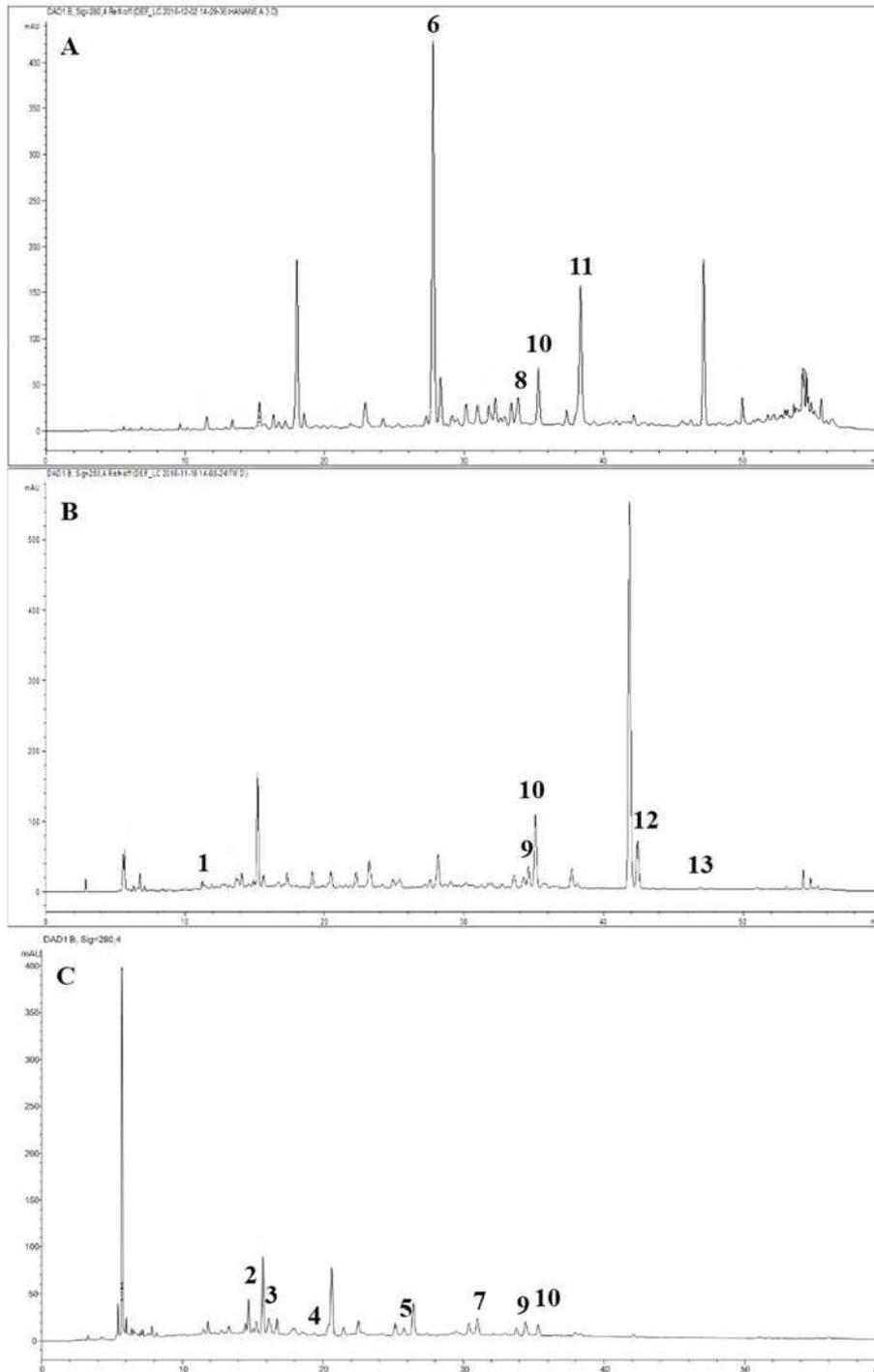


Figure 1. HPLC-UV-DAD chromatograms of ethyl acetate extract (A), methanol extract (B), and aqueous extract (C) of *T. microphylla* at 280 nm. Resorcinol (1), catechin (2), chlorogenic acid (3), syringic acid (4), sinapic acid (5), *trans*-3-hydroxycinnamic acid (6), isoquercitrin (7), ellagic acid (8), myricetin (9), kaempferol 3-*O*-rutinoside (10), *trans*-cinnamic acid (11), luteolin (12), apigenin (13).

