

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Hadj Lakhdar - BATNA 1

Faculté des Sciences de la Matière

Département de Chimie



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du
Diplôme de Doctorat

par :

KHEBRI SOUAD

Thème :

**Étude Phytochimique et biologique des extraits des espèces
Marrubium alysson et *Cistus clusii* des régions des Aurès.**

Spécialité : Chimie Organique

Soutenue le 16 /02 / 2023

Devant le jury :

Président :	HABA Hamada	Professeur	Université Batna-1
Rapporteur :	BENKIKI Naima	Professeur	Université Batna-2
Examineurs :	ATMANI Djebbar	Professeur	Université Bejaia
	ARRIF Souad	Maitre de conférences A	Université Batna-1
	BENBELLAT Nora	Maitre de conférences A	Université Batna-1
	OUAHAB Ammar	Maitre de conférences A	Université Batna-2

Remerciements

Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire (LBMBPC) de la Faculté des Sciences Biologiques de l'université Batna 2 sous la direction du Professeur Benkiki Naima, Enseignante chercheuse au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour accomplir cette thèse.

*Premièrement, j'adresse mes chaleureux remerciements, à ma directrice de thèse : Madame **Benkiki Naima**, Professeur à l'université de Batna 2, qui a accepté de diriger cette thèse, et qui m'a guidé tout au long de ce travail de recherche. Je rends hommage à son honnêteté scientifique et morale. Merci à vous de m'avoir soutenue, encouragé tout au long du chemin de la réalisation de cette thèse et de m'avoir accordé votre disponibilité, et confiance durant toutes ses années.*

*Ma reconnaissance à Monsieur **Haba Hamada**, Professeur à l'université de Batna1 pour l'honneur d'avoir acceptée la présidence du jury, et aussi pour sa contribution scientifique, je lui exprime mes gratitude et reconnaissances.*

*Je tiens également à remercier les membres du jury, le professeur Atmani **Djebbar** de l'université de Béjaïa, Dr **Ouahab Ammar** de l'université de Batna 2, Dr **Benbellat Noura** Maître de conférences à l'université de Batna 1, et Dr **Arrif Souad** Maître de conférences à l'université de Batna 1, qui m'ont honoré en acceptant de juger ce travail de thèse.*

Mes sincères remerciements aux responsables et membres du laboratoire de Biotechnologie des Molécules Bioactives et de la Physiopathologie Cellulaire (LBMBPC) université Batna2.

*Je remercie également le Professeur **Oudjih Bachir**, pour son aide à identifier les espèces végétales étudiées.*

*Mes profonds remerciements à Madame Dr **Susana Maria Cardoso**, à l'université de Aveiro Portugal, pour sa contribution scientifique.*

Je remercie vivement toute l'équipe du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques (C.R.A.P.C) et l'ensemble des responsables et ingénieurs, qui

ont su se rendre disponibles pour effectuer les analyses en spectrométrie de résonance RMN nécessaires à ce travail, et ceci malgré les multiples charges qui leurs sont attribuées.

Je remercie vivement toute l'équipe du Centre de Recherche de biotechnologie de Sfax Tunisie, pour la réalisation des analyses par l'HPLC, et la GC/MS.

A mes collègues et amis, Samia, Assia, et Souad, merci infiniment pour avoir rendu mon aventure de recherche agréable et passionnante, tous mes encouragements pour la suite.

J'aimerai remercier toute personne de près ou de loin, ayant contribué à la réalisation de cette thèse.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents, pour leurs amours, pour leurs soutiens et leurs encouragements tout au long de mes études

Un grand merci à mes frères Mouhamed & Ramzi, mes sœurs Hayet, Mouna et Asma, sans oublier mes chers : Soujoud, Abderrahmane, Nouh et toute ma famille pour leurs gentilleses et soutiens.

Un grand merci plein d'amour s'adresse également à toutes mes chères amies et collègues pour leurs soutiens, encouragements et amours.

Je voudrais également exprimer ma sincère reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin tout au long de cette période pour leurs aides précieuses, encouragements, et sympathies.

Table de matières

Remerciements	
Dédicaces	
Table des matières	I
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	IX
Liste des abréviations	X
Introduction générale	01

Chapitre I : Etude bibliographique

Partie I.A : Genres Cistus et Marrubium

A.1	Famille Lamiaceae	05
A.2	Genre Marrubium	07
A.2.1	Utilisations traditionnelles des espèces <i>Marrubium</i>	07
A.2.2	Activités biologiques	08
A.2.3	Etudes antérieures sur le genre <i>Marrubium</i>	08
a)	Les huiles essentielles	09
b)	Phényléthanoïdes glycosides	09
c)	Phénylpropanoïdes du genre <i>Marrubium</i>	10
A.3	Famille Cistaceae	12
A.3.1	Classification botanique	12
A.3.2	Utilisations traditionnelles	13
A.3.3	Présentation du genre <i>Cistus</i>	13
A.4	Les composés phénoliques	14
A.4.1	Les acides phénoliques	14
A.4.2	Les acides phénoliques du genre <i>Cistus</i>	16
	Références bibliographiques	18

Partie I.B : Métabolomique et Activités biologiques

B.1	Métabolomique	22
B.1.1	Les techniques d'analyses utilisées en métabolomiques	22
a)	La spectrométrie de masse	22
b)	GC/MS	24
c)	UHPLC-ESI-Q-TOF-MS	24
B.1.2	Les banques de données en métabolomique	26
a)	La base de données Golm	26
b)	La base de données METLIN	27
c)	La base de données MassBank	27

B.2	Les Activités Biologiques	29
B.2.1	Activité antioxydante	30
	a) Stress oxydant	30
	b) Radicaux libres	30
	c) Antioxydants	30
B.2.2	Activité antibactérienne	31
	a) Antibiotique	31
	b) Principales classes des métabolites antimicrobiens	32
B.2.3	Activité In silico	32
	B.2.3.1. Modèles pharmacophores	32
	B.3.2.2 Modèles QSAR	33
	Références bibliographiques	35

Partie I.C : Exsudats et Huiles essentielles

C.1	Exsudats	38
C.1.1	Exsudats résineux	38
	a) Exsudats terpéniques	38
	b) Exsudats phénoliques	38
C.1.2	Les acides phénoliques des exsudats des plantes Cistacées	39
C.1.3	Techniques chromatographiques analytiques des résines végétales	39
	a) GC / MS	39
	b) HPLC et LC/MS	40
C.2	Huiles essentielles	41
	a) L'aromathérapie	41
	b) Huile essentielle Chymptopée H.E.C.T.	41
C.2.1	Composition chimique	41
	a) Terpènes	41
	b) Composés aromatiques	42
	c) Composés d'origine variée	43
C.2.2	Techniques d'extraction des HE	43
	C.2.2.1 Hydro-distillation	44
	C.2.2.2 Entraînement à la vapeur d'eau	44
	C.2.2.3 Extraction par micro-onde	45
	C.2.2.4 Extraction par ultrason	45
	C.2.2.5 Extraction par CO ₂ supercritique	46
C.2.3	Les huiles essentielles du genre <i>Cistus</i>	47
	Références bibliographiques	49

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1	Techniques analytiques et préparatives	52
II.1.1	Chromatographie sur couche mince (CCM)	52
II.1.2	Chromatographie liquide sur colonne (CC)	52
II.2	Détermination structurale	52
II.2.1	La chromatographie couplée à la spectroscopie de masse (UHPLC-MSn)	52
II.2.2	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN	52
II.3	Etude phytochimique de l'espèce <i>C. clusii</i>	53
II.3.1	Extraction de l'huile essentielle	53
II.3.2	L'analyse de l'huile essentielle de <i>C. clusii</i> par GC/MS	53
II.3.3	Extraction de l'exsudat	54
II.3.4	Analyse de l'exsudat de <i>C. clusii</i> par GC/MS	55
II.3.5	Fractionnement et purification de l'extrait exsudat	55
II.3.6	Composés isolés de l'espèce <i>C. clusii</i>	55
II.4	Etude phytochimique de l'espèce <i>M. alysson</i>	56
II.4.1	Extraction	56
II.4.2	Analyses des extraits de <i>M. alysson</i>	57
II.4.2.1	Préparation des échantillons	57
II.4.2.2	Conditions opératoires	57
II.5	Activités biologiques	58
II.5.1	Dosage des polyphénols totaux	58
II.5.2	Dosage des flavonoïdes	59
II.5.3	Activité antibactérienne	59
II.5.4	Activité antioxydante	60
II.5.4.1	Test de réduction de cuivre (CUPRAC)	60
II.5.4.2	DPPH	60
II.5.4.3	Test de blanchissement du β -carotène	60
II.5.5	Activité in silico anti covid 19	61
II.5.5.1	Bases de données utilisées	61
II.5.5.2	Logiciels	61
II.5.5.3	Procédure expérimentale	62
	Références bibliographiques	63

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1	Identification des composants de l'HE de <i>C. clusii</i>	65
III.2	Analyse par GC/MS de l'exsudat	67

III.2.1	Identification du composé 1	69
III.2.2	Identification du composé 2	70
III.2.3	Identification du composé 3	71
III.2.4	Identification du composé 4	72
III.2.5	Identification du composé 5	74
III.2.6	Identification du composé 6	75
III.3	Identification structurale par RMN ¹ H	76
III.3.1	Identification structurale du composé P1	76
III.3.2	Identification structurale du P2	80
III.3.3	Identification structurale du P3	83
III.4	Analyse de l'extrait aqueux de l'espèce <i>C. clusii</i> par LC/MS	86
III.4.1	Identification structurale du Composé 1	87
III.4.2	Identification structurale du Composé 2	87
III.4.3	Identification structurale du Composé 3	89
III.4.4	Identification structurale du Composé 4	90
III.4.5	Identification structurale du Composé 5	90
III.4.6	Identification structurale des Composé 6 et 7	90
III.4.7	Identification structurale du Composé 8	90
III.4.8	Identification structurale du Composé 9	91
III.4.9	Identification structurale du Composé 10	91
III.4.10	Identification structurale du Composé 11	91
III.4.11	Identification structurale du Composé 12	92
III.4.12	Identification structurale du Composé 13	92
III.4.13	Identification structurale du Composé 14	93
III.5	Etude phytochimique de la plante <i>M. alysson</i>	94
III.5.1	Identification du Composé 1	95
III.5.2	Identification du Composé 2	96
III.5.3	Identification du Composé 3	97
III.5.4	Identification du Composé 4	98
III.5.5	Identification du composé 5	99
III.5.6	Identification du composé 6	100
III.5.7	Identification du composé 7	101
III.5.8	Identification du composé 8	102
III.6	Activités Biologiques	104
III.6.1	Dosage des poly-phénols totaux	104
III.6.2	Activités biologiques de l'HE de <i>C. clusii</i>	105

III.6.2.1	Activité antioxydante	105
III.6.2.2	Activité antimicrobienne de l'HE	107
III.6.3	Activité antioxydante des extraits des plantes <i>C. clusii</i> , et <i>M. alysson</i>	108
III.6.3.1	Test de la réduction du cuivre (CUPRAC)	109
III.6.3.2	Test anti-radicalaire DPPH	110
III.6.3.3	Test de blanchiment du β -carotène	111
III.6.4	L'Activité antimicrobienne des extraits des espèces <i>M.alysson</i> et <i>C. clusii</i>	112
III.6.5	Activité in silico anti covid 19	113
	Références bibliographiques	119
	Conclusion Générale	126
	Résumés (arabe, français et anglais)	
	Annexes	
	Publication	

Liste des figures

Figure I.A.1	Les principaux composants des huiles essentielles du <i>Genre Marrubium</i> .	9
Figure I.A.2	Structures chimiques représentatives des PheG mono, di-, tri-, tétra- et penta-saccharidique	10
Figure I.A.3	Structures des phénylethanoides isolés du genre <i>Marrubium</i>	11
Figure I.A.4	Structure chimique de Cistanoside F	12
Figure I.A.5	Relation taxonomique entre les différents sous-genres contenus dans le genre <i>Cistus</i> de la famille des Cistaceae.	13
Figure I.A.6	Dérivés de l'acide benzoïque	15
Figure I.A.7	Dérivés d'acide cinnamique	16
Figure I.A.8	Structure des dérivés d'acide phénolique du genre <i>Cistus</i>	17
Figure I.B.1	Méthodes analytiques utilisées en métabolomique	22
Figure I.B.2	Principe de la spectroscopie de masse	23
Figure I.B.3	Composants essentiels d'un spectrophotomètre.	23
Figure I.B.4	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse	24
Figure I.B.5	Principe de l'ionisation ESI en mode positif	25
Figure I.B.6	Principe de la technologie Q-Tof	26
Figure I.B.6	La base de données Golm	26
Figure I.B.8	La base de données METLIN	27
Figure I.B.9	La base de données Massbank	28
Figure I.B.10	Schéma du stress oxydant	30
Figure I.B.11	Exemple de pharmacophore procréé avec le logiciel Ligand Scout 4.0	33
Figure I.C.1	Principaux composants phénoliques des exsudats	39
Figure I.C.2	Structures de mono-terpènes et de sesquiterpènes	42
Figure I.C.3	Structures de composés dérivés du phénylpropane	43
Figure I.C.4	Techniques d'extraction des HE	44
Figure I.C.5	Procédé d'extraction des HE par Hydrodistillation	44
Figure I.C.6	Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	45
Figure I.C.7	Extraction par micro-onde	45
Figure I.C.8	Extraction par ultrasons	46
Figure I.C.9	Procédé d'extraction des HE par CO ₂ supercritique	47
Figure II.1	Dispositif d'extraction de l'huile essentielle de <i>C.clusii</i>	53
Figure II.2	Schéma d'extraction des parties aériennes de la plante <i>C. clusii</i>	54
Figure II.3	Schéma d'extraction de <i>M. alysson</i>	57
Figure II.4	UHPLC-DAD-ESI-MSn (Thermo SCIENTIFIC 3000)	58
Figure III.1	Familles de composés présente dans l'HE de <i>C.clusii</i>	66
Figure III.2	Les produits majoritaire de l'HE de <i>C.clusii</i> Algérienne	67
Figure III.3	Chromatogrammes (A) exsudat brute, (B) fraction F3	68

Figure III.4	Fragmentation de l'acide trans-cinnamique.	69
Figure III.5	Spectre de mass de L'acide 4-hydroxy benzoïque	70
Figure III.6	Schéma de la décomposition de l'acide 4-hydroxy benzoïque	71
Figure III.7	Spectre de masse du composé 3 (l'acide P-coumarique)	72
Figure III.8	Spectre de masse du composé 3 (l'acide caféique)	73
Figure III.9	Schéma de la décomposition de l'acide Caféique	73
Figure III.10	Spectre de mass du composé 5	74
Figure III.11	Spectres de mass de l'acide ellagique / base de données FOODB	75
Figure III.12	Schéma de la décomposition de l'acide ellagique	75
Figure III.13	Spectre RMN ¹ H du produit P1	77
Figure III.14	Spectre RMN ¹³ C du produit P1	77
Figure III.15	Identification du composé P1 / base de données RMN	78
Figure III.16	Spectre HSQC du composé P1	79
Figure III.17	Spectre HMBC du composé P1	79
Figure III.18	Spectre RMN ¹ H du composé P2	80
Figure III.19	Spectre ¹³ C du composé P2	81
Figure III.20	Spectre HSQC du composé P2	82
Figure III.21	Spectre HMBC du composé P2	82
Figure III.22	Spectre RMN ¹ H du composé P3	84
Figure III.23	Spectre RMN ¹³ C du composé P3	84
Figure III.24	Spectre HSQC du composé P3	85
Figure III.25	Spectre HMBC du composé P3	85
Figure III.26	Chromatogramme de l'extrait aqueux de <i>C.clusii</i> .	86
Figure III.27	La fragmentation MS/ MS du composé 1	87
Figure III.28	Mécanisme de fragmentation de monogalloylglucose	88
Figure III.29	Mécanisme de fragmentation de glucogalline / base de données FoodDB	89
Figure III.30	Spectre de masse punicaline	89
Figure III.31	Schéma de fragmentation Ms de l'acide gallique	90
Figure III.32	Identification du composé 8 selon /de données Hmdb	91
Figure III.33	Spectre de mass du composé 11 / base de données hmdb	92
Figure III.34	Schéma de fragmentation du compose 12 / base de données hmdb	92
Figure III.35	Schéma de fragmentation du composé 13	93
Figure III.36	Schéma de fragmentation du composé 14	93
Figure III.37	Chromatogramme de l'extrait n-BuOH de <i>M.alysson</i>	94
Figure III.38	Spectre de masse du composé 1	95
Figure III.39	Mécanisme de formation des ions de fragmentation	96
Figure III.40	Spectre de masse du composé 2	96
Figure III.41	Spectre de masse du composé 3	97
Figure III.42	Mécanisme de formation des ions de fragmentation	97

Figure III.43	Spectre de masse du composé 4	98
Figure III.44	Mécanisme de fragmentation du composé 4	98
Figure III.45	Spectre de masse du composé 5	99
Figure III.46	Identification des métabolites par la base de données CFM-ID	100
Figure III.47	Spectre de masse du composé 6	101
Figure III.48	Identification du spectre de masse du composé 6 par CFM-ID	101
Figure III.49	Spectre de masse du composé 7	102
Figure III.50	Voie de fragmentation proposée pour verbascoside, leucoseptoside et forsythoside A	103
Figure III.51	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	104
Figure III.52	L'activité antioxydante de l'HE de <i>C.clusii</i> (Test DPPH)	106
Figure III.53	L'activité antioxydante de l'HE de <i>C.clusii</i> (Technique de blanchiment de β -carotène)	106
Figure III.54	Interactions ligands- Protéine (2AJF-Acide caféique)	114
Figure III.55	Interactions ligands-Protéine (2AJF- P-hydroxy benzoïque)	115
Figure III.56	Interaction ligands-Protéine (2AJF-acide trans-cinnamique)	116
Figure III.57	Interaction ligands-Protéine (2AJF-Rutine)	117
Figure III.58	Mode d'interaction 2AJF-Rutin 2D	118

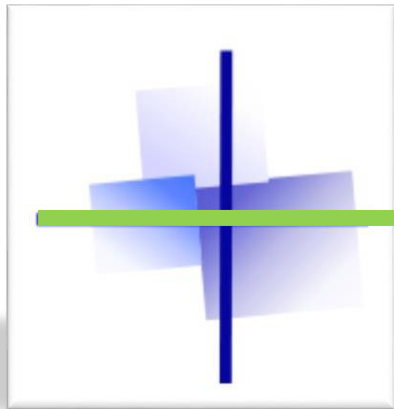
Liste des tableaux

Tableau I.A.1	Plantes de la famille des lamiacées et leurs utilisations dans la médecine traditionnelle.	6
Tableau I.A.2	Activités biologiques de quelques espèces du genre <i>Marrubium</i> .	8
Tableau I.A.3	Les principaux phénylétanoïdes isolés du genre <i>Marrubium</i> .	11
Tableau I.A.4	Phénylétanoïdes isolés du genre <i>Marrubium</i> .	11
Tableau I.A.5	Classification botanique de la famille Cistaceae.	13
Tableau I.A.6	Les dérivés de l'acide benzoïque.	14
Tableau I.A.7	Les dérivés de l'acide cinnamique.	15
Tableau I.A.8	Les dérivés d'acide phénolique du genre <i>Cistus</i> .	16
Tableau I.B.1	Les bases de données accessibles sur web.	28
Tableau I.B.2	Les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants.	31
Tableau I.C.1	Différentes méthodes d'extraction et techniques d'analyse des résines végétales.	40
Tableau I.C.2	Composés terpéniques des HE des différentes espèces des cistes	48
Tableau II.1	Paramètres chromatographiques d'analyse de l'extrait exsudat par GC/MS.	55
Tableau III.1	La composition chimique de l'HE de <i>C. clusii</i> .	65
Tableau III.2	Les principaux composants des HE des différentes espèces Algériennes	67
Tableau III.3	Ions caractéristiques (m/z) détectés dans les spectres de masse des dérivés de silylation.	68
Tableau III.4	Comparaison des déplacements chimiques de l'acide trans-cinnamique.	76
Tableau III.5	Comparaison des déplacements chimiques du ¹³ C de l'acide trans-cinnamique.	78
Tableau III.6	Comparaison des déplacements chimiques de l'acide 4-hydroxy benzoïque.	80
Tableau III.7	Comparaison des déplacements chimiques de l'acide 4-hydroxy benzoïque	81
Tableau III.8	Déplacements chimiques du composé P3	83
Tableau III.9	Comparaison des déplacements chimiques du ¹³ C du composé P3	83
Tableau III.10	Profil chimique de l'extrait aqueux de <i>C. clusii</i> .	87
Tableau III.11	Profil phytochimique de l'extrait Butanolique de <i>M. alysson</i> .	95
Tableau III.12	Teneur en phénols totaux et flavonoïdes des plantes <i>C. clusii</i> et <i>M. alysson</i> .	104
Tableau III.13	Résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE de <i>C. clusii</i>	107
Tableau III.14	Résultats du test CUPRAC	109
Tableau III.15	Activité antiradicalaire (Test DPPH)	110
Tableau III.16	Activité antioxydante (Test de β-carotène)	111
Tableau III.17	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>M. alysson</i> et <i>C. clusii</i> .	112

Liste des abréviations

HE	Huile essentielle
CCM	Chromatographie sur couche mince
VLC	Chromatographie liquide sous vide
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
UHPLC-MSn	Chromatographie liquide à ultra haute pression couplée à la Spectrométrie de masse
Linear Ion Trap 2D.	Spectrométrie de masse à piège ionique linéaire
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN 1H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
<i>C.clusii</i>	<i>Cistus clusii</i>
<i>M.alysson</i>	<i>Marrubium alysson</i>
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse
S	Singulet
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
t	Triplet
m	Multiplet
λ	Longueur d'onde
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Résonance magnétique nucléaire du proton
J	Constante de couplage en Hz
m/z	Masse/charge d'un ion
LC/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de mass
TMS	Tétraméthylsilane
TMCSi	Trimethylchlorosilane (CH ₃) ₃ SiCl
CHCl ₃	Chloroform
MeOH	Méthanol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute performance en phase inverse
EP	Extrait éthéro-pétrolique
AcOEt	Extrait acétate d'éthyle
Eaqcc	Extrait aqueux de l'espèce <i>C. clusii</i>
EExd	Extrait exsudat de l'espèce <i>C. clusii</i>
n-BuOH	Extrait butanolique de l'espèce <i>M.alysson</i>
UV-Vis	Spectroscopie ultraviolet-visible
kV	kilovolt
eV	L'électron-volt
°C	Degré Celsius
HZ	Hertz
nm	Nanomètre
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
ATCC	American Type Culture Collection
PhG	Phénylethanoïde
CUPRAC	<i>CUPric Reducing Antioxidant Capacity</i>
BHA	Butyl Hydroxy Anisol
BHT	Butyl Hydroxy Toluène

DPPH	<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
IC ₅₀	Concentration efficace à 50 %
PDB	Protein Data Bank
3CLpro	3-chymotrypsin like protease
SARS-CoV	Syndrome Respiratoire Aigu Sévère-corona virus



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction

La phytothérapie ou le traitement à base des plantes médicinales était d'usage usuel dans les anciennes civilisations qui s'intéressaient aux vertus thérapeutiques de certaines plantes. Elle se définit aussi comme étant une thérapie allopathique, basée sur l'usage des plantes médicinales, qui est fondée sur des informations issues de la tradition. Elle est destinée aux traitements préventifs et curative, de certaines maladies et pathologies, au moyen des plantes ou de préparations à base des plantes médicinales [1].

Actuellement, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés thérapeutiques des plantes dont il existe presque 21 000 espèces de plantes médicinales dans le monde. 80 % de la population utilisent des remèdes naturels pour se soigner. Ce retour vers les plantes est attribué à l'effet thérapeutique de leur principe actif comparativement aux effets indésirables des médicaments chimiques [2,3]. L'efficacité des plantes médicinales dans la thérapie de nombreuses pathologies a guidé les chercheurs à se focaliser sur les recherches approfondies des propriétés chimiques et pharmacologiques de ces plantes.

L'Algérie possède une grande richesse floristique, on compte presque 3000 espèces de plantes dont 15% sont classer comme étant des plantes endémiques appartenant à plusieurs familles botaniques [4]. Cette richesse en plantes médicinales présente plusieurs intérêts (économique et pharmaceutique). En effet, les plantes peuvent constituer une source importante de molécules bioactives grâce à leur richesse en métabolites. Ces dernières ont fait l'objet de diverses recherches, in vitro et in vivo, dans le but de trouver de nouveaux produits naturels d'intérêt thérapeutique.

La famille des Cistaceae est l'une des grandes importantes familles de plantes. Elle constitue une source importante de composés polyphénoliques constitués principalement d'acides phénoliques, flavonol, flavanol, ellagitannins et flavone [5].

De plus, l'importance des plantes de cette famille est due aux diverses activités biologiques intéressantes de celles-ci telles que : l'activité analgésique, antivirale, antimicrobienne, antifongique, antioxydante et anticancéreuse [6].

Les acides phénoliques constituent les formes les plus simples des composés phénoliques. D'une façon générale, ces molécules naturelles, dotées d'une activité antioxydante intéressante, ont une relation directe et importante avec la prévention des différentes maladies telles que les maladies : inflammatoires, cardiovasculaires, cancers et diabète [7]. Leur intérêt thérapeutique nous a suscité d'explorer l'existence de ce genre de molécules dans nos extraits de plantes.

INTRODUCTION

La famille des Lamiaceae (Labiées) est une grande famille des plantes très riche et diversifiée. Cette diversité est due à la richesse de celle-ci en métabolites secondaires incluant les polyphénols, les iridoïdes, les lactones mono-terpéniques et les phényléthanoids [8-9].

Les phényléthanoids isolés des plantes du genre *Marrubium*, ont montré un large spectre d'activités pharmacologiques in vitro et in vivo, notamment les activités : antibactérienne, antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire, neuroprotectrice, antioxydante, hépato protectrice, immunomodulatrice, analgésique, anti-radiations, anti-âge, propriété anti-fatigue, cardioprotectrice et autres... [10].

Les extraits de plantes sont composés de matrice très complexe, qui peuvent renfermer plusieurs centaines de métabolites. Le choix de la technique d'analyse des métabolites secondaires est très important, en fait les systèmes performants de spectrométrie de masse en tandem couplés à la chromatographie permettant une meilleure détection des métabolites sur une large gamme de masses et génèrent des données spectrales riches en informations [11].

L'objectif de notre travail de recherche consiste à la valorisation de la flore de l'est algérien (région des Aurès) par la recherche des composés biologiquement actifs, qui peuvent trouver leurs usages thérapeutiques.

Dans ce contexte, les deux plantes *M. alysson* et *C. clusii*, ont été sélectionnées pour leurs usage traditionnel connu en tant que : antimicrobien, antipyrétique, antispasmodique et anti-inflammatoire. Les méthodes chromatographiques et spectroscopiques modernes ont été utilisées pour l'exploration de la composition des métabolites suivant trois axes fondamentaux : investigation phytochimique, identification des métabolites secondaires et évaluation de leurs propriétés biologiques. La caractérisation chimique des extraits (déréplication) a été mise au point par des méthodes analytiques (LC/MS, GC/MS) pour l'identification structurale du profil chimique de ces extraits. La bio-informatique a été aussi utilisée en particulier pour la détermination de l'activité anti-covid 19.

Le présent travail s'articule sur l'utilisation de la technique de déréplication des différents extraits des plantes étudiées pour l'isolement des métabolites secondaires, suivie par une identification des produits majoritaires dans un mélange complexe (extrait ou fraction) et enfin l'évaluation de leur activité biologique.

Ce manuscrit se répartie en trois chapitres :

Le premier chapitre, consacré à la synthèse bibliographique, comporte trois parties :

INTRODUCTION

- ✓ La partie (A) : présente un aperçu bibliographique botanique et phytochimique des familles : Lamiaceae et Cistacea ;
- ✓ Dans la partie (B) : les outils de la métabolomique sont détaillés ;
- ✓ La partie (C) : englobe une synthèse bibliographique sur les exsudats et les huiles essentielles.

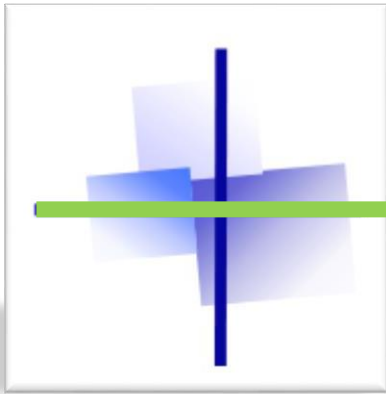
Dans le deuxième chapitre sont présentés le matériel analytique utilisé au cours de cette étude ainsi que les méthodes expérimentales employées à savoir :

- 1- La récolte et l'identification des plantes étudiées, l'extraction, déréplication phytochimique et les dosages quantitatifs des polyphénols / flavonoïde ;
- 2- L'isolement et la caractérisation des acides phénoliques par les différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques.
- 3- La déréplication phytochimique de l'extrait butanolique de *M. alysson*
- 4- L'évaluation in vitro et in silico des activités biologiques.

Le quatrième et dernier chapitre, consacré à la présentation et discussion des différents résultats obtenus, est destiné à la détermination structurale des composés identifiés dans un mélange complexe/ ou composés purs isolés d'une fraction d'extrait.

Enfin, le manuscrit s'achève par une conclusion générale reprenant les principaux résultats et interprétations, et ressort avec des perspectives futures qui permettront de compléter ce travail.

- [1] F. Mentouri, “Evaluation du potentiel pharmacologique et hépatotoxique du *Teucrium polium* L.,” 2018. Thèse de doctorat. Université Constantine. <https://docplayer.fr/184973885-Evaluation-du-potentiel-pharmacologique-et-hepatotoxique-du-teucrium-polium-l.html>.
- [2] U. Schippmann, D. J. Leaman, and a B. Cunningham, “Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues,” Chap in Book. Publisher: FAO, Editors: FAO, 2002
- [3] H. Kouider, B. Mohammed, M. Mohammed, O. Abdelkader, and R. Abdelkarim, “Importance des plantes médicinales pour la population rurale du parc national de Djebel Aissa (Sud Ouest Algerien),” 2019. [DOI: 10.25518/0457-4184.1864](https://doi.org/10.25518/0457-4184.1864).
- [4] P. Quezel and S. Santa, « Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales » Editions du centre national de la recherche scientifique 15, quai Anatole-France - Paris 7, 1962.
- [5] E. Barrajon-catalan, S. Fernandez-arroyo, C. Roldan, et al., “A Systematic Study of the Polyphenolic Composition of Aqueous Extracts Deriving from Several *Cistus* Genus Species: Evolutionary Relationship,” *Phytochem. Anal.*, vol. 22, pp. 303–312, 2011. [DOI:10.1002/pca.1281](https://doi.org/10.1002/pca.1281).
- [6] D. Papaefthimiou, A. Papanikolaou, V. Falara, et al., “Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes’ biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties,” vol. 2, no. June, pp. 1–19, 2014. [DOI:10.3389/fchem.2014.00035](https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035).
- [7] Y. Zhang, P. Cai, G. Cheng, and Y. Zhang, “A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity,” *Nat. Prod. Commun.*, vol. 17, no. 1, 2022. [DOI:10.1177/1934578X211069721](https://doi.org/10.1177/1934578X211069721).
- [8] H. Bendif, “Phytochemical constituents of Lamiaceae family,” *Rhazes: green and appl chem.*, vol. 11, no. 2, pp. 71–88, 2021.
- [9] I. Çaliş, “Biodiversity of Phenylethanoid Glycosides,” *Biodiversity*, pp. 137–149, 2002. [DOI:10.1007/978-1-4419-9242-0_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9242-0_15).
- [10] X. Y. Tian, M.-X. Li, T. Lin, Y. Qiu, et al., “A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 209, p. 112563, 2021. [DOI:10.1016/j.ejmech.2020.112563](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112563).
- [11] E. werner, “Analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée a la spectrométrie de masse : Application à la recherche de biomarqueurs indirects d’induction enzymatique,” 2011. Thèse de doctorat. Université Paris-sud 11. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00703475/document>.



CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A.1 Famille Lamiaceae

La famille des Lamiacées appelée aussi Labiées constitue l'une des principales familles de plantes angiospermes dicotylédones, ce sont des plantes herbacées, arbustes ou légèrement ligneuses, annuelles ou vivaces avec 233 à 263 genres et de 6 900 à 7 200 espèces. En Algérie, elle est représentée par 28 genres et 146 espèces. La majorité des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres), elles comportent les plantes aromatiques les plus utilisées comme sources mondiales d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante, elle représente également une source importante des huiles essentielles qui entrent dans l'industrie des produits cosmétiques et pharmaceutiques [1-3].

Description botanique et usage traditionnel

La majorité des Lamiacées sont généralement des plantes aromatiques, composées de tiges quadrangulaires aériennes, glabres ou poilues, et rarement avec des tiges souterraines stolonifères ou tuberculées.

Les feuilles sont généralement opposées (verticillées ou alternes) exstipulées, simples, parfois composées. Les jeunes tiges sont à section quadrangulaire. Les fleurs sont en général hermaphrodites, fréquemment réunies en cymes compactes, solitaires en position axillaire. Le calice a cinq dents ou lobes et peut être bilabié. La corolle possède 5 pétales, bilabiée et parfois actinomorphe avec 4 lobes [3,4].

Les plantes appartenant à cette famille sont dispersées dans le monde entier et considérées comme des plantes faciles à cultiver. De plus, leurs caractères aromatiques épicés en font un élément important dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. Un nombre important des plantes lamiacées sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés et activités biologiques [5,6].

Le Tableau I.A.1 récapitule certaines plantes de la famille des lamiacées et leurs utilisations dans la médecine traditionnelle [5].

Partie I.A Genre *Cistus* et *Marrubium*

Tableau I.A.1 Plantes de la famille des lamiacées et leurs utilisations dans la médecine traditionnelle

Nom Latin	Nom Commun	Utilisation traditionnelle	Utilisation en médication conventionnel approuvé
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym des jardins	Anti-septique, carminatif, eupeptique	Broncho-antispasmodique, Expectorant, Antibactérien
<i>Thymus serpyllum</i>	Thym sauvage	Spasmolytique, carminatif, antiseptique, Expectorant, sédatif	Antimicrobien
<i>Mentha piperita</i>	Menthe poivrée	Eupeptique, cholagogue, carminatif, pasmolytique.	SécrétoLytique eupeptique
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin	Eupeptique, irritant, additif alimentaire Cholagogue	Eupeptique, antispasmodique (Usage interne), en Maladies rhumatismales et Problèmes circulatoires (Usage externe)
<i>Melissa officinalis</i>	Mélissa officinalis	Sédatif léger, Cholagogue, Carminatif	Sédatif léger, Cholagogue, Carminatif Traitement symptomatique de l'herpès labial (Externe)
<i>Origanum vulgare</i>	Origan	Antiparasitaire, Antihelminthique, Cholagogue, Carminatif, spasmolytique	
<i>Origanum majorana</i>	Marjolaine	Antiparasitaire, antihelminthique, Cholagogue, carminatif, spasmolytique	antispasmodique
<i>Ocimum basilicum</i>	Basilic doux	Spasmolytique, eupeptique, carminatif	-
<i>Prunella vulgaris</i>	Brunelle commune	Antifébrile, immunorégulateur	

Partie I.A Genre *Cistus* et *Marrubium*

<i>Hyssopus officinalis</i>	hysope	Antiseptique, expectorant	
<i>Salvia officinalis</i>	Sauge	Antiseptique, astringent, gastro-protecteur inflammatoire, spasmolytique	Eupeptique Antibactérien, virostatique
<i>Satureja hortensis</i>	Sariette d'été	Antiseptique, Eupeptique, Spasmolytique.	
<i>Satureja montana</i>	Sarriette des montagnes	Antiseptique, eupeptique, spasmolytique	

A.2 Genre *Marrubium*

Le genre *Marrubium* regroupe environ 40 espèces, répandues principalement le long de la Méditerranée, les zones tempérées du continent Eurasien et quelques pays d'Amérique. La plupart des espèces sont des herbes annuelles ou vivaces à rhizome [7].

Généralement les plantes de ce genre sont tomenteuses, laineuses avec des feuilles crénelées et dentelées et des fleurs blanches, petites, disposées en verticilles axillaires et munies de bractéoles. Le genre *Marrubium* est doté d'un calice à 10 dents dont les 5 commissurales courtes, toutes terminées en pointe épineuse. En Algérie, 6 espèces différentes existent au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomel et *Marrubium deserti* de Noé [4,8].

A.2.1 Utilisations traditionnelles des espèces *Marrubium*

Certaines plantes du genre *Marrubium* sont pratiquées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies, notamment l'asthme, les infections pulmonaires, l'inflammation et l'hypotension. Elles sont aussi utilisées comme cholagogues et comme agents sédatifs et pour soulager la douleur [9,10]. La décoction du *M. vulgare* est utilisée également comme anti-diabétique, anti-diarrhéique, fébrifuge, anti-ictérique, expectorant, tonique et stimulant [11,12].

En outre, d'autres plantes ont une utilisation dans le traitement symptomatique de la toux et au cours des affections bronchiques aiguës. Elles sont considérées comme des anti-inflammatoires, antispasmodiques, et toniques amères [8,13].

A.2.2 Activités biologiques

Différentes activités biologiques ont été rapportées pour plusieurs espèces du genre *Marrubium*, Tel que : l'activité antioxydante, antimicrobienne, l'effet inhibiteur de certaines enzymes (α -Amylase, Lipoxygénase, Xanthine Oxidase et Tyrosinase), l'activité antidiabétique, antiulcéreuse, analgésique et anti-inflammatoire.

Le Tableau I.A.2. Résume les différentes activités biologiques des plantes du genre *Marrubium*

Tableau I.A.2 Activités biologiques de quelques espèces du genre *Marrubium*.

Espèces	Activités biologiques	Références
<i>Marrubium sivasense</i>	Antioxydante Inhibitrice des enzymes : α -Amylase, Lipoxygénase, Xanthine Oxidase Tyrosinase	[14]
<i>Marrubium alysson</i> L	Antioxydante, antipyrétique Gastro-protective, anticholestérol, anticancéreuse, Antivirale	[15-18]
<i>Marrubium alternidens</i> Rech	Cholagogue, Sédatif, Hypotensive	[19]
<i>Marrubium cordatum</i> Nabelek	(Protectrice contre la torsion des ovaires)	[20]
<i>Marrubium deserti</i>	Antimicrobienne antioxydante	[21]
<i>Marrubium incanum</i> Desr	Antimicrobienne	[22]
<i>Marrubium radiatum</i> Delile ex Benth	Antidiabétique	[23]

A.2.3 Etudes antérieures sur le genre *Marrubium*

Les plantes du genre *Marrubium* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques. Il a été montré, grâce à celles-ci, que les principaux métabolites secondaires de ce genre sont principalement : des flavonoïdes, des terpènes, des phénylpropanoïdes et des huiles essentielles [9].

a) Les huiles essentielles

Un aperçu sur les données de la littérature a révélé la présence d'une variabilité chimique des huiles essentielles du genre *Marrubium*. Le profil chimique des échantillons des huiles essentielles des différentes espèces du genre *Marrubium* [24] a montré des compositions riches en : Germacène D, β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, bicyclogermacène et spathuléol comme constituants principaux de celles-ci Figure I.A.1.

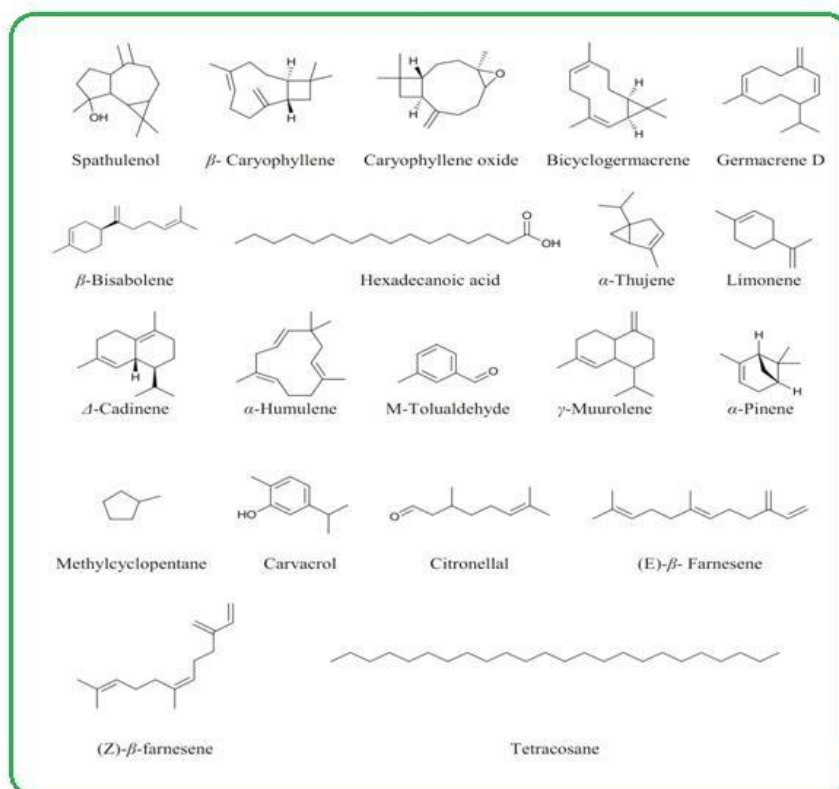


Figure I.A.1. Les principaux composants des huiles essentielles du Genre *Marrubium*

b) Phényléthanoïdes glycosides

Les phényléthanoïdes glycosides (PhG) sont généralement des composés phénoliques hydrosolubles présents dans de nombreuses plantes médicinales. Les PhG peuvent être isolés des racines, des tiges, des écorces, des feuilles, des fleurs, des fruits et des graines de plantes médicinales. Ils se trouvent également dans diverses plantes comestibles. Les principales familles de plantes riches en PhG sont : Acanthaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Gesneriaceae,

Lamiacées, Loganiaceae, Magnoliaceae, Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Portulacaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae et Verbenaceae [25-27].

En général, la structure de base des PhG consiste en une unité hydroxyphényléthyle en tant qu'aglycone qui est attaché à une fraction sucre, principalement un β -D-glucopyranose, par une liaison glycosidique au site C-1. Dans la plupart des cas, la partie glucose est estérifiée avec un dérivé d'acide hydroxycinnamique tel que l'acide caféique, l'acide coumarique, l'acide cinnamique et l'acide férulique. Le rhamnose, le xylose, l'arabinose, l'allose, le galactose et l'apiose, entre autres, peuvent également être attachés au résidu de glucose [28].

Selon le nombre de sucres lié à l'hydroxyphényléthyle, les PhG peuvent être classés en monosaccharidique, dissaccharidique, trisaccharidique, tétra-saccharidique et penta-PhGs saccharidiques Figure I.A.2 [28].

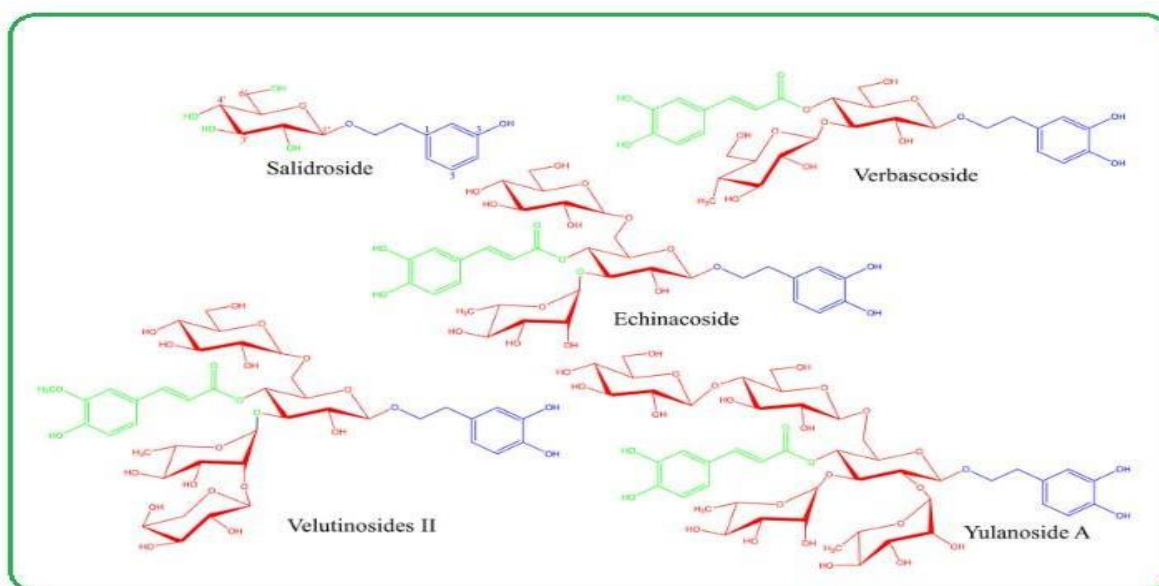


Figure I.A.2 Structures chimiques représentatives des PhG mono, di-, tri-, tétra- et penta-saccharidique

■ Sucre ■ Hydroxy-phényléthyle ■ Acide hydroxy-cinnamique

c) Phénylétanoides du genre *Marrubium*

Les phénylpropanoïdes les plus rencontrés dans le genre *Marrubium*, sont : l'actéoside et le forsythoside B. Des études antérieures, réalisées sur les extraits des différentes espèces de *Marrubium*, ont montré qu'ils contiennent de l'actéoside (1) [29], du forsythoside B(7) [30], de l'arenarioside (17), du leucosceptoside A (2), de l'echinacoside (5), de l'alyssonoside (8), du stachyoside D (10), du velutinoides I (13) et du velutinoides II (14) [9]. Les principaux phénylétanoides isolés du genre *Marrubium* sont illustrés dans le Tableau I.A.3.