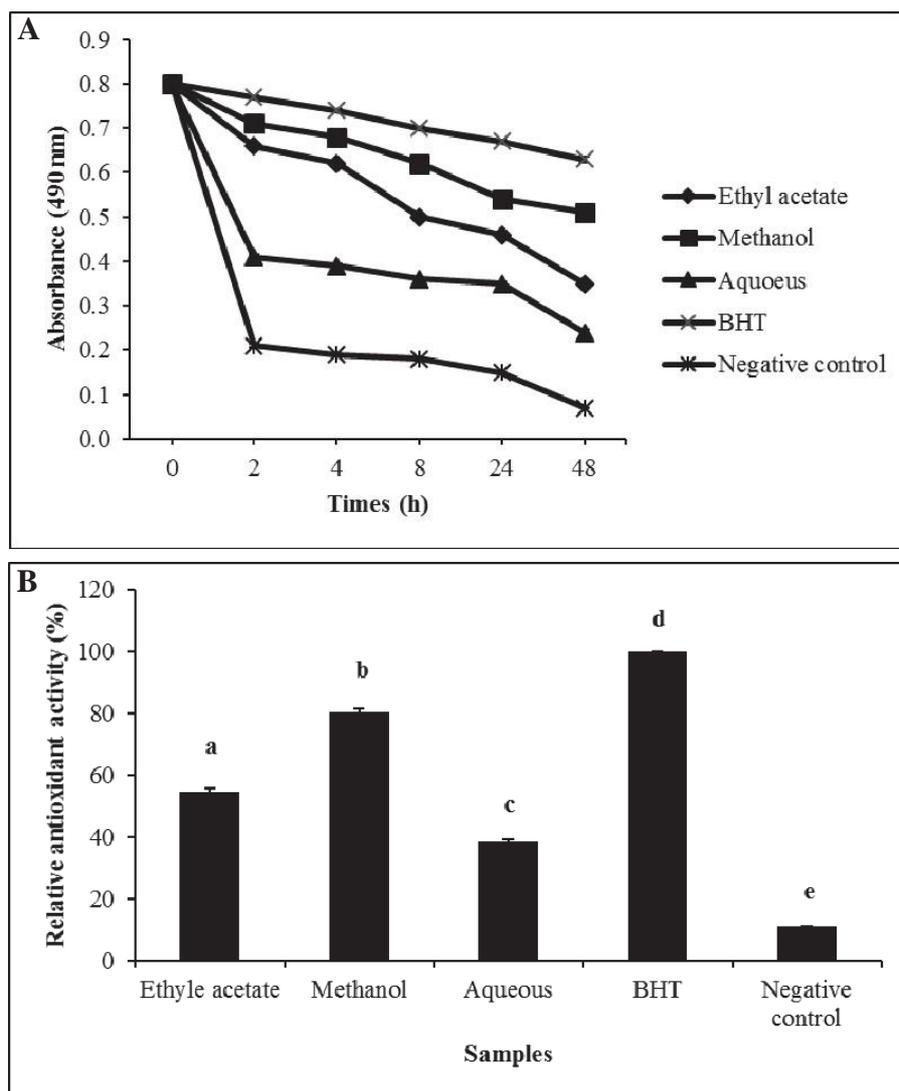


Figure 2. β-carotene/linoleic acid bleaching activity. **A** - Absorbance change of β-carotene at 490 nm in the presence of extracts of *T. microphylla*, BHT, and the negative control. Results are expressed as the mean ± standard error of the mean of triplicate measurements. **B** - Relative antioxidant activity of extracts of *T. microphylla*, BHT, and negative control. Results are expressed as the mean ± standard error of the mean of triplicate measurements. Samples not connected by the same letter are statistically different at $p < 0.05$ as determined by Tukey and Student-Newman-Keul's multiple range tests.