Partie I.A Genre *Cistus* et *Marrubium*

Tableau I.A.3 : Les principaux phényléthanoides isolés du genre *Marrubium*

Espèce	Structure	Référence
<i>M. alysson</i>	(1), (2), (3), (4), (7), (8)	[9]
<i>M. vulgare</i>	(1), (7), (17), (16), (18)	[30]
<i>M. velutinum</i>	(1), (2), (5), (7), (8), (13), (14), (4), (6), (9), (10), (11), (12), (15), (19).	[31] [32]
<i>M. cylleneum</i>	(6)	[31]
<i>M. globosum ssp.</i> <i>libanoticum</i>	(1)	[33]
<i>M. peregrinum</i>	(1), (7), (16), (17)	[34]

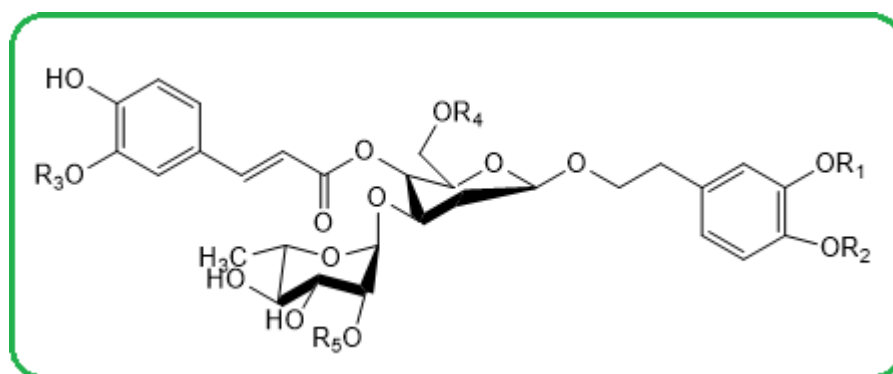


Figure I.A.3 Structures des phényléthanoides isolés du genre *Marrubium*

Tableau I.A.4 Phényléthanoides isolés du genre *Marrubium*.

Métabolite/ Radical	R1	R2	R3	R4	R5	N°
Actéoside	H	H	H	H	H	(1)
Leucosceptoside A	H	H	CH3	H	H	(2)
Leucosceptoside B	H	H	Apio	H	H	(3)
Martynoside	H	CH3	CH3	H	H	(4)
Echinacoside	H	H	H	Glu	H	(5)
6'-glucosyl-martynoside	H	CH3	CH3	Glu	H	(6)
Forsythoside B	H	H	H	Apio	H	(7)
Alyssonoside	H	CH3	CH3	Apio	H	(8)
Lavandulifolioside	H	H	H	H	Ara	(9)
Stachysoside D	H	CH3	CH3	H	Ara	(10)

Partie I.A Genre *Cistus* et *Marrubium*

Lamiophlomiside A	CH3	H	CH3	Apio	H	(11)
Velutinoside IV	CH3	H	CH3	H	Ara	(12)
Velutinoside I	H	H	H	Glu	Ara	(13)
Velutinoside II	H	H	CH3	Glu	Ara	(14)
velutinoside III	H	CH3	CH3	Glu	Ara	(15)
Ballotetroside	H	H	H	Apio	Ara	(16)
Arenarioside	H	H	H	Xylo	H	(17)
Marruboside	H	H	H	Apio	Apio	(18)

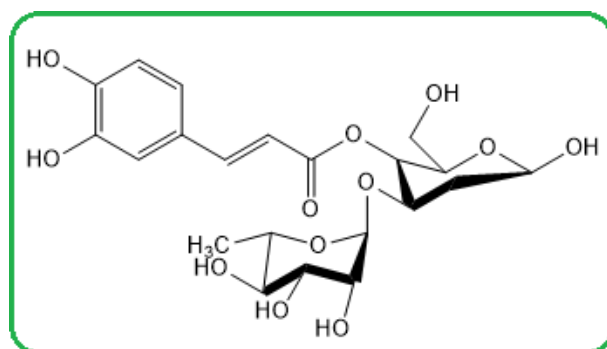


Figure I.A.4 Structure chimique de Cistanoside F (19)

A.3 Famille Cistaceae

La famille des Cistaceae (Cistacées) est une petite famille de plantes dicotylédones halophiles, généralement les plantes de cette famille sont des arbustes, sous-arbrisseaux et plus rarement des plantes herbacées. Elle comprend environ 180 espèces réparties en 8 genres, déterminés à partir de l'étude des fruits et des stigmates, à savoir : *Cistus*, *Helianthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Tuberaria*, *Crocانthemum*, *Hudsonia* et *Lechea* ; dont les deux premiers sont les plus répandus [35].

Les plantes de la famille des Cistacées, sont connues pour leurs jolis arbustes recouverts de belles fleurs [36]. Ces fleurs sont régulières, bisexuées, solitaires ou arrangées en cymes. Généralement, elles présentent 5 sépales, dont deux sont plus réduits, et 5 pétales. L'ovaire est composé de 5 à 10 carpelles et chaque loge renferme deux ou plusieurs ovules orthotropes. Les feuilles sont opposées, simples, stipulées et maintiennent dans certaines espèces des glandes sécrétrices d'huiles volatiles (*Cistus* et *Helianthemum*) ou des poils glanduleux [43,37].

A.3.1 Classification botanique

Plusieurs classifications, au niveau de l'ordre, ont été réalisées suite à des modifications basées sur des critères anatomiques et morphologiques : Bixales (Takhtajan 1987), Violales

(Cronquist 1988), Malvales (Dahlgren 1989), Violales (Thorne 1992) et Cistaceae (Takhtajan 1997). Des analyses récentes, au niveau moléculaire basées sur des séquences d'ADN, ont permis de classer la famille Cistacée dans l'ordre des Malvales Figure I.A.5 [35].

Tableau I.A.5 Classification botanique de la famille Cistaceae.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Malvales
Famille	Cistacée

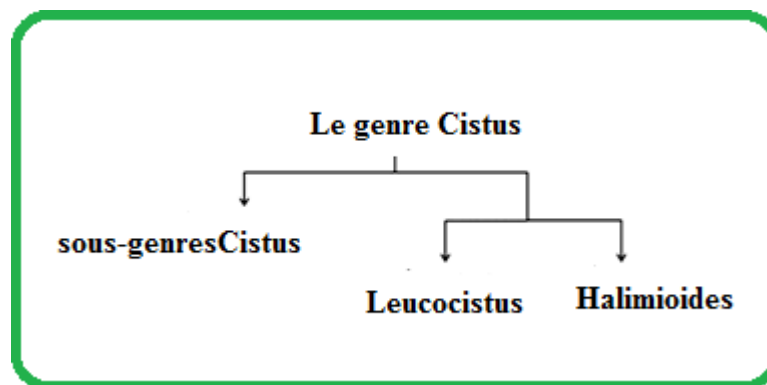


Figure I.A.5 Relation taxonomique entre les différents sous-genres contenus dans le genre *Cistus* de la famille des Cistaceae.

A.3.2 Utilisations traditionnelles

Les plantes de la famille Cistaceae sont constituées de petits arbustes poussant à l'état sauvage en Méditerranée occidentale (Portugal, Espagne, Sud de la France, Italie, Algérie, et Maroc), elles sont généralement employées en médecine traditionnelle pour leurs divers effets thérapeutiques : antimicrobien, analgésique, antiviral, antitumoral, anti-inflammatoire, gastro protecteur, antioxydant et antifongique [38-40].

A.3.3 Présentation du genre *Cistus*

Les plantes du genre *Cistus* sont des plantes sous forme d'arbustes éternels. Elles se développent dans les bords marocains et méditerranéens avec 16 espèces de *Cistus* [41].

Elles ont des feuilles opposées, sans stipule, ovales, oblongues ou lancéolées. Elles sont généralement recouvertes de poils étoilés qui créent des espaces isolants empêchant la transpiration et permettant une adaptation à une relative sécheresse [37].

Les études phytochimiques réalisées sur les plantes de ce genre montrent une grande richesse en métabolites secondaires. Il a été déduit de ces dernières études que les principaux métabolites secondaires de ce genre sont constitués de flavonoïdes, terpènes, et des huiles essentielles [42].

A.4 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, sont des produits naturels qui appartiennent à une vaste famille qui contient près de 8000 composés, leurs structures chimiques commune comportent un noyau benzénique portant un groupement –OH. On peut classer les composés phénoliques selon le nombre de groupement phénols présents.

On distingue quatre types ou classes de composés [43] :

- Type I : représenté par les acides phénoliques comme les acides benzoïques (acide gallique (acide phénoliques) (C₆-C₁ et C₆-C₃).
- Type II : composé par les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆) (acide phénoliques) (C₆-C₁ et C₆-C₃).
- Type III : fondée sur une structure (squelette en C₆-C₃-C₃-C₆) des liganes
- Type IV : les stilbènes (C₆-C₂-C₆) n.

A.4.1 Les acides phénoliques

Il existe deux classes essentielles d'acide phénolique :

- Les dérivés de l'acide benzoïque (Tableau I.A.6, Figure I.A.6)
- Les dérivés de l'acide cinnamique (Tableau I.A.7, Figure I.A.7)

Tableau I.A.6 Les dérivés de l'acide benzoïque

Structure	Molécule
01	Acide benzoïque
02	Acide Salicylique
03	Acide P-hydroxy- benzoïque
04	Acide gallique
05	Acide proto-catéchuique

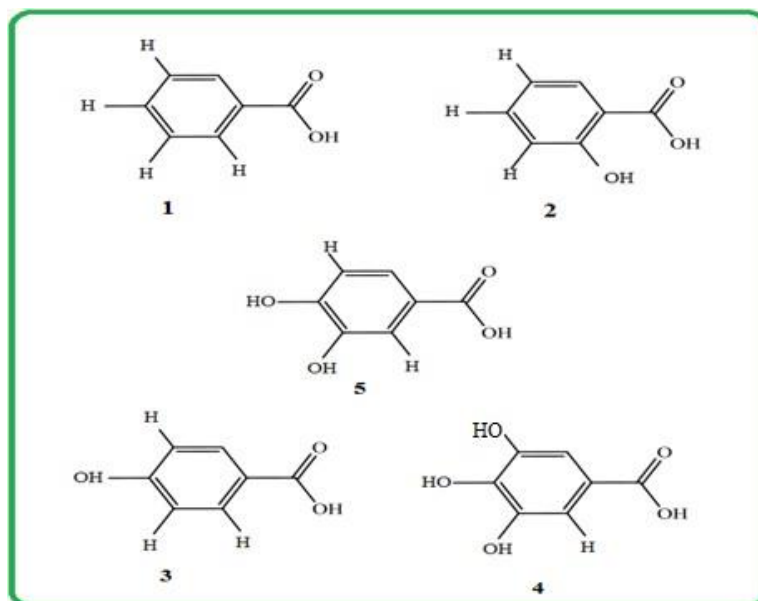


Figure I.A.6 Dérivés de l'acide benzoïque.

Tableau I.A.7 Les dérivés de l'acide cinnamique

Structure	Molécule
01	Acide Cinnamique
02	Acide O-coumarique
03	Acide m-coumarique
04	Acide P-coumarique
05	Acide caféïque

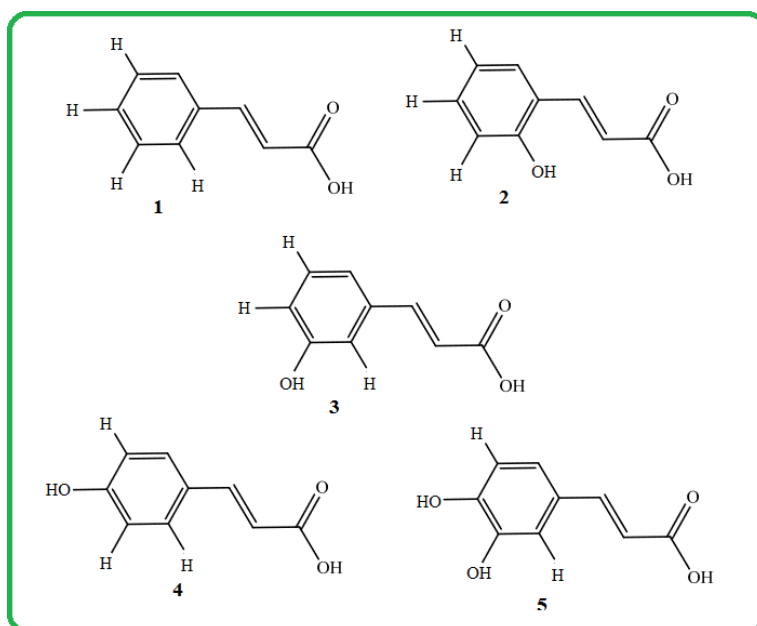


Figure I.A.7 Dérivés d'acide cinnamique

A.4.2 Les acides phénoliques du genre *Cistus*

Le genre *Cistus* est riche en métaboliques secondaires notamment les poly-phénols, l'étude menée par Enrique Barrajon et al. (2011) [44] a révélé l'existence d'une diversité moléculaire du genre. Les dérivés des acides phénoliques obtenus par cette étude sont récapitulés dans le Tableau I.A.8 et la Figure I.A.8

Tableau I.A.8 Les dérivés d'acide phénolique du genre *Cistus* [44].

Espèces / Composés	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Cistus ladanifer</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cistus ladanifer</i> (2)	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cistus salviifolius</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cistus salviifolius</i> (2)	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cistus populifolius</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Cistus laurifolius</i>	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Cistus monspeliensis</i>	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Cistus crispus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cistus incanus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Cistus albidus</i> (1)	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Cistus albidus</i> (2)	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Cistus libanotis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cistus clusii</i>	-	-	-	-	-	+	+	+

Partie I.A Genre *Cistus* et *Marrubium*

- 1 : Acide caffeoyle-quinique ;
- 2 : Acide hydroxy-ferulique hexoside ;
- 3 : Acide 3-p-coumaroyl-quinique ;
- 4 : myrciaphenone B;
- 5 : Acide hydroxy-ferulique rhamnoside ;
- 6 : uralenneoside ;
- 7 : gentisoyle glucoside ;
- 8 : 3,4'-dihydroxypropiofenone-3-β-D-glucoside

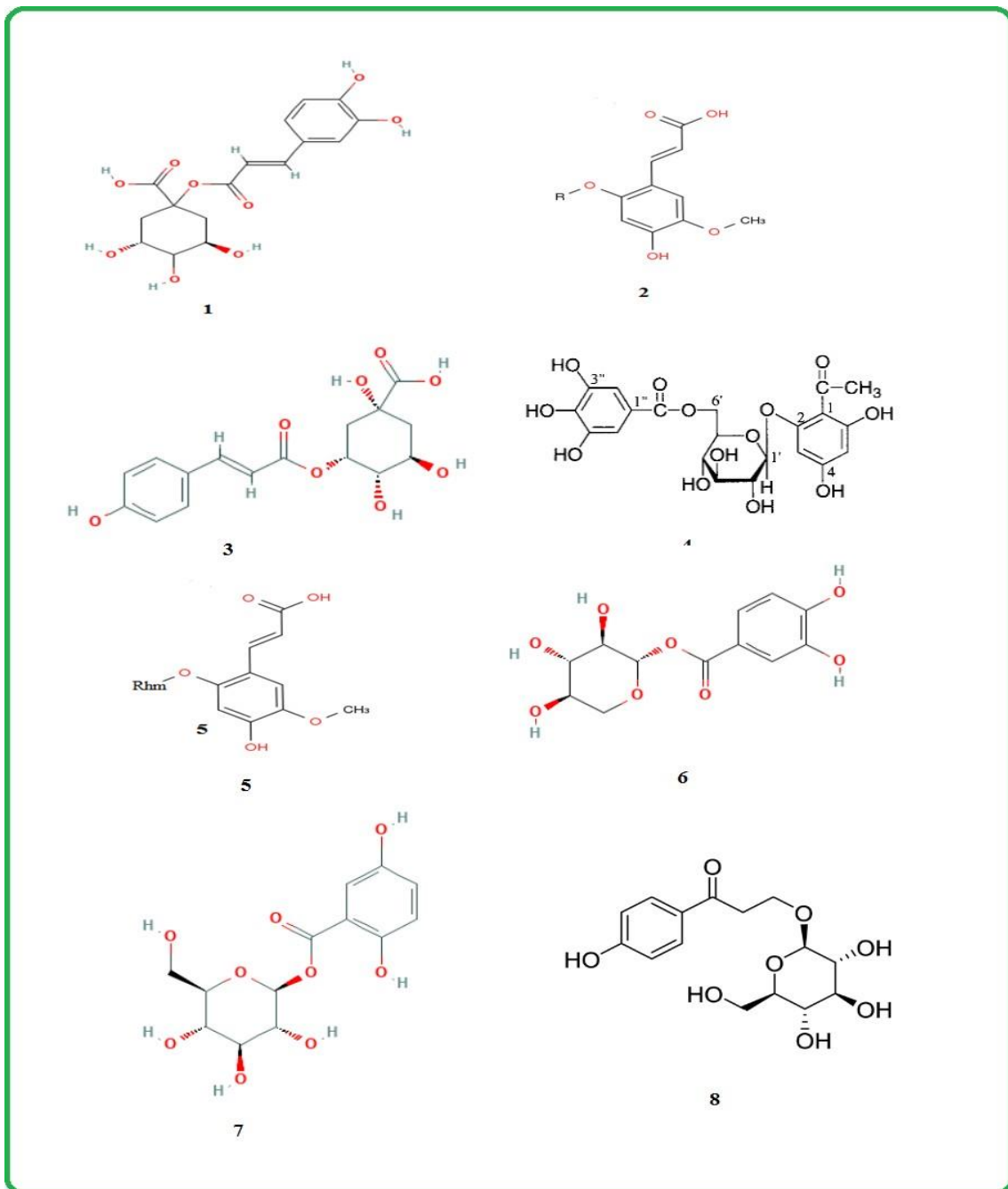


Figure I.A.8 Structure des dérivés d'acide phénolique du genre *Cistus*

Références Partie IA

- [1] B. Kaurinovic, S. Vlaisavljevic, M. Popovic, D. Vastag, and M. Djurendic-Brenesel, “Antioxidant properties of *Marrubium peregrinum* L. (Lamiaceae) essential oil,” *Molecules*, vol. 15, no. 9, pp. 5943–5955, 2010. [DOI:10.3390/molecules15095943](https://doi.org/10.3390/molecules15095943).
- [2] N. Zaarbat, “Détermination structural et évaluation biologique des substances naturelles de deux espèces de la famille des Lamiacées : *Marrubium deserti* de Noé. Et *Phlomis bovei* de Noé,” 2012. Thèse de doctorat, Université Mentouri – Constantine 1.
- [3] A. Adjoudj, “Auto Ecologie et Biologie de la Conservation de *Phlomis crinita* (Lamiaceae) des Monts de Tessala, Algérie Occidentale,” 2019. Thèse de doctorat, Université Djilali Liabes de sidi bel Abbas.
- [4] P. Quezel, S. Santa, “Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales.” Tome 1. Editions du centre national de la recherche scientifique 15, quai Anatole-France - Paris 7.
- [5] M. Bekut, S. Brkić, N. Kladar, G. Dragović, N. Gavarić, and B. Božin, “Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy,” *Pharmacol. Res.*, vol. 133, pp.301-314, 2017. [DOI:10.1016/j.phrs.2017.12.016](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.016).
- [6] K. Carović-Stanko, M. Petek, M. Grdisa, et al., “Medicinal Plants of the Family Lamiaceae as Functional Foods – a Review,” vol. 2016, no. 5, pp. 377–390, 2016. [DOI:10.17221/504/2015-CJFS](https://doi.org/10.17221/504/2015-CJFS).
- [7] D. Rigano, N. A. Arnold, M. Bruno, et al., “Phenolic compounds of *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum* from Lebanon,” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 34, no. 3, pp. 256–258, 2006. [DOI:10.1016/j.bse.2005.10.006](https://doi.org/10.1016/j.bse.2005.10.006).
- [8] D. Ali Boutelis, “Etude phytochimique et activité antimicrobienne , antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L.,” 2014.Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar – Annaba.
- [9] C. Meyre-Silva and V. Cechinel-Filho, “A review on the chemical and pharmacological aspects of genus *Marrubium*,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 16, no. 31, pp. 3503–3518, 2010. [DOI:10.2174/138161210793563392](https://doi.org/10.2174/138161210793563392).
- [10] M. Ahvazi, GR. Balali, Z. Jamzad, and H. Saeidi H “A Taxonomical, Morphological and Pharmacological Review of *Marrubium vulgare* L.,” *J. Med. Plants*,” vol. 17, no. 65, pp. 7–24, 2017.
- [11] A. Tahraoui, J. El-Hilaly, Z. H. Israili, and B. Lyoussi, “Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province),” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 110, no. 1, pp. 105–117, 2007. [DOI:10.1016/j.jep.2006.09.011](https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.011).
- [12] N.Ghedadba, « Contribution à l’étude de l’activité biologique des deux espèces de *Marrubium vulgare* L et *Marrubium deserti* de Noé in vitro et in vivo, »2017-2018.Thèse de doctorat, Université Mustapha Ben-Boulaïd, Batna 2.
- [13] A. Boudjelal, C.Henchiri, M.Sari et al., “Herbalists and wild medicinal plants in M’Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 148, no. 2, pp. 395–402, 2013. [DOI:10.1016/j.jep.2013.03.082](https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.082).