REFERENCES

- (1) Borris R.P., Blasko G. and Cordell G. A. Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol.* 1988; 24(1):41-91.
- (2) Quezel P. and Santa S. *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*; Tome II, CNRS: Paris. 1963, p 632-633.
- (3) Kerbab K., Mekhelfi T., Zaiter L., Benayache S., Benayache F., Picerno P., Mencherini T., Sansone F., Aquino R. P. and Rastrelli L. Chemical composition and antioxidant activity of a polar extract of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Nat. Prod. Res.* 2015; 29(7):671-675.
- (4) Mouhajir F., Hudson J. B., Rejdali M. and Towers G. H. N. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used by Berber peoples of Morocco. *Pharm. Biol.* 2001; 39(5):364-374.
- (5) Ghanem H., Haba H., Marcourt L., Benkhaled M. and Wolfender J. L. Microphynolides A and B, new spirogamma-lactone glycosides from *Thymelaea microphylla*. *Nat. Prod. Res.* 2014; 28(20):1732-1738.
- (6) Chermat S. and Gharzouli R. Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdim (Setif). *J. Mater. Sci. Eng.* 2015; 5(1-2):50-59.
- (7) Dahamna S., Dehimi K., Merghem M., Djarmouni M., Bouamra D., Harzallah D. and Khennouf S. Antioxidant, antibacterial and hypoglycemic activity of extracts from *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Int. J. Phytocos. Nat. Ingrid.* 2015; 2(1):15.
- (8) Noman L., Oke-Altuntas F., Zellagui A., Sahin Yaglioglu A., Demirtas I. M., Cardoso S., Akkal S., Gherraf N. and Rhouati S. A novel benzimidazole and other constituents with antiproliferative and antioxidant properties from *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Nat. Prod. Res.* 2017; 31(17):2032-2041.
- (9) Dehimi K., Speciale A., Saija A., Dahamna S., Raciti R., Cimino F. and Cristani M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Algerian *Thymelaea microphylla* coss. and dur. extracts. *Pharmacogn. Mag.* 2016; 12(47):203-210.
- (10) Cheriti A. and Sekkoum K. Phytochemical investigation of *Thymelaea microphylla* growing in Algeria. *Acta Chim. Slov.* 1995; 42(3):373-374.
- (11) Mekhelfi T., Kerbab K., Guella G., Zaiter L., Benayache S. and Benayache F. Phytochemical constituents of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Algeria. *Der Pharm. Lett.* 2014; 6(1):152-156.
- (12) Noman L., Oke-Altuntas F., Zellagu A., Demirtas I. and Salah R. Isochamaejasmin and other Flavonoids Isolated from an Endemic Algerian Desert Species. *J. Turkish Chem. Soc. Sect. Chem.* 2018; 5(2):347-354.
- (13) Rached W., Benamar H., Bennaceur M. and Marouf A. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J. Biol. Sci.* 2010; 10(4):316-324.
- (14) Benamar H., Marouf A. and Bennaceur M. Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* from Algeria. *J. Herbs Spices Med. Plants* 2018; 24(3):229-244.
- (15) Wagner H. and Bladt S. *Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas*; Springer: Berlin. 1996, p 1-357
- (16) Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299:152-178.
- (17) Kim D., Chun O. K., Kim Y. J., Moon H. and Lee C. Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51(22):6509-6515.
- (18) Sun B., Richardo-da-Silvia J. M. and Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agri. Food Chem.* 1998; 46(10):4267-4274.
- (19) Prieto P., Pineda M. and Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphor molybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 1999; 269(2):337-341.