Références Partie IA

- [14] F. Goger, G. Ozek, and M. Tekin, et al., “Phytochemical Profiling and Evaluation of *Marrubium sivasense* Aytaç , Akgül & Ekici for Antioxidant Activity and Inhibition Effects on α -Amylase , Lipoxygenase , Xanthine Oxidase and Tyrosinase Enzymes, J. Turkish chem. Soc.,” vol.6, no. 3, pp. 281 – 292, 2019. [DOI:10.18596/jotcsa.516888](https://doi.org/10.18596/jotcsa.516888).
- [15] R. Alaa, M.M Abd-Alhaseeb, E.S.Habib et al., “Screening of *Marrubium alysson* L . extract for pharmacological activity,” J. Chem. Pharm., vol. 8, no. 4, pp. 283-289, 2016.
- [16] S. S. Essawy, D. M. Abo-elmatty, N. M. Ghazy, J. M. Badr, and O. Sterner, “Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Marrubium alysson* extracts in high cholesterol-fed rabbits,” Saudi Pharm. J., vol. 22, no. 5, pp. 472–482, 2014. [DOI:10.1016/j.jsps.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.004).
- [17] Mohamed, N. H, “Anticancer activity of *Marrubium alysson* L. and its phenolic constituents,” (2010). Book chapter: Drug plants I, 185-193.
- [18] H. Edziri, M.Mastouri, M.Mahjoub et al., “Antiviral activity of leaves extracts of *marrubium alysson* L,” J. Med. Plant Res., vol. 5, no. 3, pp. 360–363, 2011.
- [19] N. V. Kurbatova, R. A. Muzychkina, N. M. Mukhitdinov, and G. N. Parshina, “Comparative phytochemical investigation of the composition and content of biologically active substances in *Marrubium vulgare* and *M. alternidens*,” Chem. Nat. Compd., vol. 39, no. 5, pp. 501–502, 2003. [DOI:10.1023/B:CONC.0000011128.64886.f4](https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000011128.64886.f4).
- [20] Y. Cigremis, A. Kart, M. Karaman, and D. Erdag, “Attenuation of ischemia-reperfusion injury with *Marrubium cordatum* treatment in ovarian torsion-detorsion model in rabbits,” Fertil. Steril., vol. 93, no. 5, pp. 1455–1463, 2010. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2009.03.041](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.041).
- [21] H. Laouera, B.Yabrir, A. Djeridane, M. Yousfi, N. Beldovini and M. Lamamra, “Composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Marrubium deserti*,” Nat. Prod. Commun., vol. 4, no. 8, pp. 1133-1138, 2009. [PMID: 19768999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19768999/).
- [22] S. Petrovića, M. Pavlovića, Z. Maksimovića, et al., “Composition and Antimicrobial Activity of *Marrubium incanum* Desr. (Lamiaceae) Essential Oil,” Nat. Prod. Commun., vol. 4, no. 3, pp. 431-434, 2009. [PMID: 19413128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19413128/).
- [23] M. R. Loizzo, A. M. Saab, R. Tundis, et al., “In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes,” J. Ethnopharmacol., vol. 119, no. 1, pp. 109–116, 2008. [DOI:10.1016/j.jep.2008.06.003](https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.003).
- [24] B. Yabrir, “Essential oil of *Marrubium vulgare*: Chemical Composition and biological activities. a Review,” Nat. Prod. Sci., vol. 25, no. 2, pp. 81-91, 2019.
- [25] B. Yabrir, “Chemical composition and biological activities of some *Marrubium* species essential oil: a review,” Chem. J. Mold., vol. 13, no. 2, pp. 8-23, 2018. [DOI: 10.19261/cjm.2018.506](https://doi.org/10.19261/cjm.2018.506).
- [26] Z. Xue and B. Yang, “Phenylethanoid glycosides: Research advances in their phytochemistry, pharmacological activity and pharmacokinetics,” Molecules, vol. 21, no. 8, 2016. [DOI:10.3390/molecules21080991](https://doi.org/10.3390/molecules21080991).

Références Partie IA

- [27] J. Huang, D. Zhao, C. Cui, J. Hao, Z. Zhang, and L. Guo, “Research Progress and Trends of Phenylethanoid Glycoside Delivery Systems,” *Foods*, vol. 11, no. 5, 2022. [DOI:10.3390/foods11050769](https://doi.org/10.3390/foods11050769).
- [28] L. Wu, M. I. Georgiev, H. Cao, et al., “Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review,” *Med. Res. Rev.*, vol. 40, no. 6, pp. 2605–2649, 2020. [DOI:10.1002/med.21717](https://doi.org/10.1002/med.21717).
- [29] J. Wu, S. Zhanga, Q. Xiao, et al., “Phenylethanoid and aliphatic alcohol glycosides from *Acanthus ilicifolius*,” *Phytochemistry*, vol. 63, no. 4, pp. 491–495, 2003. [DOI:10.1016/S0031-9422\(03\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00100-6).
- [30] S. Sahpaz, N. Garbacki, M. Tits, and F. Bailleul, “Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 79, no. 3, pp. 389–392, 2002. [DOI:10.1016/S0378-8741\(01\)00415-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00415-9).
- [31] A. Karioti, A. Protopappa, N. Megoulasand, H. Skaltsa, “Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 15, pp. 2708–2714, 2007. [DOI:10.1016/j.bmc.2007.01.035](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.035).
- [32] A. Karioti and H. Skaltsa, J. Heilmannb, and O. Sticher “Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*,” *Phytochem*, vol. 64, pp. 655–660, 2003. [DOI:10.1016/S0031-9422\(03\)00242-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00242-5).
- [33] D. Rigano, C. Formisano, A. Basile, “Antibacterial Activity of Flavonoids and Phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum*,” *Phyther. Res.*, vol. 21, pp. 395–397, 2007. [DOI: 10.1002/ptr.2061](https://doi.org/10.1002/ptr.2061).
- [34] T. Hennebelle, S. Sahpaz, A. L. Skaltsounis, and F. Bailleul, “Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*,” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 35, no. 9, pp. 624–626, 2007. [DOI:10.1016/j.bse.2007.02.006](https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.02.006).
- [35] B. Guzmán and P. Vargas, “Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences,” *Org. Divers. Evol.*, vol. 9, no. 2, pp. 83–99, 2009. [DOI:10.1016/j.ode.2009.01.001](https://doi.org/10.1016/j.ode.2009.01.001).
- [36] L. Bedoya, P. Bermejo, and M. Abad, “Anti-Infectious Activity in the Cistaceae Family in the Iberian Peninsula,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 9, no. 5, pp. 519–525, 2009. [DOI:10.2174/138955709788167600](https://doi.org/10.2174/138955709788167600).
- [37] J. Herrera, “Flower variation and breeding systems in the Cistaceae,” *Plant Syst. Evol.*, vol. 179, no. 3–4, pp. 245–256, 1992. [DOI:10.1007/BF00937600](https://doi.org/10.1007/BF00937600).
- [38] A. Stępień, D. Aebisher, and D. Bartusik-Aebisher, “Biological properties of *Cistus* species,” *Eur. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 127–132, 2018. [DOI:10.15584/ejcem.2018.2.8](https://doi.org/10.15584/ejcem.2018.2.8).
- [39] E. Barrajon-Catalán, L. Tomás-Menor, A. Morales-Soto, et al., “Rockroses (*Cistus* sp.) Oils,” 2015. Chapter in Book “Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety”. 1st Edition. [DOI:10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2).

Références Partie IA

- [40] F. M. El-mokasabi, M. F. Al-sanousi, and R. M. El-mabrouk, “Taxonomy and Ethnobotany of Medicinal Plants in Eastern Region of Libya,” *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.*, vol. 12, no. 8, pp. 14–23, 2018. [DOI:10.9790/2402-1208011423](https://doi.org/10.9790/2402-1208011423).
- [41] P. P. Ferrer- Gallego and E. L. Lumbreras, “Nuevos híbridos en el género *Cistus* L. (cistaceae),” *Flora Montiberica.*, vol.52, pp. 60-67,2012.
- [42] D. Papaefthimiou, A. Papanikolaou, V. Falara, S. Givanoudi, S. Kostas, and A. K. Kanellis, “Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes’ biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties,” *Front. Chem.*, vol. 2, 2014. [DOI:10.3389/fchem.2014.00035](https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035).
- [43] F. M. Nesemi, “Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques,” Thèse de doctorat, Université de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752680>.
- [44] E. Barrajon-catalán, S. Fernández-arroyo, C. Roldán, et al., “A Systematic Study of the Polyphenolic Composition of Aqueous Extracts Deriving from Several *Cistus* Genus Species: Evolutionary Relationship,” *Phytochem. Anal.*, vol. 22, no. 4, pp. 303–312, 2011. [DOI:10.1002/pca.1281](https://doi.org/10.1002/pca.1281).

B.1 Métabolomique

La notion « métabolome », ambitionne la mesure quantitative et qualitative des métabolites dans les cellules biologiques (plantes ou tissus). Ces différents composés existent en plusieurs concentrations formant un mélange complexe, en raison des différents inconvénients rencontrés lors des études d'identification, les recherches en métabolomiques font intervenir diverses techniques d'analyses dont les plus utilisées : la chromatographie liquide à haute performance CLHP , CLHP couplée à un détecteur UV, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la spectrométrie de masse (MS) et la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) Figure I.B.1[1].

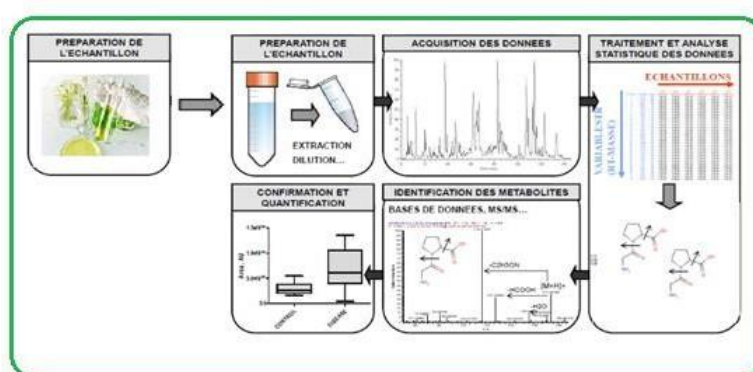


Figure I.B.1 Méthodes analytiques utilisées en métabolomique.

B.1.1 Les techniques d'analyses utilisées en métabolomiques

a) La spectrométrie de masse

La spectroscopie de masse est l'une des méthodes les plus utilisées en métabolomique en raison de sa haute sensibilité. Cette technique permet à la fois la détection, et l'identification des molécules par le biais de l'étude des masses moléculaires et le processus de fragmentation. Elle exige une pré-séparation des échantillons complexes, soit par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS) ou par chromatographie en phase liquide (CLHP-MS, UPLC-MS) [2].

Le principe de la technique est fondé sur la transformation des molécules à l'état naturel en molécules ionisées à l'état gazeux. L'unité de mesure est en fonction du rapport (M/Z) (Figure I.B.2).

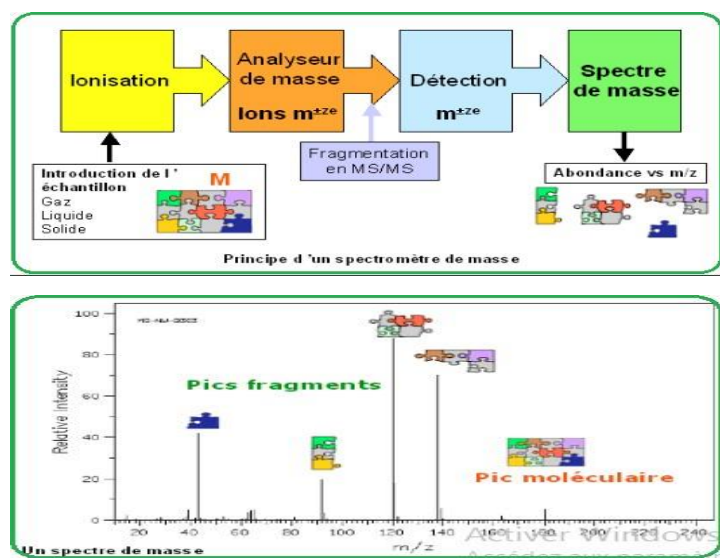


Figure I.B.2 Principe de la spectroscopie de masse

Un appareil spectrophotomètre est composé de trois principaux composants ;

- ✓ Une source d'ionisation
- ✓ Un analyseur qui trie les ions selon leur rapport (M/Z)
- ✓ Un détecteur désigné pour la comptabilisation de l'absorbance des ions
- ✓ Un outil informatique (PC) pour le traitement des données et les signaux.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet à la fois l'identification des composés, la détection des éléments isotopiques ainsi que la quantification (Figure I.B.3) [3].

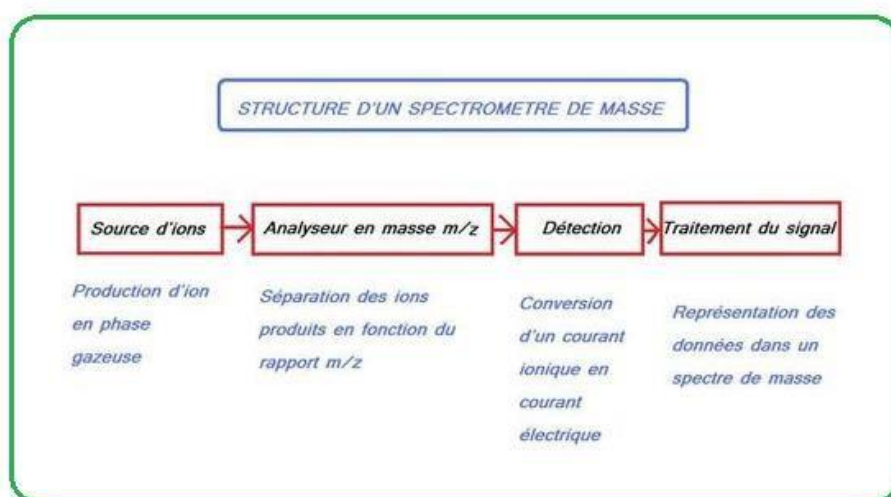


Figure I.B.3 Composants essentiels d'un spectrophotomètre.

Un spectrophotomètre se caractérise par différentes caractéristiques techniques de choix de performances tel que la résolution de l'appareil et la précision de détection.

b) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une très bonne technique analytique, avec une séparation de haute résolution et reproductibilité d'une analyse à l'autre.

L'intérêt majeur de l'analyse par GC/MS en métabolomique est que la technique est dotée à la fois d'une sensibilité, et d'une grande puissance analytique, de plus l'existence des bases de données de plus de 100000 composants [4].

L'analyse des composés de masse moléculaire élevée ou très polaires est limitée en GC-MS à cause des températures qui peuvent atteindre jusqu'à 335°C, donc l'analyse des composés non volatiles par la GC/MS nécessite la dérivation ; cette dernière vise à transformer les composés non volatiles et polaires en dérivés de structure chimique proche mais de polarité réduite. La silylation est la réaction la plus utilisée, particulièrement pour l'analyse métabolomique des composés organiques par GC/MS. Elle offre l'avantage de dériver un large spectre de groupements chimiques (Figure I.B.4) [5].

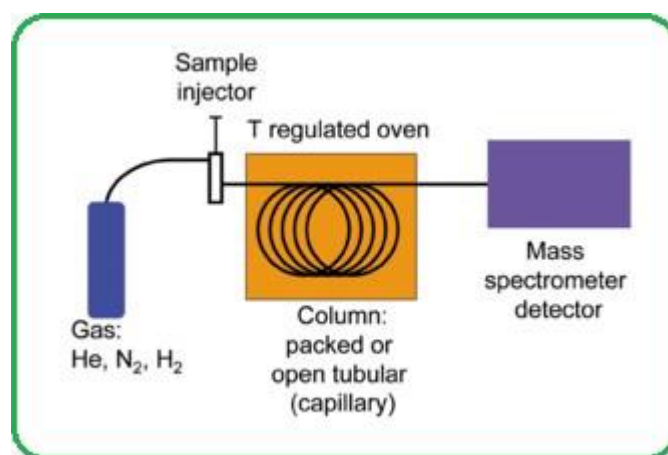


Figure I.B.4 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS)

c) UHPLC-ESI-Q-TOF-MS

Récemment l'équipement UHPLC-ESI-Q-TOF-MS est devenu un outil puissant pour la caractérisation de produits naturels complexes. Plusieurs études ont été décrites dans ce contexte [6-10]. C'est une technique d'analyse qui couple une version améliorée de l'HPLC à un analyseur hybride (ESI-Q-TOF) et un détecteur de masse, elle est utilisée pour l'identification structurale et pour la quantification des composants naturels. Cette technique consiste en premier lieu à séparer les composés de la matrice complexe à travers la colonne

chromatographique, puis l'échantillon est vaporisé sous forme de microgouttelettes qui s'évaporent rapidement et libèrent des molécules ionisées de l'analyte qui est ensuite détecté dans la spectrométrie de masse.

ESI est une méthode d'ionisation douce, sous l'influence d'un champ électrique intense, elle produit des ions en phase gazeuse par l'intermédiaire des ions formés préalablement en solution.

Le mécanisme d'ionisation se déroule en trois étapes (Figure I.B.5) [11] :

- ✓ Première étape est la formation de la particule chargée à partir de molécules chargées en solution.
- ✓ Deuxième étape est la division de la particule chargée en petites particules (explosion coulombienne).
- ✓ Dernière étape est le transfert des ions en phase gazeuse.

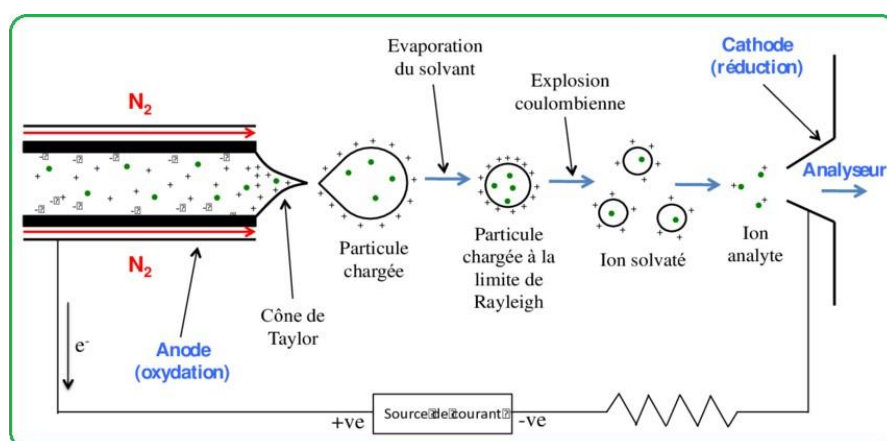


Figure I.B.5 Principe de l'ionisation ESI en mode positif.

L'analyseur Q-TOF (quadripolaire time of flight) est capable de combiner une sensibilité élevée et une précision de masse à la fois pour les ions précurseurs et les ions produits, et permet ainsi de confirmer la composition élémentaire des ions parents et des ions fragments d'une manière rapide et efficace. L'analyseur est composé de deux parties principales : une partie dite zone d'accélération et une deuxième qui est une zone libre de champ. Sous l'effet d'un champ électrique, les ions sont accélérés puis traversent le tube de vol avec une énergie cinétique. Les ions de faible masse, ont une grande vitesse, arrivent plus rapidement au détecteur, que les ions de grande masse (Figure I.B.6) [12].

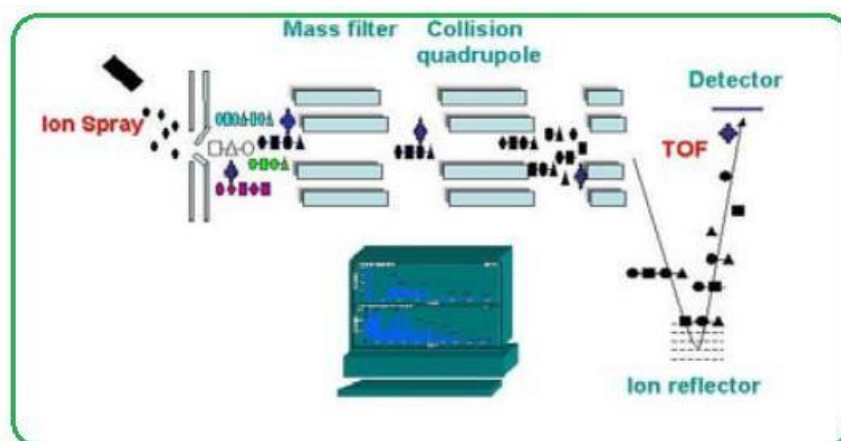


Figure I.B.6 Principe de la technologie Q-Tof [13]

B.1.2 Les banques de données en métabolomique

Généralement, une analyse métabolomique nécessite des équipements de pointes et des banques de données pour interpréter les spectres. Les bases de données les plus utilisées sont :

a) La base de données Golm

La base de données des métabolites **Golm** est une base de données de GC/MS combinant des indices de rétention de GC (temps de rétention par rapport à un ensemble des étalons) et des spectres de masse à électrons (EI). Tous acquis dans des conditions définies en tant que étiquettes spectrales de masse (MST) pour les étalons authentiques et les extraits de plantes (Figure I.B.7) [14].

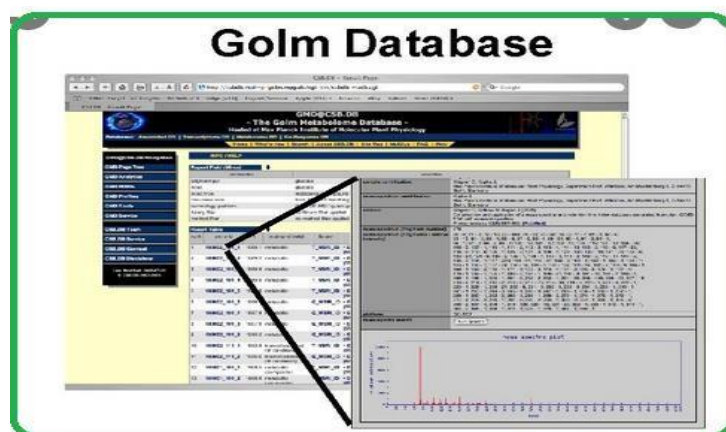


Figure I.B.7 La base de données Golm.

b) La base de données METLIN

METLIN est une base de données complète MS / MS (ou MS2) contenant une large gamme de spectres représentant plus de 12 000 métabolites (plus un grand nombre de spectres théoriques). Tous les spectres ont été acquis dans des conditions standardisées (ionisation électro spray, polarité positive et négative, précision de masse élevée et énergies de collision différentes) sur un spectromètre de masse à temps de vol quadripolaire (QTOF) (Figure I.B.8) [15,16].