- (20) Cavin A., Hostettmann K., Dyatmyko W. and Potterat O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med.* 1998; 64(5):393-396.
- (21) Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26(9-10):1231-1237.
- (22) Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M. and Sokmen A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem.* 2007; 100(2):584-589.
- (23) Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* 1986; 44(6):307-315.
- (24) Bauer A., Kirby W. W. M. M., Sherris J. C. and Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966; 45(4):493-496.
- (25) Shahidi F., Janitha P. K. and Wanasundara P.D. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992; 32(1):67-103.
- (26) Cowan M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(4):564-582.
- (27) Usman H., Abdulrahman F. I., Ahmed L. A., Kaita A. H. and Khan I. Z. Antibacterial effects of cyanogenic glucoside isolated from the stem bark of *Bauhinia rufescens* Lam. *I.J.B.C.S.* 2013; 7(5):2139-2150.
- (28) Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997; 2(4):152-159.
- (29) Yahyaouia M., Bouajilac J., Cazaux S. and Abderrabba M. The impact of regional locality on chemical composition, anti-oxidant and biological activities of *Thymelaea hirsuta* L. extracts. *Phytomedicine* 2018; 41:13-23.
- (30) Benhammou N., Bekkara F. A. and Panovska T. K. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chim.* 2009; 12(12):1259-1266.
- (31) Navarro J. M., Flores P., Garrido C. and Martinez V. Changes in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 2006; 96(1):66-73.
- (32) Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A. and Abdelly C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol.* 2008; 331(11):865-873.
- (33) Belyagoubi-Benhammou N., Belyagoubi L. and Bekkara FA. Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. *J. Med. Plants Res.* 2014; 8(40):1198-1207.
- (34) Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. and Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006; 97(4):654-660.
- (35) Hayouni E. A., Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* 2007; 105(3):1126-1134.
- (36) Jayaprakasha G. K., Singh R. P. and Sakariah K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem.* 2001; 73(3):285-290.
- (37) Larson R. A. The antioxidant of higher plants. *Phytochemistry* 1988; 27(4):969-978.
- (38) Kanatt S. R., Chander R. and Sharma A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.* 2007; 100(2):451-458.
- (39) Carranza M. S. S., Oyong G. G., Linis V. C., Ajero M. D. M. and Tan M. C. S. The Antioxidant and Antiproliferative Agents from the bark of Philippine *Alstoniascholaris* (L.) R. Br. (Apocynaceae). *J.J.P.S.* 2020; 13(2):207-224.
- (40) Khaled R., Lai C.-S., Pan M.-H. and Chistiane F. Study of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of the Aerial Parts of *Ficus nitida* L. (Moraceae) and its Phytochemical Composition. *J.J.P.S.* 2018; 11(2):79-83.

- (41) Nascimento G. G. F., Locatelli J., Freitas P. C. and Silva G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 2000; 31(4):247-256.
- (42) Noman L., Zellagui A., Hallis Y., Yaglioglu A. S., Demirtas I., Gherraf N. and Rhouati S. Antioxidant and antimicrobial activities of an endemic desert species *Thymelea microphylla* Coss. et Dur. *Der Pharm. Lett.*

2015; 7(1):118-121.

- (43) Shadid K. A., Al-Lahham S., Jaradat N., Abu-Nameh E. S. M. and Qaisi A. M. Preliminary Phytochemical Screening, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Aqueous, Methanol, Acetone, and Hexane Fractions of *Centaurea cyanoides* Wahlenb. *J.J.P.S.* 2019; 12(1): 21-32.