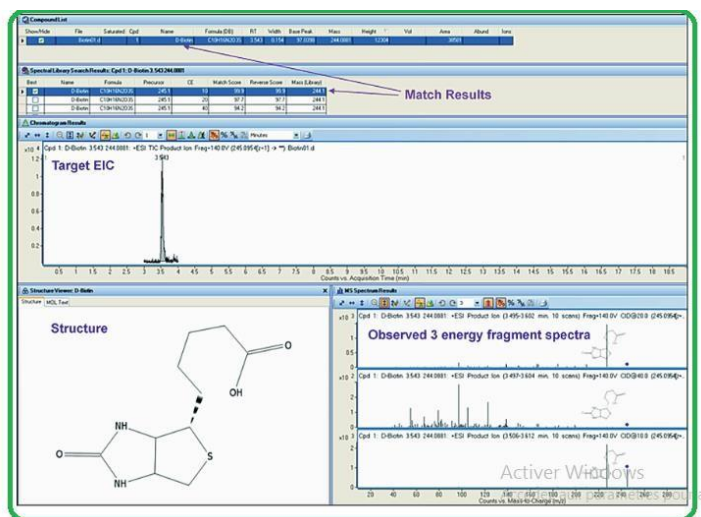


Figure I.B.8. La base de données METLIN.

c) La base de données MassBank

MassBank est une base de données complète avec accès à des données acquises avec diverses plates-formes MS (GC/MS et HPLC-MS) contenant une large gamme de spectres représentant plus de 23 000 spectres pour plus de 12000 métabolites. Elle possède également une interface SOAP (Simple Object Access Portal) permettant de soumettre des requêtes à l'aide d'un logiciel. Tous les enregistrements MassBank contiennent des informations spectrales et certains informations chromatographiques [17] (Figure I.B.9). Le tableau I.B.1 regroupe les bases de données accessibles sur web.



Figure I.B.9 La base de données Massbank.

Tableau I.B.1 Les bases de données accessibles sur web [18].

La base de données	Paramètre Recherché	Composants	Spectre	L'extension Du fichier
BML-NMR http://www.bml-nmr.org	Nom	208	3328 RMN	MSI-XM
BMRB http://www.bmrw.wisc.edu/metabolomics/	Nom, mass, formule, Pick Ms, cst de couplage...	1249	8996	NMR-star, CSV
GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/	Nom, mass, formule,, MS peaks, indice de retention	2220	26587	NIST, JCAMP-DX, TagFinder, Target Search
GNPS http://gnps.ucsd.edu	MS2 mz format, nom,	>5,500	7,593 MS2	mgf
HMDB http://www.hmdb.ca/	Structure, mass, MS peaks, MS2 peaks, GC temps de retention GC NMR déplacement chimique.	41,806	2,240 RMN; 1,220 MS; 8,176 MS	Text NIST

Partie I.B : Métabolomique et activités biologiques

MassBank http://www.massbank.jp/	Structure, nom, mass, formule, fragment, MS(n)	>11,000	40,889 MS et MSn	MassBank
METLIN http://metlin.scripps.edu	Mass, fragment, nom formule, MS2 peaks	240,515	61,872 MS2	Non téléchargeable
MMCD http://mmcd.nmrham.wisc.edu/	nom, structure, NMR déplacement chimique mass,	20,306	5,256 NMR	Text
NAPROC-13 http://c13.usal.es/c13	Nom, famille chimique, formule, mass, publication, 13C déplacement,	20,297	20,297 RMN	Non téléchargeable
NMR ShiftDB http://nmrshiftdb.nmr.uni-koeln.de/	Nom, formule, citation, structure, NMR déplacement chimique Condition expérimental	42,838	50,883 NMR	CML, JCAMP-DX, tabseparated, SQL
ReSpect http://spectra.psc.riken.jp/	Mass, fragment, name, formule, MS(n) spectr	3,710	9,017 MSn	MassBank
SDBS http://sdb.sdb.aist.go.jp	Nom, formule, mass, IR peaks, 13C-NMR	733	466 NMR;	MassBank

B.2. Les Activités Biologiques

Récemment un grand intérêt était orienté vers les études des activités biologiques des extraits des et métabolites secondaires isolés des plantes. Ces dernières années l'attention s'est portée sur les activités : antioxydantes, antimicrobiennes et spécialement sur l'activité anti-covid 19 en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des infections microbiennes ou virales (covid 19) pour trouver des agents antiviraux, antimicrobienne et antioxydante.

Les deux plantes de notre étude, ont été sélectionnées pour tester le pouvoir antioxydant, antimicrobien et anti covid 19.

B.2.1 Activité antioxydante

a) Stress oxydant

Généralement, le stress oxydant se définit comme étant la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres (espèces oxydantes) et leur destruction par les systèmes physiologiques de défense (antioxydants) (Figure I.B.10). [19]

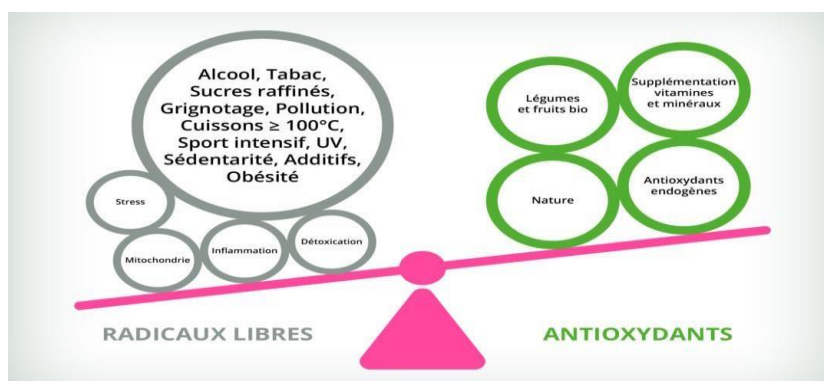


Figure I.B.10 Schéma du stress oxydant

b) Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui ont un électron célibataire (ou non apparié). Ils proviennent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons. Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont l'aptitude à revenir rapidement à un état stable en donnant un électron ou en s'attachant à une autre molécule. Ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants (accepteur ou donneur d'électrons). Cette structure électronique déséquilibrée leur donne une grande réactivité sur les composants organiques et les cellules [20,21].

c) Antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui empêchent ou retardent l'oxydation d'une substance [22]. Ils sont présents sous diverses formes et peuvent contribuer en prévenant la formation des radicaux libres, aussi bien que pour intervenir à leur suppression. On distingue deux classes d'antioxydants (Tableau I.B.2) :

- Systèmes enzymatiques (antioxydants synthétisés par l'organisme)
- Les antioxydants issus des aliments et suppléments alimentaires (vitamines, oligo-éléments).

Tableau I.B.2 Les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants [23]

Antioxydants enzymatiques (Systèmes endogènes)	Antioxydants issus des aliments
Superoxyde dismutase (SOD)	Vitamine C
Catalase (CAT)	Polyphénols
Glutathion peroxydase (GPX)	Vitamine E
Albumine, ferritine	Oligo-éléments
Lipases, protéases, endonucléases	Caroténoïdes

B.2.2 Activité antibactérienne

L'antibiothérapie médicamenteuse parfois devenue inefficace à cause de l'apparition des souches bactériennes résistantes, pour cette raison les recherches sont orientées vers de nouvelles sources de molécules antibactériennes qui possèdent un large spectre thérapeutique par rapport à celui des antibiotiques. À cet effet, les chercheurs se sont intéressés aux plantes médicinales comme source de métabolites à fort pouvoir antimicrobien [24].

a) Antibiotique

La thérapie médicale des infections bactériennes repose essentiellement sur l'administration des antibiotiques. Le terme antibiotique désigne toute molécule d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité sélective sur les bactéries visées.

La majorité des antibiotiques sont d'origine naturelle, le premier antibiotique découvert est la pénicilline à partir du champignon *Penicillium notatum*, qui appartient à la famille des β -lactames. Ils existent d'autres antibiotiques naturels tels que : les tétracyclines, les phénylpropanoïdes, les macrolides et les glycopeptides [25]. Il existe aussi les antibiotiques synthétiques classés en trois familles :

- ✓ Les sulfamides
- ✓ Les quinolones (fluoroquinolones)

- ✓ Les oxazolidinones.

b) Principales classes des métabolites antimicrobiens

Les métabolites secondaires produits par les plantes constituent une source majeure de substances bioactives. L'intérêt scientifique pour ces métabolites s'est accru aujourd'hui avec la recherche de nouveaux agents thérapeutiques d'origine végétale. Les principaux composants ayant une activité antimicrobienne trouvés dans les plantes, les herbes et les épices sont les composés phénoliques, les terpènes, les alcools aliphatiques, les aldéhydes, les cétones, les acides et les isoflavonoïdes [26].

Les constituants non phénoliques tels que l'isothiocyanate d'allyle et l'huile d'ail sont également efficaces contre les bactéries Gram négatif et les champignons [27].

Les huiles essentielles et leurs composés isolés tels que l'eugénol, le carvacrol, le thymol sont connus pour leurs activités inhibitrices des micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) [28,29].

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été concentrées sur la mise en évidence des activités antimicrobiennes des polyphénols et elles ont prouvé l'effet important des flavonoïdes et des acides phénoliques tels que la rutine, l'apigénine, le kaempférol et d'autres molécules sur l'inhibition bactérienne [30,31].

B.2.3 Activité *In silico*

Les techniques de criblage *in silico* sont des méthodes rapides et efficaces guidant les chercheurs sur les molécules les plus actives. Le but majeur des méthodes *in silico* (criblage virtuel « docking ») est d'éliminer les substrats inactifs ou toxiques à partir d'un grand nombre de molécules initiales qui sont maintenues et qui seront estimées expérimentalement [32]. Il existe plusieurs modèles et méthodes de docking tel que : pharmaco-phoriques et QSAR.

B.2.3.1. Modèles pharmacophores

Le concept pharmacophore est l'ensemble des molécules et groupements fonctionnels disposés selon une géométrie spatiale appropriée, assurant l'interaction d'une molécule sur un récepteur et donc capable d'inférer la réponse physiologique. Les interactions moléculaires sont définies comme des points pharmacophoriques : les donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, les groupements cationiques et anioniques réalisant des interactions ioniques, les groupements aromatiques conduisant à des interactions π -stacking et les groupements hydrophobes donnant des interactions hydrophobes Figure I.B.11. [32].

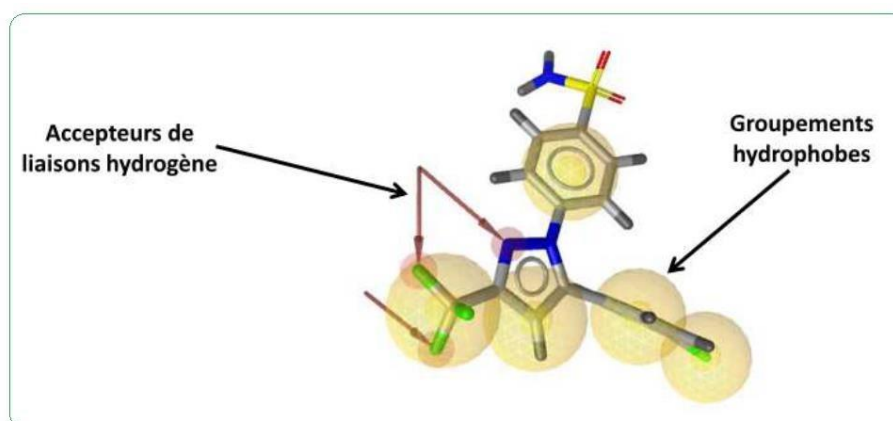


Figure I.B.11 Exemple de pharmacophore procréé avec le logiciel Ligand Scout 4.0 [32]

Ce modèle peut être assuré par deux voies [32,33].

- ✓ L'approche « ligand-based » en superposant des molécules actives et en ôtant les caractéristiques physico-chimiques communes essentielles à leur activité biologique. Cette approche utilise des descripteurs 2D, elle se base essentiellement sur la connectivité des atomes du ligand permettant ainsi de réduire les temps de calculs.
- ✓ L'approche « structure-based » s'appuie sur les données structurales 3D de la protéine seule (approche basée sur le récepteur) ou co-cristallisée avec un ligand (approche basée sur le complexe ligand-récepteur).

B.3.2.2 Modèles QSAR

Le modèle QSAR (Quantitative structure-activity relation ship) est le procédé qui décrit la relation quantitative entre les structures chimiques et leurs propriétés biologiques (activités biologiques). Ces modèles non expérimentaux se basent sur le principe de similitude structurale, c'est-à-dire sur l'hypothèse selon laquelle des molécules structurellement similaires présentent un comportement identique (in vivo), et sont utilisés pour faciliter l'évaluation des propriétés biologiques de ces molécules en étendant les informations existantes [34].

La (R.S.A) terme désigne la relation entre une structure chimique et l'activité pharmacologique pour une série de composés.

Le modèle, est aussi peut être assuré par deux voies [34].

- ✓ Descripteurs 2D (les calculs sont basés sur les données tels que : charges partielles, la nature des liaisons, et la connectivité d'une molécule ou d'une représentation (2D)).

- ✓ Descripteurs 3D représentent des objets en 3D et se distinguent en 2 groupes : ceux qui dépendent seulement de coordonnées internes de la molécule, et ceux qui dépendent de l'orientation absolue du substrat cible. Parmi ces descripteurs, on peut citer :
 - Descripteurs de l'énergie potentielle
 - Descripteurs de formes et de volume
 - Descripteurs du moment dipolaire
 - Champs de potentiel d'interaction moléculaire

Références partie I.B

- [1] A. Piasecka, P. Kachlicki, and M. Stobiecki, “Analytical methods for detection of plant metabolomes changes in response to biotic and abiotic stresses,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 2, 2019. [DOI:10.3390/ijms20020379](https://doi.org/10.3390/ijms20020379).
- [2] K. Mahadeo, “Étude métabolomique et valorisation pharmacologique et biotechnologique d’espèces du genre *Psiadia* endémiques de la Réunion et de l’île Maurice. Thèse de doctorat ; Ecole Doctorale Sciences Technologiques Santé, Université de la reunion : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01950685>, 2018.
- [3] H. Pereira, “Développement de l’approche métabolomique par couplage chromatographie liquide / spectrométrie de masse : application à la nutrition,” Thèse de doctorat ; Université de Blaise Pascal- Clermont-Ferrand, 2012. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00719399>.
- [4] C. Junot, “L’analyse métabolomique par spectrométrie de masse : Un nouvel outil pour la biochimie clinique ?,” *Bio Trib. Mag.*, vol. 34, no. 1, pp. 10–15, 2010. [DOI: 10.1007/s11834-010-0003-y](https://doi.org/10.1007/s11834-010-0003-y).
- [5] F. Orata, “Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis,” *Adv. Gas Chromatogr. - Prog. Agric. Biomed. Ind. Appl.*, 2012. [DOI:10.5772/33098](https://doi.org/10.5772/33098).
- [6] H. Zhu, H. Lin, J. Tan, et al., “UPLC-QTOF/MS-based nontargeted metabolomic analysis of mountain- and garden-cultivated ginseng of different ages in northeast China,” *Molecules*, vol. 24, no. 1, 2019. [DOI:10.3390/molecules24010033](https://doi.org/10.3390/molecules24010033).
- [7] Y. Y. Wang, N. Zhou, Y.-P. Si, et al., “A UPLC-Q-TOF/MS-Based Metabolomics Study on the Effect of *Coraliodiscus flabellatus* (Craib) B. L. Burt Extract on Alzheimer’s Disease,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2021, 2021. [DOI:10.1155/2021/8868690](https://doi.org/10.1155/2021/8868690).
- [8] M. Oh, S. Park, H. Kim, G. J. Choi, and S. H. Kim, “Application of UPLC-QTOF-MS based untargeted metabolomics in identification of metabolites induced in pathogen-infected rice,” *Plants*, vol. 10, no. 2, 2021. [DOI:10.3390/plants10020213](https://doi.org/10.3390/plants10020213).
- [9] F. Wang, L. Chen, S. Chen, H. Chen, and Y. Liu, “Characterization of two closely related citrus cultivars using UPLC-ESI-MS/MS-based widely targeted metabolomics,” *PLoS One*, 2021. [DOI:10.1371/journal.pone.0254759](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254759).
- [10] M. U. Farooq, M. W. Mumtaz., H. Mukhtar. et al., “UHPLC-QTOF-MS/MS based phytochemical characterization and anti-hyperglycemic prospective of hydro-ethanolic leaf extract of *Butea monosperma*,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, 2020. [DOI:10.1038/s41598-020-60076-5](https://doi.org/10.1038/s41598-020-60076-5).
- [11] J. Delecolle, « Approche métabolomique pour une caractérisation plus fine d’extraits de plantes d’intérêts pour la santé humaine ». Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, 2017. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01559676>.
- [12] C. Mesmin “Application de la spectrométrie de masse à l’identification et la quantification de peptides biomarqueurs. Thèse de doctorat. Université pierre et marie curie - PARIS 6, 2012. [DOI:10.13140/2.1.3627.0405](https://doi.org/10.13140/2.1.3627.0405).
- [13] H. Karlsson, *A New Approach to the Identification and Characterization of Proteins in LDL and HDL*. Thèse de doctorat. 2007. Linköping University, [ISBN: 978-91-85715-47-3](https://doi.org/10.1007/978-91-85715-47-3).

Références partie I.B

- [14] J. Kopka, N. Schauer, S. Krueger et al., “GMD@CSB.DB : the Golm Metabolome Database,” *J. Bioinform.*, vol. 21, no. 8, pp. 1635–1638, 2005. [DOI:10.1093/bioinformatics/bti236](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti236).
- [15] C. A. Smith, G. O’Maille, E.J. Want, et al., “METLIN: A metabolite mass spectral database,” *Ther Drug Monit.*, vol. 27, no. 6, pp. 747–751, 2005. [DOI:10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39](https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39).
- [16] C. Guijas J. R. Montenegro-Burke, X. Domingo-Almenara, et al., “METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 5, pp. 3156–3164, 2018. [DOI:10.1021/acs.analchem.7b04424](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04424).
- [17] H. HORAI, M. ARITA, S. KANAYA, et al. “MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences “. *J. Mass. Spectrom.*, vol. 45, no 7, pp. 703-714, 2010. [DOI:10.1002/jms.1777](https://doi.org/10.1002/jms.1777).
- [18] S. R. Johnson and B. M. Lange, “Open-access metabolomics databases for natural product research: Present capabilities and future potential,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, 2015. [DOI:10.3389/fbioe.2015.00022](https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00022).
- [19] J. Haleng, J. Pincemail, J. O. Defraigne, C. Charlier, and J. P. Chapelle, “Le stress oxydant,” *Rev. Med. Liege*, vol. 62, no. 10, pp. 628–638, 2007.
- [20] M. TISSIER, “Contribution à l’étude du stress oxydant chez le chien de cross canin,” Thèse de doctorat. Université Claude-Bernard - Lyon, 2011.
- [21] A. Favier, “Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique,” *Actual. Chim.*, pp. 108–115, 2003.
- [22] T. Desmier, “Les antioxydants de nos jours : définition et applications,” Thèse de doctorat. Université de Limoges, 2016.
- [23] J. O. Carole Pastre, “Intérêt De La Supplémentation En Antioxydants Dans L’alimentation Des Carnivores Domestiques. Thèse de docteur,” Ecole nationale vétérinaire, Toulouse, 2005. https://oatao.univ-toulouse.fr/1341/1/celdran_1341.pdf.
- [24] M. Masoumian and M. Zandi, “Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Extracts against Multidrug Resistant Bacteria,” *Zahedan J. Res. Med. Sci.*, 2017. [DOI:10.5812/zjrms.10080](https://doi.org/10.5812/zjrms.10080).
- [25] S. Ramla, “Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques,” 2017. Thèse de doctorat. Université Lille 2, Ecole Doctorale Biologie Santé. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01858408>.
- [26] M. Takó E. B. Kerekes, C. Zambrano, et al., “Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against Food-Contaminating Microorganisms,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 2, 2020. [DOI:10.3390/antiox9020165](https://doi.org/10.3390/antiox9020165).
- [27] B. K. Tiwari, V. P. Valdramidis, C. P. O’Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke, and P. J. Cullen, “Application of natural antimicrobials for food preservation,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 14, pp. 5987–6000, 2009. [DOI:10.1021/jf900668n](https://doi.org/10.1021/jf900668n).

- [28] J. Michiels, J. Missotten, D. Fremaut, S. De Smet, and N. Dierick, “In vitro dose- response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora,” *Livest. Sci.*, vol. 109, no.1–3, pp. 157–160, 2007. [DOI:10.1016/j.livsci.2007.01.132](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.132).
- [29] Y. El Atki I. Aouam, F. El kamari, et al., “Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria,” *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 306–309, 2019.
- [30] N. Kumar and N. Goel, “Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications,” *Biotechnol. Reports*, vol. 24, 2019. [DOI:10.1016/j.btre.2019.e00370](https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370).
- [31] I. Górniak, R. Bartoszewski, and J. Króliczewski, “Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids,” *Phytochem Rev.*, vol. 18, no. 1, pp. 241-272, 2019. [DOI:10.1007/s11101-018-9591-z](https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z).
- [32] A. Rayar, “In silico drug design et chimie médicinale : développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2,” 2017. Thèse de doctorat. École doctorale sciences des métiers de l’ingénieur (cnam). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01661380>.
- [33] S. Y. Yang, “Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: Challenges and recent advances,” *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 11–12, pp. 444–450, 2010. [DOI:10.1016/j.drudis.2010.03.013](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.03.013).
- [34] W.Hamzi, “ Etude expérimentale et in-silico de l’activité biologique de certains dérivés de la molécule du Camphre et de son activité antivirale,” Université des Sciences et de la Technologie d’Oran-Mohamed Boudiaf, 2019-2020.

C.1. Exsudats

Les exsudats sont des substances provenant des sécrétions superficielles de certaines plantes, elles sont composées d'un mélange complexe de composants tel que les terpènes, les phénols et autres. Certains extraits d'exsudats ont été connus et utilisés pour leurs usages thérapeutiques, spécialement pour leurs effets antiseptiques et anti-inflammatoires [1]. Il existe différents types d'exsudats de plantes, parmi ces derniers on peut citer :

- ✓ Gommages
- ✓ Latex
- ✓ Exsudats résineux

Dans notre présente étude on s'intéresse au type des exsudats résineux.

C.1.1 Exsudats résineux

Un nombre important des végétaux produit des substances résineuses avec un aspect d'une colle, ils sont des mélanges complexes liposolubles de composés volatils et non volatils (terpéniques et phénoliques) qui sont synthétisés et sécrétés dans des structures spécialisées et localisées dans la surface des feuilles et d'autres organes de plantes [1]. On distingue deux sous-classes des exsudats résineux : les résines terpéniques et phénoliques.

a) Exsudats terpéniques

Les exsudats terpéniques sont des matériaux amorphes solides ou semi-solides, généralement composés d'un mélange complexe de composés organiques appelés terpènes. Ils sont insolubles dans l'eau mais solubles dans certains solvants organiques. Ces résines sont particulièrement abondantes dans certaines familles de Burseraceae, Dipterocarpaceae, Leguminosae (principalement Caesalpinioideae), Styracaceae et deux familles de conifères (Araucariaceae (Agathis) et Pinaceae), chacune d'elle a un genre producteur prédominant de résine [2,3].

b) Exsudats phénoliques

Les exsudats résineux phénoliques ou balsamiques, appelés aussi baumes, sont caractérisés par la présence de molécules avec un noyau benzénique, ce dernier lié généralement à un groupement hydroxyle ou lié à des fonctions éther ou ester ou hétéroside (Figure I.C.1). Les principales catégories des résines balsamiques connues sont [4] :

- ✓ Benjoin du Siam (*Styrax tonkinensis*)
- ✓ Benjoin de Sumatra (*Styrax benzoin* et/ou *Styrax paralleloneurum*).

L'appellation styrax vient du mot latin styrax qui signifie résine odorante. Le styrax existe sous forme liquide et solide (storax-benjoin), cette dernière forme est la plus abondante [4].

Divers métabolites ont été isolés des résines phénoliques [1], parmi lesquelles on peut citer :

- ✓ Benzoate de coniféryle (1)
- ✓ Benzoate de p-coumaryle (2)
- ✓ Cinnamate de cinnamyle (3)
- ✓ Cinnamate de benzyle (4)
- ✓ Benzoate de benzyle (5)

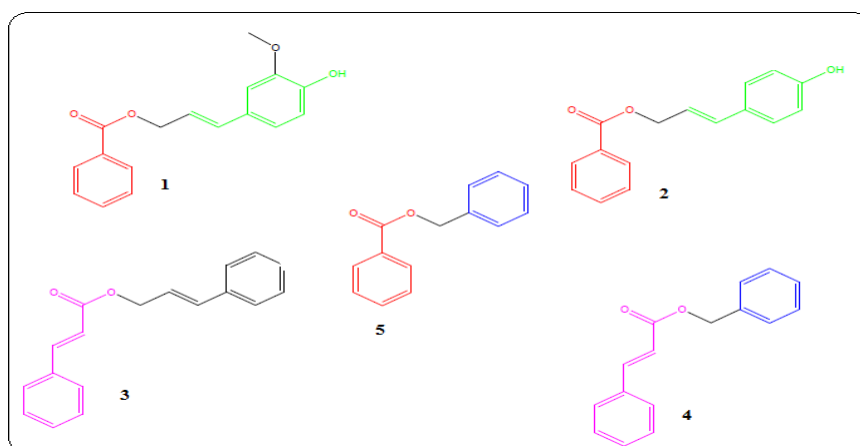


Figure I.C.1. Principaux composants phénoliques des exsudats [1].

C.1.2 Les acides phénoliques des exsudats des plantes Cistacées

Différents métabolites ont été identifiés dans les résines des plantes de la famille Cistaceae parmi ces métabolites, les plus rencontrés, on trouve les acides phénoliques et les flavonoïdes.

L'acide ferulique, l'acide cinnamique, l'acide 4-hydroxy-benzoïque, l'acide hydroxy-cinnamique, l'acide oxalique, l'acide p-anisique et l'acide 3-hydroxy-butyrique, ont été identifiés à partir des résines de *C. ladanifer* [5].

L'étude phytochimique effectuée à partir de la résine *C. ladanifer* a aussi révélé la présence de kaempférol-3-(O) méthyle, kaempférol-3,7-di(O)méthyle et apigénine-4'-(O) méthyle [6].

C.1.3 Techniques chromatographiques analytiques des résines végétales

a) GC / MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS est l'une des techniques performantes d'analyse des mélanges complexes. Elle a été utilisée par plusieurs chercheurs pour analyser certaines résines et exsudats [7-9]. La contrainte de cette

Partie I.C : Exsudats et Huiles essentielles

technique est la thermo-stabilité des composés à cause des températures expérimentales très élevées qui dépassent des fois les 300 C° contrairement à l'HPLC. L'analyse par GC/MS nécessite une préparation préalable adéquate de l'échantillon (la dérivatisation chimique) ; il s'agit d'une réaction chimique qui vise à transformer les composés non volatiles et polaires en dérivés de structure chimique proche mais de polarité réduite et volatile.

b) HPLC et LC/MS

La complexité de la composition chimique des résines naturelles, ainsi que leur variabilité due aux divers critères tels que l'espèce botanique et l'origine géographique. Cette diversité rend leur identification délicate. Plusieurs chercheurs ont introduit de nouvelles techniques d'analyse pour l'identification des profils chimiques des résines végétales. Plusieurs auteurs ont cité l'utilisation des techniques : HPLC, LC/MS, et MALDI MS pour l'identification de la composition chimique des résines [10-12]. Tableau I.C.1 résume les différentes méthodes d'extraction ainsi que les techniques d'analyse des résines végétales.

Tableau I.C.1. Différentes méthodes d'extraction et techniques d'analyse des résines végétales [10]

Espèces	Méthodes d'extraction	Techniques analytiques
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SPE-C18	LC/MS
<i>Medicago sativa</i>	Méthanol/ eau (3 :1 V/V)	GC/MS
<i>Flaveria bidentis</i>	Dichloromethane	GC/MS
<i>Brassica napus</i>	Eau ultra pure	LC/MS
<i>Quercus ilex</i>	Méthanol/eau (80/20)	LC/MS
<i>Grassland</i>	Méthanol	GC/MS
<i>Phragmites australis</i>	SPE(poly-divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)	GC/MS
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Eau ultra pure	LC/MS
<i>Tagetes and Rudbeckia spp.</i>	acétonitrile/Eau (65:35, v:v).	HPLC-UV
<i>Quercus petraea, Quercus robur</i>	Dichloromethane ,Méthanol	GC/MS

C.2 Huiles essentielles

Les plantes aromatiques produisent naturellement des essences volatiles (huiles essentielles) actives permettant de se protéger des insectes, de maladies ou d'attaques extérieures [13].

Les huiles essentielles sont des produits naturels composés de molécules volatiles et odorantes synthétisées par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires. Elles possèdent des propriétés : antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antiprolifératives [14].

a) L'aromathérapie

L'aromathérapie est l'usage thérapeutique des extraits de plantes aromatiques. Ce terme parvient du mot latin « aroma » indiquant odeur et du mot grec « therapeia » désignant traitement. Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes actifs odorants (HE) [15].

b) Huile essentielle Chémotypée H.E.C.T.

H-uile **E**-ssentielle **C**-hemo **T**-ypée (HECT) désigne une (race chimique) qui est une classification chimique botanique et biologique de la molécule majoritaire présente dans une huile essentielle (le chémotype est l'empreinte de l'HE) [16].

La notion de chémotype permet de distinguer deux ou plusieurs huiles essentielles de composition chimique différente produites à partir de plantes de la même espèce. Ainsi, la différence entre le thym à thymol et le thym à linalol (issus de *Thymus vulgaris* L.) n'est pas la même que celle entre la lavande fine et la lavande aspic (*Lavandula angustifolia* Mill. et *Lavandula latifolia* Medik.).

C.2.1 Composition chimique

Les huiles essentielles contiennent plusieurs constituants chimiques qui leur confèrent des propriétés thérapeutiques. On distingue trois grandes classes de composés :

- Groupe des terpénoïdes
- Groupe des aromatiques (phénylpropanes)
- Groupe des composés divers

a) Terpènes

Les huiles essentielles contiennent majoritairement des terpènes volatils issus de la condensation d'unités isopréniques. Ce sont des polymères de l'isoprène de formule brute $(C_5H_8)_n$ [17].

La classification des terpènes se fait selon le nombre d'unités associées (condensées), on distingue :

- Les monoterpènes (C₁₀)
- Les sesquiterpènes (C₁₅)
- Les diterpènes (C₂₀)

Généralement, les HE renferment particulièrement les mono et les sesquiterpènes et parfois fois les diterpènes. La Figure I.C.2 représente des structures de monoterpènes et de sesquiterpènes

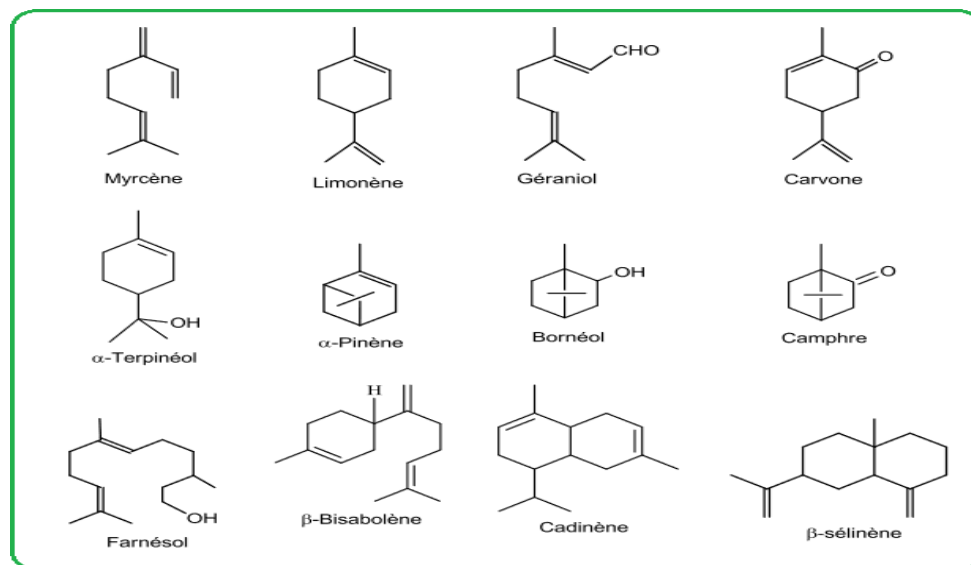


Figure I.C.2 Structures de mono-terpènes et de sesquiterpènes

b) Composés aromatiques

Cette classe de composés est moins fréquente dans les HE que les monoterpènes et les sesquiterpènes. Citons l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique, qui existent dans l'HE de la cannelle, l'eugénol (dans l'HE de girofle), l'anéthole et l'aldéhyde anisique (dans l'HE de badiane, d'anis et de fenouil), ainsi que le safrole se trouve dans l'HE de sassafras.

Les lactones, dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines sont issues des HE obtenues par l'entraînement à la vapeur d'eau (Figure I.C.3) [17].

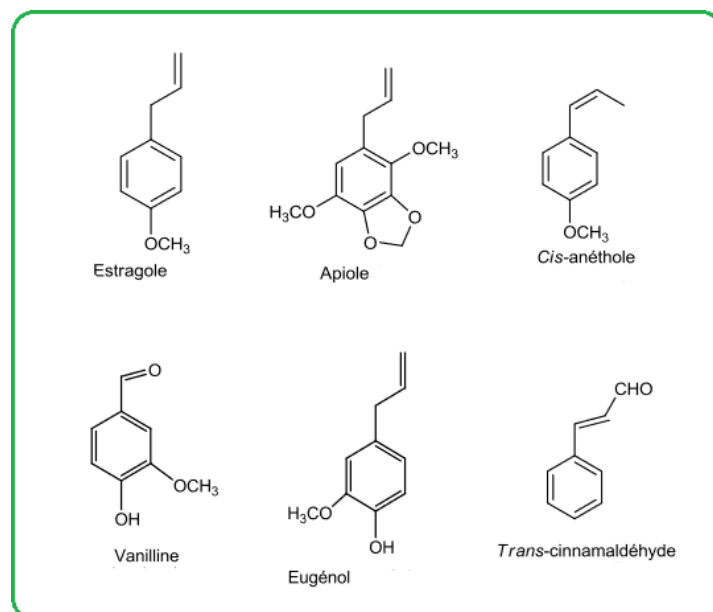


Figure I.C.3. Structures des composés dérivés du phénylpropane.

c) Composés d'origine variée

A côté des composés terpéniques et aromatiques, il existe d'autres composés variés. Généralement, ce type de composés ont de faibles masses moléculaires [18]. Ce sont des hydrocarbures aliphatiques de structure linéaire ou ramifiée portant des fonctions : aldéhydes, cétones et acides, citons:

- L'heptane et la paraffine (l'essence de camomille)
- Aldéhydes comme l'octanal et le décanal des Citrus
- Esters acycliques (acétate de butyle contenu dans les pommes, et acétate d'isoamyle contenus dans les bananes)

C.2.2 Techniques d'extraction des huiles essentielles

L'obtention d'une HE de haute qualité nécessite une méthode d'extraction délicate de point de vue rendement, temps d'extraction et qualité de produits obtenus. Pour cette raison le choix de la méthode d'extraction est très important pour avoir un produit de bonne qualité.

Il existe différentes méthodes d'extraction des HE telles que : l'hydro-distillation, l'entraînement à la vapeur d'eau, extraction par CO₂ supercritiques et d'autres procédés d'extraction. La Figure I.C.4 représente les différentes techniques d'extraction des HE.

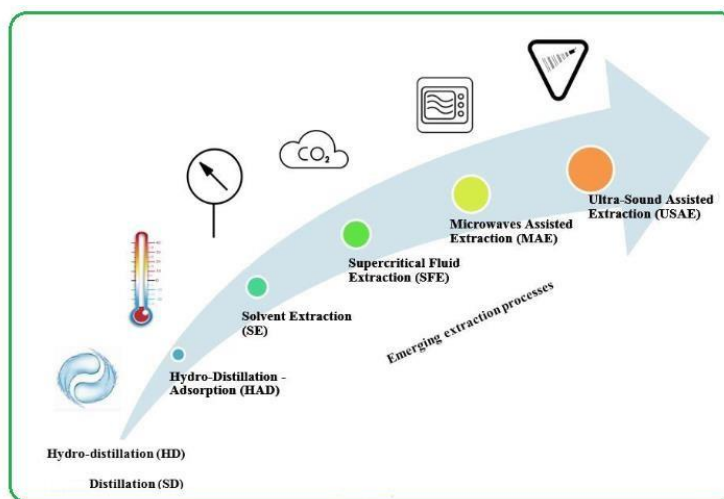


Figure I.C.4. Techniques d'extraction des HE [19]

C.2.2.1 Hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'une des méthodes fréquemment utilisées pour extraire les HE. Dans cette méthode, le matériel végétal est soumis à l'ébullition dans un ballon à une pression atmosphérique, la température d'ébullition permet l'éclatement des cellules et la libération des HE. Cette méthode présente des inconvénients en raison de la température élevée qui conduit à la dégradation de certaines molécules lors de l'extraction (Figure I.C.5) [20].

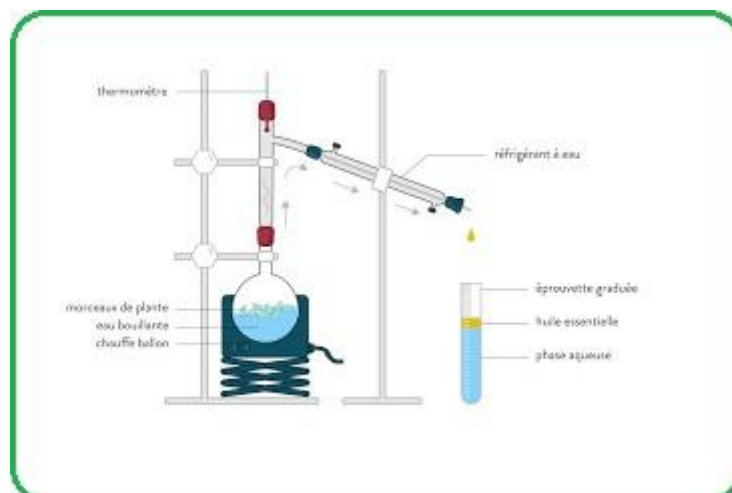


Figure I.C.5 Procédé d'extraction des HE par hydrodistillation

C.2.2.2 Entraînement à la vapeur d'eau

C'est une méthode officielle d'extraction des HE, elle consiste à exposer la plante à un courant de vapeur d'eau. Durant le contact entre la plante et la vapeur d'eau, les cellules du

matériel végétale libèrent l'HE. Cette dernière est vaporisée puis condensée pour former un mélange eau/HE qui se sépare par décantation.

L'avantage majeur de cette méthode, par rapport à l'hydrodistillation, est l'absence de contact direct eau/plantes, elle limite aussi les phénomènes d'hydrolyse de l'huile essentielle (Figure I.C.6) [20].

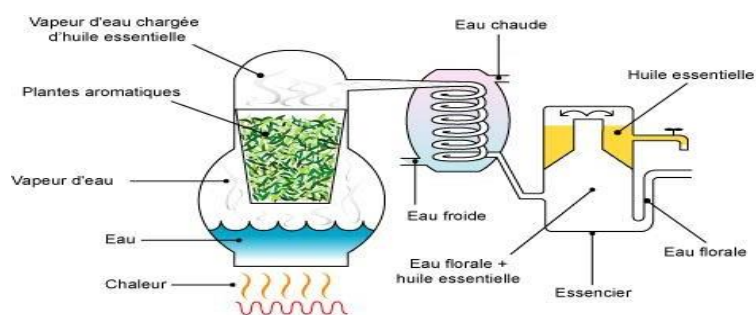


Figure I.C.6. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C.2.2.3 Extraction par micro-onde

Dans ce procédé le chauffage de la plante se fait sélectivement par rayonnement micro-ondes dans un dispositif composé d'une enceinte dont la pression est réduite d'une manière séquentielle, l'HE est entraînée dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau de la plante. Cette méthode est très efficace de point de vue rapidité et consommation énergétique. L'HE obtenue par cette méthode est de haute qualité par rapport à celle de l'hydrodistillation traditionnelle (Figure I.C.7) [21].

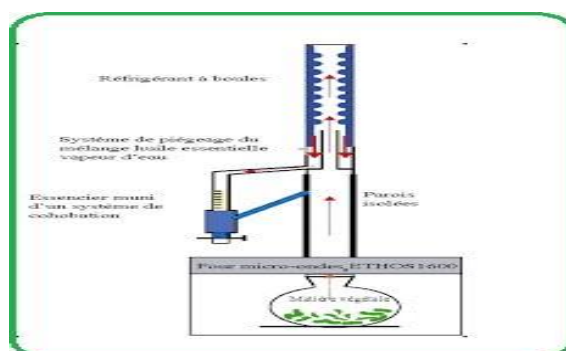


Figure I.C.7 Extraction par micro-onde

C.2.2.4 Extraction par ultrason

L'extraction assistée par les ondes ultrasons est une méthode efficace, rapide et peu consommatrice d'énergie et de solvants. En effet, la plante est immergée dans le solvant

d'extraction et elle est soumise à l'action des ultrasons. Un effet mécanique des vibrations ultrasons sur la plante induit une bonne pénétration du solvant dans les particules du matériel végétal, ce qui rend le transfert de masse maximum et améliore le rendement d'extraction. (Figure I.C.8) [22,23].

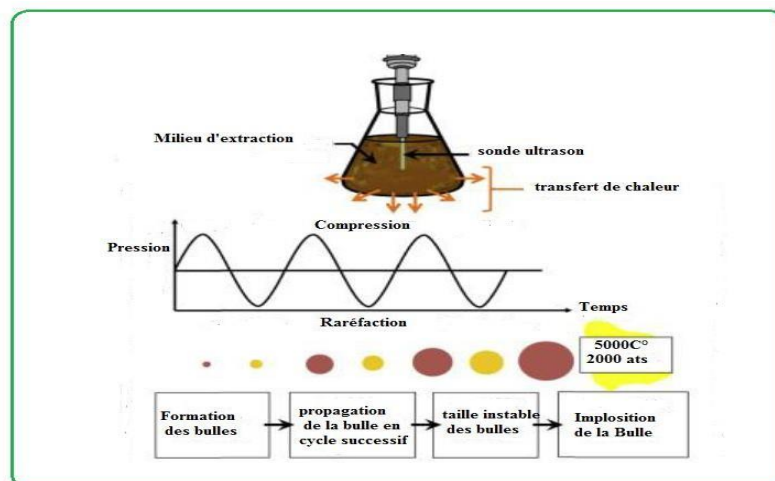


Figure I.C.8. Extraction par ultrasons

C.2.2.5 Extraction par CO₂ supercritique

La technique d'extraction par solvant supercritique, appelée aussi l'extraction verte, est l'une des méthodes les plus récentes.

Le principe de la méthode repose sur l'utilisation des solvants dans un état supercritique sous des conditions particulières de pressions et de températures. Les solvants se trouvent dans un état intermédiaire entre l'état gazeux et l'état liquide (état supercritique). Ils présentent des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvation accru (Figure I.C.9). Cette méthode d'extraction, est une technique dite « verte », présente l'avantage d'être bien plus rapide que les méthodes traditionnelles. Les compositions chimiques des HE obtenues peuvent présenter des différences, qualitatives et quantitatives, avec celles issues de l'hydrodistillation [24].

Le CO₂ est utilisé dans l'extraction pour les raisons suivantes :

- Non toxique, non inflammable et sans odeur
- L'obtention des extraits aromatiques 100% naturels et purs.
- Sa disponibilité avec une grande pureté.
- Le risque de dégradation des molécules fragiles est minime, à cause de la température adéquate (32 C°).

L'inconvénient majeur de cette technique est son aspect économique, car ce procédé est considéré comme un investissement coûteux, en plus l'exigence d'une grande consommation énergétique [20].

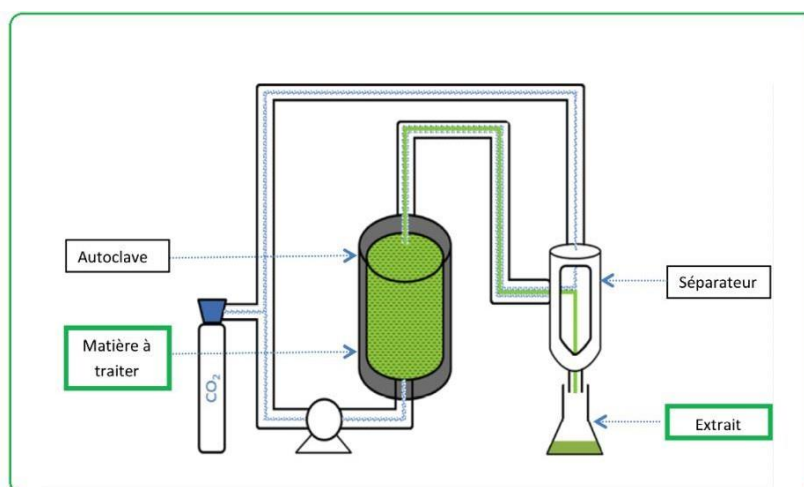


Figure I.C.9. Procédé d'extraction des HE par CO₂ supercritique

C.2.3 Les huiles essentielles du genre *Cistus*

Diverses études relatives à la composition chimique des huiles essentielles des plantes du genre *Cistus*, ont été décrites. Ces travaux ont mis en évidence leur grande variabilité chimique [25-29].