تحديد المركبات الفينولية وتقييم القدرة المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا لتيميليا ميكروفيليا من الصحراء الجزائرية الغربية (عين الصفراء)

- علام حنان^{1,2}، بن ناصر مليكة^{1,3}، رياض كسوري⁴، ربيعة ساحقي⁵، عبد الرزاق معروف⁶، هواري بن عمر^{1,3,7}
- ¹ قسم علم الأحياء، كلية العلوم الطبيعية والحياة، جامعة وهران 1، وهران، الجزائر
- ² قسم علم الأحياء، كلية العلوم الطبيعية، علوم الحياة والأرض والكون، جامعة تلمسان أبو بكر بلقايدي، تلمسان، الجزائر
- ³ مخبر البحث على المناطق الجافة، العليا، باب الزوار، الجزائر، الجزائر
- ⁴ مخبر النباتات العطرية والطبية، مركز البيوتكنولوجيا ببرج سيدريا، حمام الأنف، تونس
- ⁵ المعهد الوطني لأبحاث الغابات، تمنراست، الجزائر
- ⁶ قسم العلوم الطبيعية والحياة، معهد العلوم والتكنولوجيا، المركز الجامعي لنعام، النعام، الجزائر
- ⁷ قسم علم الأحياء، كلية العلوم الطبيعية والحياة، جامعة مستغانم عبد الحميد ابن باديس، مستغانم، الجزائر

ملخص

يعرف *Thymelaea microphylla* محليا باسم المثنان وهو نبات طبي شيع استخدامه في الطب التقليدي في الصحراء الجزائرية وله تركيبة كيميائية ذات خصائص علاجية.

الاهداف: تهدف هذه الدراسة إلى التعرف على المركبات الفينولية وتقييم القدرة المضادة للأكسدة لمستخلصات خلاص الإيثيل، الميثانول، و الماء من الأجزاء الهوائية لنبات المثنان حيث استعملت أربع طرق مختلفة لتقدير النشاط المضاد للأكسدة: عن طريق فوسفوموليبيديوم، واختبار إرجاع الجذر الحر DPPH، واختبار ABTS، وتثبيط بيروكسيدات الدهون المتمثل في اختبار تبيض البيتا كاروتين، واختبار قدرة الإختزال. كما تم تقدير النشاط المضاد للميكروبات باستخدام تقنية الانتشار من الأقراص فضلا عن تحليل المركبات الفينولية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بمكشاف الأشعة فوق البنفسجية والمرتبطة بمطياف المجموعة الضوئية (HPLC-UV-DAD).

النتائج: أظهرت العينات المختبرة قدرة عالية مضادة للأكسدة من خلال اختبار إرجاع الجذور الحرة وتثبيط أكسدة البيتا كاروتين وقدرة الإختزال. تعزى القدرة العالية المضادة للأكسدة إلى المحتوى العالي من المركبات الفينولية في المستخلصات المختبرة حيث أظهر مستخلص الميثانول الذي يحتوي على محتوى عالي من المركبات الفينولية والفلافونويدية أعلى نشاط مضاد للأكسدة كما أظهر هذا المستخلص أعلى نشاط مضاد لبعض البكتيريا المسببة للأمراض البشرية من بين المستخلصات المختبرة ضد البكتيريا الايجابية الجرام والسالبة الجرام. أسفرت تحاليل كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء على التعرف على بعض أحماض الفينول، جليكوسيدات الفلافونويدية وأجزائها الغير سكرية.

الخلاصة: تكشف هذه الدراسة للمرة الأولى أن مستخلص الميثانول للأجزاء الهوائية لنبات المثنان يتميز بالأنشطة العالية المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا وغناه بالمركبات الفينولية وهو ما يدعم استخدام هذا النبات في الطب التقليدي أو استخدامه كمصدر طبيعي لمواد فعالة كمضادات الأكسدة ومضادات البكتيريا.

الكلمات الدالة: مستخلصات الجزء الهوائي، مضادات الأكسدة، مضادات الميكروبات، HPLC-UV-DAD، مركبات الفينول، *Thymelaea microphylla*.

تاريخ استلام البحث 2019/4/27 وتاريخ قبوله للنشر 2020/2/12.

Résumé :

Dans ce travail, deux plantes ont été ciblées pour leurs utilisations en médecine traditionnelle. Il s'agit de *Thymeleae microphylla* (Thymelacées) et *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* L. (Asteracées). Les objectifs poursuivis sont l'identification de certains composés bioactifs et l'évaluation des activités biologiques. Ainsi, il a été procédé à l'extraction de certains métabolites secondaires, à la caractérisation de molécules bioactives à partir des différents extraits et à l'étude de leurs activités antioxydantes, anti-enzymatique et antimicrobienne. L'analyse HPLC-UV-DAD des extraits des deux espèces a permis de caractériser les principaux composés phénoliques. Pour la plante *T. microphylla*, treize composés phénoliques sont identifiés dont le kaempférol 3-O-rutinoside (4,849 mg /g-1 ES) et l'acide trans-3-hydroxycinnamique (4,744 mg/g-1 ES) sont les composés principaux. Pour *Artemisia judaica*, onze composés sont identifiés avec le kaempférol (20,9 mg / g-1 ES), le resvératrol 3-O-glucoside (5,045 mg / g-1 ES), en tant que composés principaux. Les extraits MeOH des deux espèces présentent les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes les plus élevées. Les activités antioxydantes ont été déterminées, *in vitro*, à travers les tests d'évaluation suivants: capacité antioxydante totale (CAT), piégeage du radical libre DPPH, l'activité inhibitrice du radical ABTS+, le pouvoir réducteur, et le blanchiment du β -carotène. Les extraits MeOH de *T. microphylla* et *A. judaica* présentent le meilleur pouvoir réducteur. En outre, le blanchiment de la β -carotène de l'extrait MeOH de *T. microphylla* est plus actif que les autres extraits. Concernant *A. judaica*, la capacité d'inhibition la plus importante est mesurée dans l'extrait AcOEt. L'activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase est absente pour tous les extraits de la partie aérienne des deux plantes testées. L'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques et celle des microdilutions en milieu liquide. Tous les extraits de *T. microphylla* présentent des zones d'inhibition contre *S. aureus* avec une activité élevée pour l'extrait Aq (36,00 \pm 0,58 mm). Pour *A. judaica*, l'activité la plus importante a été observée contre *P. vulgaris* pour l'extrait Aq (22,33 \pm 0,67 mm). L'ensemble des résultats obtenus indiquent que les extraits de ces espèces peuvent constituer une source potentielle d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens.

Mots clés : *Thymeleae microphylla*, *Artemisia judaica* subsp *sahariensis*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antimicrobienne, acétylcholinestérase.

Abstract:

In this work, two plants were targeted for their uses in traditional medicine. They are *Thymeleae microphylla* (Thymelaceae) and *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* L. (Asteraceae). The objective of the present study was the identification of certain bioactive compounds and the evaluation of biological activities. Thus, it was carried out the extraction of certain secondary metabolites, the characterization of bioactive molecules from the various extracts and the study of their antioxidant, anti-enzymatic and antimicrobial activities.

The HPLC-UV-DAD analysis of the extracts of two species allowed to characterize the main phenolic compounds. For the *T. microphylla* plant, thirteen phenolic compounds are identified of which kaempferol 3-O-rutinoside (4.849 mg g-1 DE) and trans-3-hydroxycinnamic acid (4.744 mg g-1 DE) are the main compounds. For *Artemisia judaica* plant, eleven compounds are identified with kaempferol (20.9 mg/g DE), resveratrol 3-O-glucoside (5045 mg/g DE), as the major compounds. The MeOH extracts of both species show the highest content of phenolic compounds and flavonoids. Antioxidant activities were determined *in vitro*, through the following assessment assays: total antioxidant capacity (TAC), DPPH free radical scavenging, ABTS+, reducing power activity (RPA), radical inhibitor activity, and β -carotene bleaching. The MeOH extracts of *T. microphylla* and *A. judaica* show the best reducing power. In addition, the β -carotene bleaching of *T. microphylla* MeOH extract is more active than other extracts. Concerning *A. judaica* plant, the greatest inhibition capacity is measured in the AcOEt extract. The inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase is absent for all the extracts of the aerial part of the two plants tested. The antimicrobial activity was carried out by disc diffusion method and the liquid microdilution method. All *T. microphylla* extracts have inhibition zones against *S. aureus* with high activity for the Aq extract (36.00 0.58 mm). For *A. judaica* plant, the greatest activity was observed against *P. vulgaris* for the Aq extract (22.33 \pm 0.67 mm). The results obtained indicate that the extracts from these species can be a potential source of natural antioxidants and antimicrobial agents.