L'étude menée par Loizzo et al (2013) [26] a permis d'identifier la composition chimique des espèces : *Cistus creticus*, *Cistus salvifolius*, *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* et *Cistus villosus*. L'huile essentielle de *C. creticus* a montré que cette espèce renferme une grande quantité de norisoprénoïdes (24,4%) dont le vitispirane I représente le composant le plus abondant. Son profil chimique paraît similaire à celui de l'espèce *C. monspeliensis* qui est riche en diterpènes (20,8%), avec la présence de l'oxyde de manoyl et le E-Phytol comme produits majoritaires.

Deux autres investigations chimiques sur les huiles essentielles de *C. monspeliensis*, originaire du Maroc, ont montré une abondance de l'oxyde 13-épi-épi-manoyl, 6, 10, 14-triméthylpentadécane-2-one et le 13-épi-manool [27], tandis que Viuda-Martos et al. (2011) a pu identifier le 1,8-cinéol, l'acétate de bornyl et l' α -pinène [28].

Une étude plus récente menée par El Karkouri et al (2021) a montré une prédominance du viridiflorole (17,64%), pinocarveole (11,02%), acétate de bornyl (9,38%), et ledol (8,85%) dans l'espèce *C. ladanifer* originaire du Maroc [29].

Partie I.C : Exsudats et Huiles essentielles

Les principaux composants des huiles essentielles de ces espèces sont résumés dans le tableau I.C.2.

Tableau I.C.2 Composés terpéniques des HE des différentes espèces des cistes [25]

Espèces	Composants majoritaires
<i>Cistus ladanifer</i>	α -Pinène, viridiflorol, triméthyl cyclohexanone, bornéol camphène
<i>Cistus incanus</i>	Manoyl oxyde, viridiflorol, carvacrol, cadinène
<i>Cistus albidus</i>	α -Zingiberene, α -curcumène, α -cadinol, α -bisabolol
<i>Cistus salviifolius</i>	Camphr, viridiflorol, longibornéol, phylloclad-ene, abietatriène, cis-ferruginol
<i>Cistus monspeliensis</i>	L' oxyde de Manoyl, bisabolol, 1,8-cinéole, bornyl acetate, α -pinène
<i>Cistus laurifolius</i>	Bornéol and nonacosane
<i>Cistus libanotis</i>	Camphène, α -pinène, β -pinène, sabinène, γ -terpinène, bornyl acetate, terpineol, borneol
<i>Cistus parviflorus</i>	Carvacrol, caryophyllène oxyde, abietatriene, 4-epi-dehydroabietol, dehydro abietol, cis-ferruginol, 8- α -13- oxy-14-ene-epilabdane, oxyde demanoyl

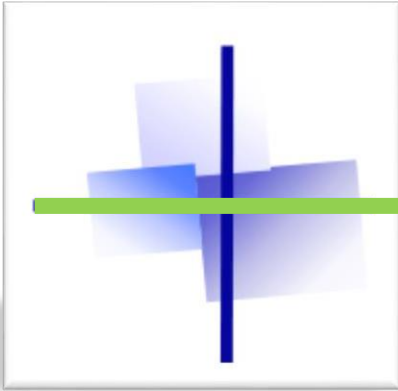
L'étude de Benali et al. (2020), qui a analysé le profil chimique de l'HE de *C. ladaniferus*, a démontré que le Viridiflorol est le composant le plus abondant (28.82%) des 24 composés séparés et identifiés de l'HE de *C. ladaniferus* [30].

Mediavilla (2021) et ses collaborateurs ont étudié l'influence du stockage des HE de *C.ladanifer* sur la qualité de celles-ci. Ils ont trouvé que le profil chimique est influencé par la durée du stockage qui fait diminuer le pourcentage des composés monoterpéniques et augmenter celle des sesquiterpènes oxygénés, surtout lorsque la biomasse est stockée pendant 100 à 120 jours [31].

- [1] A. M. E. Ndinga, “Inventaire et analyse chimique des exsudats des plantes d’utilisation courante au Congo-Brazzaville,” 2016. Thèse de doctorat. Université paris-sud. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01269459>.
- [2] J. Bruneton, 2015. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Ed. 5, Lavoisier, Paris. ISBN:978-2-7430-2165-8. https://complements.lavoisier.net/9782743021658_pharmacognosie-phytochimie-plantes-medicinales-5e-ed_Sommaire.pdf.
- [3] I. C. L. Licá, A. M. dos S. Soares, L. S. S. de Mesquita, and S. Malik, “Biological properties and pharmacological potential of plant exudates,” *Food Res. Int.*, vol. 105, pp. 1039–1053, 2018. DOI:10.1016/j.foodres.2017.11.051.
- [4] M. Hovaneissian, P. Archier, C. Mathe, and C. Vieillescazes, “Contribution de la chimie analytique à l’étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin,” *Comptes Rendus Chim.*, vol. 9, no. 9, pp. 1192–1202, 2006. DOI:10.1016/j.crci.2005.12.010.
- [5] N. Chaves, T. Sosa, J. C. Al, and J. C. Escudero, “Identification and effects of interaction phytotoxic compounds from exudate of cistus ladanifer leaves,” vol. 27, no. 3, pp. 611–621, 2001. DOI:10.1023/a:1010336921853.
- [6] J. C. Alías, T. Sosa, C. Valares, J. C. Escudero, and N. Chaves, “Seasonal variation of cistus ladanifer L. Diterpenes,” *Plants*, vol. 1, no. 1, pp. 6–15, 2012. doi:10.3390/plants1010006.
- [7] K. Suzuki, K. Okazaki, K. Tawaraya, M. Osaki, and T. Shinano, “Gas chromatography-mass spectrometry associated global analysis of rice root exudates under aseptical conditions,” *Soil Sci. Plant Nutr.*, vol. 55, no. 4, pp. 505–513, 2009. DOI:10.1111/j.1747-0765.2009.00390.x.
- [8] Q. Luo, S. Wang, L. N. Sun, and H. Wang, “Metabolic profiling of root exudates from two ecotypes of *Sedum alfredii* treated with Pb based on GC-MS,” *Sci. Rep.*, vol. 7, 2017. DOI:10.1038/srep39878.
- [9] J. Erickson, D. Schott, T. Reverri, W. Muhsin, and T. Rutledge, “GC-MS analysis of hydrophobic root exudates of sorghum and implications on the parasitic plant *Striga asiatica*,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 5537–5542, 2001. DOI:10.1021/jf0111099.
- [10] M. Escolà Casas and V. Matamoros, “Analytical challenges and solutions for performing metabolomic analysis of root exudates,” *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 31, 2021. DOI:10.1016/j.teac.2021.e00130.
- [11] A. Gargallo-Garriga, C. Preece, J. Sardans, M. Oravec, O. Urban, and J. Peñuelas, “Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery,” *Sci. Rep.*, vol. 8, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-30150-0.
- [12] P. Dundek L. Holík, T. Rohlík, L. Hromádka, V. Vranová, K. Rejšek, P. Formánek, “Methods of plant root exudates analysis: A review,” *Acta Univ. Agric. Silv. Mendelianae Brun.*, vol. 59, no. 3, pp. 241–246, 2011. DOI:10.11118/actaun201159030241.
- [13] F. Mayer, “Utilisation des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite,” 2012. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734464>.

- [14] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, and N. Dakka, "Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action," *Phytothérapie*, vol. 16, no. 5, pp. 254–267, 2018. [DOI:10.3166/s10298-016-1058-z](https://doi.org/10.3166/s10298-016-1058-z).
- [15] J. M. Lardry and V. Haberkorn, "L'aromathérapie et les huiles essentielles," *Kinesither Rev.*, vol. 7, no. 61, pp. 14–17, 2007. [DOI:10.1016/s1779-0123\(07\)70308-x](https://doi.org/10.1016/s1779-0123(07)70308-x).
- [16] C. Hilan, R. Sfeir, and S. Aitour, "Chimiotypes de plantes communes au Liban du genre *Origanum* et du genre *Micromeria* (Lamiaceae)," *Leban. Sci. J.*, vol. 12, no. 1, pp. 79–91, 2011.
- [17] F. Couic-Marinier and A. Lobstein, "Chemical composition of essential oils," *Actual. Pharm.*, vol. 52, no. 525, pp. 22–25, 2013. [DOI:10.1016/j.actpha.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.02.006).
- [18] M. Chenni, "Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic "*Ocimum basilicum* L." extraite par hydrodistillation et par micro-ondes," 2016. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1 Ahmed BenBella.
- [19] J. Mejri, A. Aydi, M. Abderrabba, and M. Mejri, "Emerging extraction processes of essential oils: A review," *Asian J. Green Chem.*, vol. 2, pp. 246–267, 2018. [DOI:10.22034/ajgc.2018.61443](https://doi.org/10.22034/ajgc.2018.61443).
- [20] N. M. Boukhatem, A. Ferhat, and A. Kameli, "Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : Revue de Littérature," *Rev. Agrobiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 1653–1659, 2019.
- [21] M., Lucchesi, "Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, 2005. Thèse de doctorat. Université de la Reunion.
- [22] N. Bousbia, "Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 2013. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00915117>.
- [23] M. Vinatoru, T. J. Mason, and I. Calinescu, "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 97, pp. 159–178, 2017. [doi: 10.1016/j.trac.2017.09.002](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002).
- [24] M. Leila, D. Ratiba, and A. H. Al-Marzouqi, "Experimental and mathematical modelling data of green process of essential oil extraction: Supercritical CO₂ extraction," *Mater. Today Proc.*, vol. 49, pp. 1023–1029, 2020. [DOI:10.1016/j.matpr.2021.08.125](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.08.125).
- [25] E. Barrajón-Catalán, L. Tomás-Menor, A. Morales-Soto, "Chapter 74 - Rockroses (*Cistus* sp.) Oils," *Essent. Oils in Food Preserv., Flavor and Saf.*, pp. 649–658, 2016. [DOI:10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2).
- [26] M. R. Loizzo, M. Ben Jemia, F. Senatore, M. Bruno, F. Menichini, and R. Tundis, "Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 586–594, 2013. [DOI:10.1016/j.fct.2013.06.040](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.040).

- [27] B. Bazdi, A. Dahdouh, A. Lamarti, and A. I. Mansour, J. L. Oller-López, R. Rodríguez, J. M. Cuerva and J. E. Oltra, "Composition of the essential oils of *cistus ladaniferus* and *C. Monspeliensis* from Morocco," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 17, no. 5, pp. 553–555, 2005. [DOI:10.1080/10412905.2005.9698992](https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698992).
- [28] M. Viuda-Martos, E. Sendra, J. A. Pérez-Alvarez, et al., "Identification of Flavonoid Content and Chemical Composition of the Essential Oils of Moroccan Herbs: Myrtle (*Myrtus communis* L.), Rockrose (*Cistus ladanifer* L.) and Montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.) and Montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.)," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 23, 2011. [DOI:10.1080/10412905.2011.9700439](https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700439).
- [29] J. El Karkouri, M. Bouhrim, O. Mohamed -Al Kamaly, H. Mechchate, et al., "Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil from *cistus ladanifer* L.," *Plants*, vol. 10, no. 10, 2021. [DOI:10.3390/plants10102068](https://doi.org/10.3390/plants10102068).
- [30] T. Benali, A. Bouyahya, K. Habbadi, et al., "Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladaniferus* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 28, 2020. [DOI:10.1016/j.bcab.2020.101696](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101696).
- [31] I. Mediavilla, M. A. Blázquez, A. Ruiz, and L. S. Esteban, "Influence of the storage of *cistus ladanifer* l. Bales from mechanised harvesting on the essential oil yield and qualitative composition," *Molecules*, vol. 26, no. 8, 2021. [DOI:10.3390/molecules26082379](https://doi.org/10.3390/molecules26082379).



CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1 Techniques analytiques et préparatives

L'étude phytochimique des deux plantes étudiées est basée essentiellement sur l'identification des profils chimiques des extraits et des fractions par le biais de la déréplication, la purification des nouvelles molécules, l'isolement, et l'identification structurale des métabolites secondaires. Différentes méthodes et techniques analytiques ont été utilisées à savoir : la chromatographie sur colonne, la chromatographie sur couche mince, la CPG/MS, l'UHPLC-MSn, et l'HPLC préparative.

II.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique chromatographique utilisée pour séparer des mélanges. Elle est effectuée sur une feuille de verre, de plastique ou d'aluminium recouverte d'une fine couche d'adsorbant qui est généralement un gel de silice, d'oxyde d'aluminium ou cellulose (papier buvard). Cette couche absorbante est connue sous le nom de phase stationnaire. Les solvants utilisés sont connus sous le nom de « phase mobile ». Cette technique repose essentiellement sur le phénomène d'adsorption, elle est applicable aux extraits (mélanges complexes ou produits purs). Le type de CCM utilisé est la silice Kieselgel 60 F254 Merck®, 250 µm sur feuille d'aluminium (20 x 20 cm). Le développement des plaques se réalise dans des cuves en verre saturées avec l'éluant adéquat.

II.1.2 Chromatographie liquide sur colonne (CC)

La chromatographie sur colonne ouverte, est une technique utilisée pour le fractionnement et la purification. Le choix de la nature de la phase stationnaire dépend du type de l'échantillon à purifier.

II.2 Détermination structurale

II.2.1 La chromatographie couplée à la spectroscopie de masse (UHPLC-MSn)

L'analyse des profils chimiques, des extraits et des fractions des deux plantes étudiées, a été réalisée avec un appareil UHPLC Thermo SCIENTIFIC 3000 équipé d'un détecteur à photodiode (3000RS-DAD) couplé à un spectromètre de masse LTQ XL Linear Ion Trap 2D.

II.2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

Les spectres RMN ont été effectués au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimique (Bousmail Tipaza, Algérie) sur un spectromètre Brüker à 400 MHz pour ^1H et 100 MHz pour ^{13}C . Le solvant utilisé pour la solubilisation des composés est le DMSO deutéré.

II.3 Etude phytochimique de l'espèce *Cistus clusii*

L'identification botanique de l'espèce *Cistus clusii* a été effectuée par le Professeur Bachir Oudjehih, enseignant à l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna 1. La récolte de la plante *C.clusii* a été faite en juin 2012, en pleine floraison. La plante a été séchée à l'ombre, à une température ambiante et à l'air libre.

II.3.1 Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation en utilisant un appareil type Clevenger (Figure II.1). Une quantité de 100 g des parties aériennes de la plante (tiges, feuilles, et fleurs) a été immergée dans un ballon rempli d'eau qui a été ensuite porté à l'ébullition pendant 3 heures. L'huile essentielle obtenue est stockée à une température de -4°C et à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures. Le rendement en huile essentielle (%) a été déterminé en considérant le volume de l'huile extraite (ml) par 100 g de matériel végétal sec.

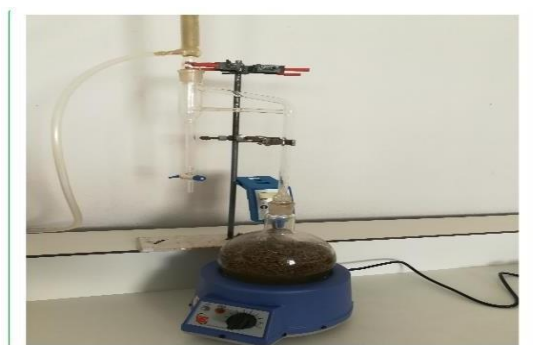


Figure II.1 : Dispositif d'extraction de l'huile essentielle de *C.clusii*.

II.3.2 L'analyse de l'huile essentielle de *C.clusii* par GC/MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse est la méthode la plus fréquemment utilisée pour l'identification des huiles essentielles. Les analyses ont été effectuées avec un chromatographe Hewlett-Packard 6890 GC couplé à un détecteur de masse, en utilisant une colonne capillaire HP5-MS (30 m \times 0.32 mm, 0.25 μm d'épaisseur du film). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1.2 ml/min. Le volume d'échantillon injecté était de 1.50 μl avec mode split, les températures de : détecteur, injecteur et source d'ionisation sont : 280, 250 et 230 $^{\circ}\text{C}$, respectivement.

La composition chimique a été identifiée en comparant les indices de rétention (IR) relatifs aux séries des alcanes (C9-C17) avec des composés de références de la littérature.

II.3.3 Extraction de l'exsudat

Une masse de 2 kg de la plante *Cistus clusii* a été trempée dans 5 litres d'acétone le même jour de la cueillette pendant 5 min. Ensuite le mélange a été filtré puis évaporé sous vide à une température de 30 °C [1]. Pour l'élimination des cires de la matière résineuse, l'extrait a été dissous dans le méthanol chaud (1 g d'extrait / 10 ml de MeOH) à une température de 50-60°C. La solution méthanolique a été refroidie à -20 °C pendant 12 heures. Par la suite l'extrait a été mis à une centrifugation puis il a été concentré par l'évaporation sous vide. Les protocoles d'extraction sont illustrés dans la figure II.2

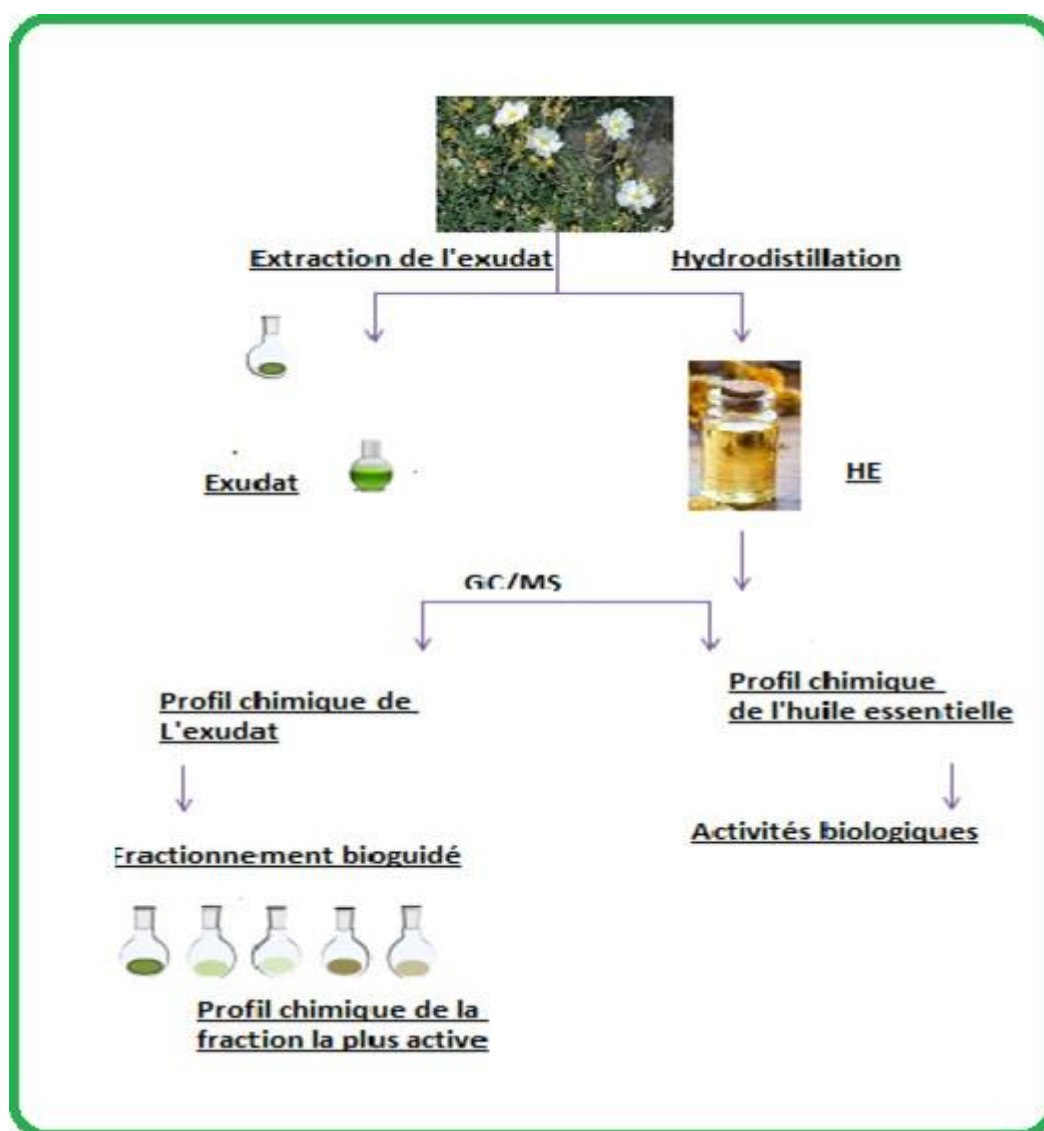


Figure II.2 Schéma d'extraction des parties aériennes de la plante *C. clusii*.

II.3.4 Analyse de l'exsudat de *C.clusii* par GC/MS

Avant l'analyse par GC-MS, une quantité de 20 mg de chaque extrait est dissoute dans 250 µL de pyridine. En ajoutant 250 µl de bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide et 50 µl de triméthylchlorosilane, les composés contenant des groupes hydroxyle et carboxyle se convertissent en éthers et esters de triméthylsilyle (TMS), respectivement. Le mélange est chauffé par la suite à 70 °C pendant 30 min, puis il est filtré avec un filtre en nylon de diamètre 0,2 µm (Ge Healthcare Life Sciences, Royaume-Uni) [2-3].

Les conditions d'analyse de l'exsudat et de la fraction active sont reportées dans le Tableau II.1.

Tableau II.1 Paramètres chromatographiques d'analyse de l'extrait exsudat par GC/MS.

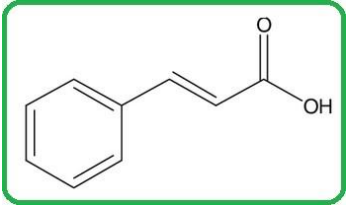
Paramètres chromatographique			
Le gaz vecteur : Hélium		Volume d'injection 0.2 µl	
Débit : 1,2 ml/min		Mode split	
T° Détecteur : 280 °C	T° injecteur : 250 °C	T° Source d'ionisation : 230 °C	Mode d'injection Split
Paramètres Spectrométriques de masse			
M/Z : (29-300) u.m.a	T source : 150°C	Nombre de scan/s : 2	Tension ME 1706 V

II.3.5 Fractionnement et purification de l'extrait exsudat

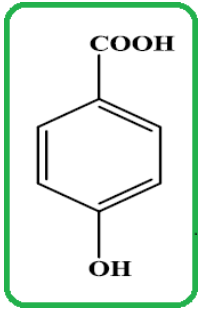
Après le traitement de l'exsudat brute, qui a mené à l'élimination des cires de la matière résineuse, l'extrait semi purifié est fractionné par chromatographie liquide sur une colonne de gel de silice éluée avec un système d'éluion ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; (100 :0 – 1 :1)). Cette étape a donné six fractions (Fr₁–Fr₆). La fraction Fr₃ (400mg) a donné deux sous fractions après fractionnement sur colonne de Sephadex LH-20 en utilisant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1 :1) comme éluant. Les sous-fractions ont été purifiées par RP-HPLC préparative, avec un système d'éluion ($\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ (15 :85 –70 :30) fournissant 03 composés purs : P₁ (8 mg), P₂ (12 mg) et P₃(10 mg).