Key words: *Thymeleae microphylla*, *Artemisia judaica* subsp *sahariensis*, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, acetylcholinesterase.

الملخص:

إستهدف هذا العمل نبتتين لأهمية إستخدامهما في الطب التقليدي وهما :
Thymeleae microphylla و

Artemisia judaica subsp *sahariensis* L.

حيث أن الأهداف المنشودة تتمثل في تحديد بعض المركبات النشطة بيولوجيا وتقييم الأنشطة البيولوجية، تضمن ذلك استخراج بعض المستقلبات الثانوية، وتوصيف الجزيئات النشطة بيولوجيًا من المستخلصات المختلفة ودراسة أنشطتها المضادة للأكسدة والأنزيمية ومضادات الميكروبات.

تم تحليل لمستخلصات لكلا النبتتين بواسطة HPLC-UV-DAD، مما سمح بتحديد مركبات الفلافونويد والأحماض الفينولية الرئيسية.

بالنسبة لنبات *Thymeleae microphylla* تم تحديد ثلاثة عشر مركبًا فينوليًا منها

4,849 mg/g DE وحمض trans-3-hydroxycinnamic 4,744 mg/g DE من المادة الجافة كمكونات رئيسية. بالنسبة لنبات *Artemisia judaica* تم تحديد أحد عشر مركبًا 20.9 mg/g DE، 5.045 resveratrol 3-O-glucoside mg/g DE من المادة الجافة، كمكونات رئيسية.

تحتوي مستخلصات MeOH من كلا النوعين على أعلى محتوى من المركبات الفينولية والفلافونويد.

تم تحديد الأنشطة المضادة للأكسدة في المختبر من خلال إختبارات التقييم التالية :

عن طريق فوسفوموليبدنوم، إختبار إرجاع الجذر الحر DPPH، إختبار ABTS، إختبار قدرة الإختزال و تثبيط بيروكسيدات الدهون المتمثل في تبييض B Carotène. تمتلك مستخلصات MeOH لكلا النوعين أفضل قوة إختزالية.

تبييض B Carotène لمستخلص MeOH لنبات *Thymeleae microphylla* أكثر نشاطًا من المستخلصات الأخرى.

بالنسبة لنبات *Artemisia judaica*، فمستخلص الAcOEt كان أكثر فعالية لتبييض B Carotène.

لا يوجد نشاط تثبيط لأنزيم AChE لجميع مستخلصات الجزء الهوائي لكلا النبتتين.

تم إجراء النشاط المضاد للميكروبات من خلال طريقة الانتشار على الأفراس وذلك الخاصة بالتخفيفات الدقيقة في الوسط السائل .

تظهر جمع مستخلصات Aq لنبات *Thymeleae microphylla* أعلى نشاط فعال لمضاد للبكتيريا (*S. aureus* 36.00 \pm 0.58 مم).

بالنسبة لنبات *Artemisia judaica*، مستخلص Aq كان أكثر فعالية ضد *P. vulgaris* (22.33 \pm 0.67 مم).

تشير جميع النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن مستخلصات هذه الأنواع يمكن أن تشكل مصدرًا محتملاً لمضادات الأكسدة الطبيعية والعوامل المضادة للميكروبات .

الكلمات المفتاحية:

Thymeleae microphylla ، *Artemisia judaica* subsp *sahariensis* ، المركبات الفينولية ، نشاط مضادات الأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات ، أستيل كولينستريز .