II.3.6 Composés isolés de l'espèce *C.clusii*

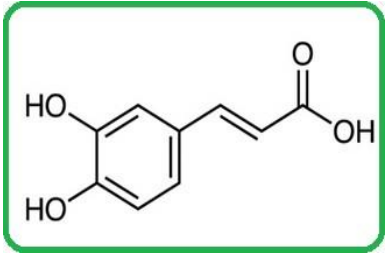
Composé P₁

<p>Nom : Acide trans cinnamique</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$ ➤ RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (100 MHz) dans le DMSO (Tableau III.4, page 76) 	
--	--

Composé P₂

<p>Nom : Acide p-hydroxy benzoïque</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Formule brute : C₇H₆O₃ ➤ RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (100 MHz) dans le DMSO (Tableau III.6, page 80) 	
---	---

Composé P₃

<p>Nom : Acide caféique</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Formule brute : C₉H₈O₄ ➤ RMN ¹H (400 MHz) et RMN ¹³C (100 MHz) dans le DMSO (Tableau III.8, page 83) 	
--	---

II.4 Etude phytochimique de l'espèce *Marrubium alysson*

L'espèce *Marrubium alysson* a été récoltée au mois de juin 2013 dans la région de Timgad (Batna). L'identification de la plante a été faite par Pr. Bachir Oudjehih, enseignant à l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna 1.

II.4.1 Extraction

1 Kg de la poudre sèche de *M. alysson* a été porté à une macération par un mélange H₂O/C₂H₅OH à 70% (3 x 10 L), à une température ambiante pendant 72 heures.

Après la filtration et la concentration de l'extrait aqueux obtenu, ce dernier a subi une extraction liquide-liquide avec des solvants de polarité croissante « éther de pétrole, acétate d'éthyle et n-butanol », ce qui a conduit à l'obtention de 2 g de l'extrait (EP) éthéropétrolique, 10 g de l'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) et 40 g de l'extrait n-butanolique (n-BuOH). Le protocole expérimental d'extraction est résumé dans la Figure II.3.

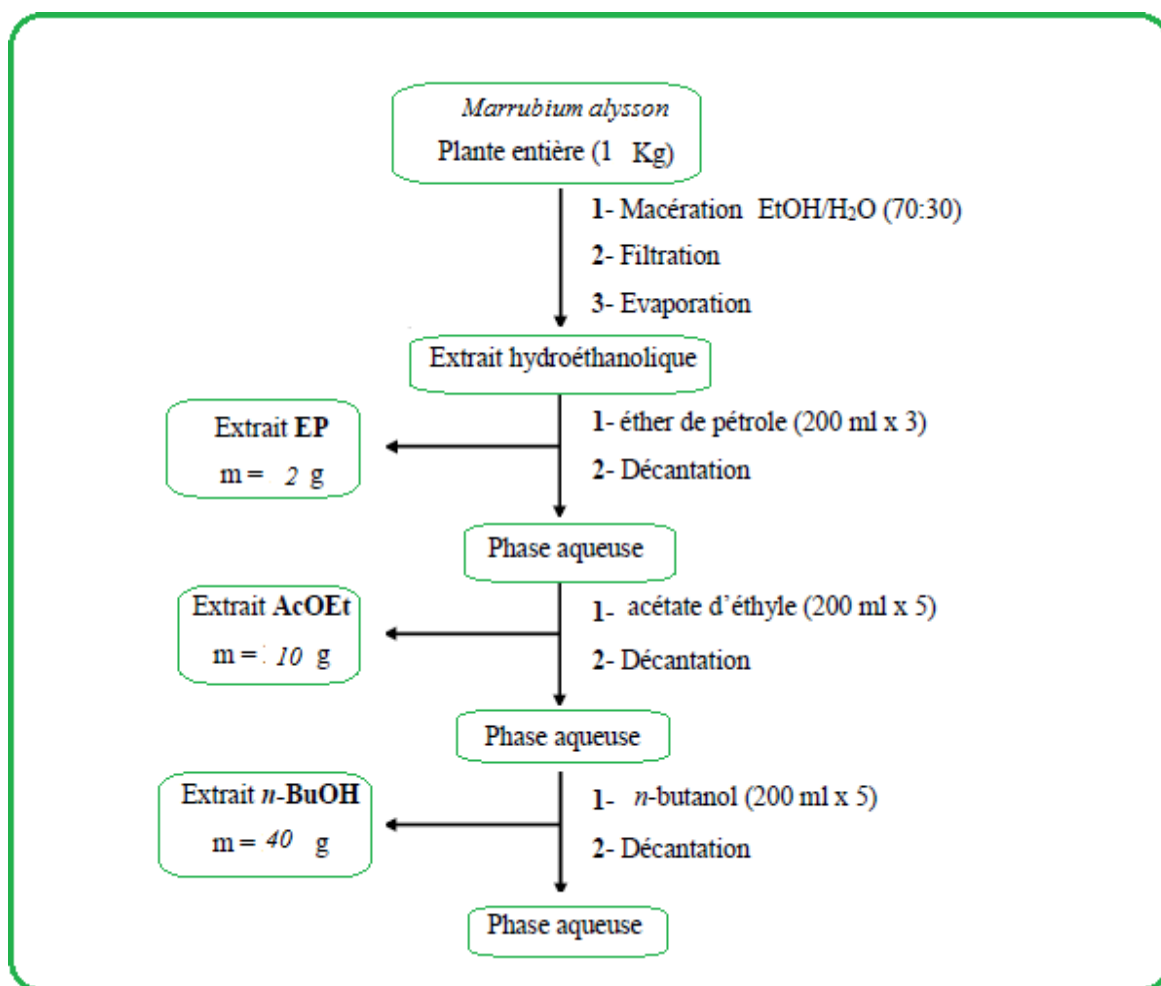


Figure II.3 Schéma d'extraction de *M. alysson*.

L'extrait n-BuOH a été choisie sur la base de tests biologiques (activité antimicrobienne) pour une étude phytochimique. Le profil chimique, analysé par UHPLC-DAD-ESI-MSn, a témoigné d'une composition riche en phényléthanoid.

II.4.2 Analyses des extraits de *M. alysson*

II.4.2.1 Préparation des échantillons

Avant l'analyse par UHPLC, chaque extrait (5 mg) a été dissous dans 1 mL de MeOH grade LC MS. La solution a été filtrée sur un filtre en nylon de porosité 0,2 μm (Ge Santé Sciences de la vie, Royaume-Uni).

II.4.2.2 Conditions opératoires

L'identification des phényléthanoids dans l'extrait n-butanol (5 mg/mL) a été réalisée par UHPLC-DAD-ESI-MSn type Thermo SCIENTIFIC 3000), équipé d'un détecteur à photodiode (3000RS-DAD), couplé à un spectromètre de masse LTQ XL Linear Ion Trap 2D. Le système

chromatographique est composé d'une pompe quaternaire, d'un préleveur automatique, d'un détecteur à photodiode, un compartiment colonne thermostatée et un spectrophotomètre de masse LTQ XL Linear Ion Trap 2D (Thermo Scientific) équipé d'une source d'ionisation orthogonale électrospray (ESI) (Figure II.4).

L'analyse a été effectuée dans les conditions suivantes :

- Colonne Hypersil GOLD (longueur 100 mm ; 2,1 millimètres I.D. et 1,9 μm de diamètre de particule)
- Volume de l'injection : 2 μL .
- Phase mobile : 0,1 % acide formique (v/v) (A) et acétonitrile (B).
- Gradient de solvant : 5% de (B) jusqu'à 40 % pendant 14 min
- 100 % de (B) pendant 2 min
- Maintenir ces conditions jusqu'à 18 min
- Rétablissement des conditions initiales avec une durée totale de programme de 20 min.
- Les analyses de masse ont été réalisées en mode négatif avec une tension de 5,00 kV et une température capillaire d'ESI à 275°C, en appliquant une énergie de collision de 20-25 eV dans les fragmentations.



Figure II.4 UHPLC-DAD-ESI-MS_n (Thermo SCIENTIFIC 3000).

II.5 Activités biologiques

Différentes activités biologiques des extraits (EE_{xd}, F3, n-BuOH et Ea_{qcc}) des deux espèces *M.alysson* et *C.clusii* ont été réalisées : in vitro « antimicrobienne et antioxydante » et in silico « anti-covid 19 ».

II.5.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une technique spectrophotométrique, selon la méthode colorimétrique de réactif de Folin-Ciocalteu. La technique est fondée sur la quantification de la concentration totale des fonctions hydroxyles présentent dans les extraits.

Dans des tubes en verre, un volume de 200 µl de chaque extrait est ajouté à un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu (1/10) et 800 µl d'une solution de carbonate de sodium à 7,5 %. Les tubes sont agités et incubés pendant 30 min. Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant l'acide gallique comme molécule de référence à différentes concentrations (0 à 1000 µg/ml) à une longueur d'onde λ_{\max} 765 nm [4].

II.5.2 Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes totaux est réalisée par une méthode fondée sur la formation d'un complexe stable entre Al^{+3} et les atomes d'oxygène présents sur les atomes de carbones 4 et 5 des flavonoïdes [4], selon la méthode décrite par Zhishen et al. (1999) avec quelques modifications [5].

Un volume de 0,3 ml de $NaNO_2$ (1 :20) est ajouté à 3 ml d' $AlCl_3$ à 10% (m/v) et 1 ml d'extrait de plante. Après 6 min de réaction, à température ambiante, le mélange est additionné à 2 ml de NaOH (1 M). Le volume du mélange est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Après agitation vigoureuse du mélange, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 510 nm. Les concentrations des flavonoïdes des différents extraits sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage (0-1000 µg/ml), établie avec la quercétine de concentration 1mg/ml.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par millilitre d'extrait (µg Eq/ml d'extrait).

II.5.3 Activité Antibactérienne

L'activité antibactérienne des différents extraits des deux plantes : *M.alysson* et *C.clusii* a été évaluée par la technique de diffusion en milieu solide sur différentes souches :

- Souches de référence : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27865) ;
- Souches cliniques : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

La méthode de diffusion en milieu solide est fondée sur l'utilisation des disques en papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre, imprégnés avec les extraits à tester. Donc les disques ont été mouillés avec des différentes solutions (1g/ml) (solution mère, et solutions diluées) des extraits organiques dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et dans l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux. Le DMSO a été utilisé en tant que contrôle négatif. Puis ils étaient déposés au milieu des boîtesensemencées par les souches sur le milieu de culture Mueller- Hinton pour les bactéries et la gélose Sabouraud-chloramphénicol pour la souche *Candida albicans*. Après 24h d'incubation pour les bactéries et 48h pour les levures, les zones d'inhibition ont été mesurées [6].

II.5.4 Activité antioxydante

II.5.4.1 Test de réduction de cuivre (CUPRAC)

L'activité antioxydante est mise en évidence par la technique de réduction cuprique des extraits des deux plantes étudiées selon la méthode CUPRAC [7]. Dans des plaques de 96 puits de microplaques. Un mélange de solutions : 50 µl de Cu (II) (10 mM), 60 µl de tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7), 50 µl de neocuproïne (7.5 mM), est ajouté à 40 µL de l'extrait à différentes concentrations. Après une heure d'incubation, l'absorbance est mesurée à 450 nm. Les résultats sont exprimés en A0.5(µg /ml) qui correspond à la concentration 0.50 d'absorbance. Le BHA et le BHT sont utilisés comme des standards.

II.5.4.2 DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits des deux plantes (*M.alysson*, *C.clusii*) a été évaluée par le biais de la technique de Piégeage du radical libre DPPH, selon la méthode décrite par Blois (1958) avec des modifications légères [7,8].

Un volume de 160 µl de solution de DPPH est ajouté à la solution des extraits ou standards (à différentes concentrations), après l'incubation durant 30 minutes, à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le BHA (Butyl Hydroxy Anisol), et BHT (Butyl Hydroxy Toluène) sont utilisés comme des molécules standards.

Les résultats sont exprimés en IC₅₀ (µg/ml), correspondant à la concentration inhibitrice à 50%. L'activité antiradicalaire est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{DPPH Inhibition (\%)} = [(A \text{ Contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ Contrôle}] \times 100$$

A Contrôle = absorbance du contrôle après 30 min

A échantillon = absorbance de l'échantillon (extrait ou molécule standard) après 30 min.

II.5.4.3 Test de blanchissement du β-carotène

L'activité antioxydante est évaluée selon la technique de β-carotène décrite par Kartal et al. [9]. Elle est spécifique pour les composants dans les milieux d'émulsions.

Un volume de 40 µl de chaque extrait dilué dans le méthanol, à différentes concentrations, est ajouté à un volume de 160 µl d'une solution composée de : 0,5 mg de β-carotène, 200 µl de tween 40, 1 ml de chloroforme, 25 µl d'acide linoléique et 50 ml d'eau saturée en oxygène. L'absorbance est mesurée à 490 nm. Le BHA est utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en IC₅₀ (µg/ml), l'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = [\text{Abs t : 48h (échantillon)} / \text{Abs t : 48h (BHA)}] \times 100\%$$

II.5.5 Activité in silico anti covid 19

Afin d'étudier le potentiel inhibiteur du SARS-CoV-19 des molécules naturelles, des criblages virtuels sont effectués en se basant sur la relation structure-activité. Quatre molécules ont été proposées pour les tester contre le SARS-CoV-19, il s'agit de : l'acide p-hydroxy-benzoïque, l'acide trans-cinnamique, l'acide caféique et la rutine.

II.5.5.1 Bases de données utilisées

➤ PubChem

La base de données PubChem regroupe les petites molécules et les grandes structures comme les nucléotides, les glucides, les peptides et les lipides. Elle contient des informations sur les structures chimiques, les propriétés physico-chimiques, les activités biologiques, et la toxicité des composants [10].

➤ Banque de données des protéines (PDB)

La base de données (PDB Protein Data Bank) regroupe toutes les données structurales et spatiales (tridimensionnelles) des macromolécules biologiques, telle que : les acides nucléiques et protéines. Ces données, fréquemment obtenues par la cristallographie (rayons X), ou bien la spectroscopie (RMN) [11-12].

II.5.5.2 Logiciels

➤ PYRX

Le criblage moléculaire de toutes les bibliothèques de composés a été réalisé à l'aide du logiciel PyRx par assistant autodock comme logiciel d'amarrage [13]. Logiciel PyRx est une combinaison de plusieurs sous-programmes tels que : AutoDock Vina, AutoDock 4.2, Mayavi, et Open Babel. Pyrx est un outil d'amarrage moléculaire et Open Babel pour la conversion des formats des fichiers. Il est utilisé pour le criblage des bibliothèques de composés contre des cibles potentielles (molécules médicaments) en calculant leur énergie d'interaction grâce au sous-programme Vina [14].

➤ Discovery Studio

Discovery Studio 2021 est un logiciel utilisé pour approuver les systèmes à tester que ce soit les petites molécules ou les macromolécules. Il couvre plusieurs domaines tels que : la modélisation de pharmacophore, la simulation et la conception des ligands [15-16].

II.5.5.3 Procédure expérimentale

L'amarrage moléculaire (docking molecule) est effectué pour déterminer l'affinité de liaison et découvrir les interactions intermoléculaires (protéine ou enzyme).

L'amarrage de notre dépistage virtuel se déroule selon les étapes suivantes :

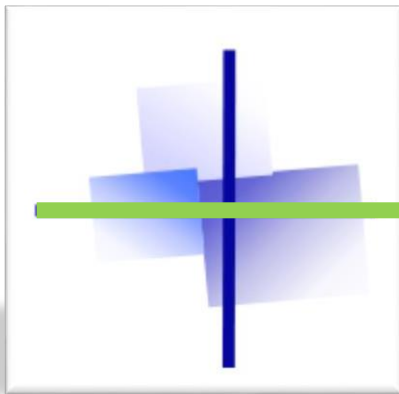
- ✓ Préparation de la cible
- ✓ Préparation du ligand
- ✓ Docking moléculaire
- ✓ Analyse des résultats.

Références

- [1] N. Chaves, T. Sosa, J. C. Alias, and J. C. Escudero, “Identification and effects of interaction phytotoxic compounds from exudate of cistus ladanifer leaves,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 27, no. 3, pp. 611–621, 2001. [DOI:10.1023/a:1010336921853](https://doi.org/10.1023/a:1010336921853).
- [2] L. Oliveira, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, N. Cordeiro, I. C. Torres, and D. Evtugin, “Steryl glucosides from banana plant *Musa acuminata* Colla var cavendish,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 22, no. 3, pp. 187–192, 2005. [DOI:10.1016/j.indcrop.2004.10.001](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.10.001).
- [3] C. Mathe, M. Hovaneissian, P. Archier, P. Archier and C. Vieillescazes, “Identification de résines végétales datant de l’Egypte ancienne par Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse,” *Archeosciences.*, vol. 29, pp. 157-161, 2005. [DOI:10.4000/archeosciences.658](https://doi.org/10.4000/archeosciences.658).
- [4] F. Ali-rachedi and N. T. et S. Meraghni, N.Touaibia and M.Sabrina, “Analyse quantitative des composés phénoliques d’une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L.,” *Bull. Soc. R. Sci. Liege.*, vol. 87, no. 3, pp. 13-21, 2018. [DOI: 10.25518/0037-9565.7398](https://doi.org/10.25518/0037-9565.7398).
- [5] J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, “The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals,” *Food Chemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 555–559, 1999. [DOI:10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).
- [6] Y. M. Choi, D. O. Noh, S. Y. Cho, H. J. Suh, K. M. Kim, and J. M. Kim, “Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea,” *Lwt*, vol. 39, no. 7, pp. 756–761, 2006. [DOI:10.1016/j.lwt.2005.05.015](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.05.015).
- [7] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, and S. E. Karademir, “Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 26, pp. 7970–7981, 2004. [DOI:10.1021/jf048741x](https://doi.org/10.1021/jf048741x).
- [8] M. Öztürk, U. Kolak, G. Topu, S. Öksüz, and M. I. Choudhary, “Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation,” *Food Chem.*, vol. 126, no. 1, pp. 31–38, 2011. [DOI:10.1016/j.foodchem.2010.10.050](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.050).
- [9] N. Kartal, M. Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, and A. Sokmen, “Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure,” *Food Chem.*, vol. 100, no. 2, pp. 584–589, 2007. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.09.084](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.084).
- [10] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [11] R. Hilgenfeld, “From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design,” *FEBS J.*, vol. 281, no. 18, pp. 4085–4096, 2014. [DOI:10.1111/febs.12936](https://doi.org/10.1111/febs.12936).
- [12] Protein Data Bank », Wikipedia. nov. 13, 2020, Consulté le : nov. 19, 2020. [En ligne]. Disponible sur : https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_Data_Bank.

Références

- [13] B. D. Uhal, M. Sankar, B. Ramachandran, and B. Pandi,, “In silico Screening of Natural Phytocompounds Towards Identification of Potential Lead Compounds to Treat COVID-19, *Front. mol. Biosci.*,” vol. 8, pp. 637122, 2021. [Doi: 10.3389/fmolb.2021.637122.](https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.637122)
- [14] <https://www.scribd.com/document/443838157/PyRx-pdf>.
- [15] B. G. Samy and L. Xavier, “Molecular Docking Studies on Antiviral Drugs for SARS,” *Int. J. Adv. Res. Comput. Sci. Softw. Eng.*, vol. 5, no. 3, pp. 75–79, 2015. [DOI: 10.1016/j.imu.2020.100345.](https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100345)
- [16] P. Shree , P. Mishra , C. Selvaraj , and al.,“Targeting COVID -19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytochemicals of ayurvedic medicinal plants–*Withania somnifera* (Ashwagandha), *Tinospora cordifolia* (Giloy) and *Ocimum sanctum* (Tulsi)–a molecular docking study,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 40, no. 1, pp. 190–203, 2022. [DOI:10.1080/07391102.2020.1810778.](https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1810778)



CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Plante I « C. clusii »

III.1 Identification des composants de l'HE de *C. clusii*.

La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour déterminer les composants de l'huile essentielle de *C. clusii*. Cette technique de séparation se base essentiellement sur la différence de température d'ébullition des différents constituants du mélange dont le composé le plus volatil sort en premier lieu.

Tableau III.1 La composition chimique de l'HE de *C. clusii*.

IK	Composé	%
865	Cis-salvene	0.2
926	Tricyclène	0.4
930	α -Thujène	5.9
939	α -Pinène	4.1
953	Camphène	20.6
967	Verbenène	0.1
976	Sabinène	12.8
990	β -Myrcène	0.1
1005	α -phellandrène	0.3
1017	α -Terpinène	8.9
1026	p-Cimène	3.3
1030	β -phellandrène	1.2
1050	β -Ocimène	0.5
1059	γ -Terpinène	16
1088	α -Terpinolène	3.08
1097	Trans-Sabinène hydrate	0.2
1098	Linalool	0.13
1114	β -Thujone	0.08
1139	Trans-Pinocarvéol	0.16
1143	Camphre	0.9
1144	Trans-Verbeneol	0.1
1156	Isobornéol	1.9
1189	α -Terpinéol	13.4
1193	Myrténol	0.35
1194	Piperitol isomère	0.13
1239	Aldehyde Cuminique	0.1
1285	Acétate d'isobornyl	1.13
1418	Cis-Caryophyllène	0.11
1521	1S,Cis-Calamène	0.66
1563	β -Calacorréne	0.08
1581	Oxide de caryophyllène	1.04
Monoterpène hydrocarbonés	78.34%	
Monoterpènes Oxygénés	18.78%	
Sesquiterpènes	1.9%	
Total%	99.035	

Le résultat de l'analyse de l'HE des parties aériennes de *Cistus clusii* nous a permis d'identifier 31 constituants représentant 99,035% de la composition chimique. D'après le profil chimique de l'HE de *C.clusii* présenté dans le tableau III.1, on remarque que :

- Les monoterpènes représentent 78.34 % de l'HE dont les composés majoritaires sont : le Camphène (20.6%), γ -terpinène (16%), α -Terpineol (13.4%), le Sabinène (12.8%) et α -Terpinène (8.9%).
- Monoterpènes oxygénés 18.78%
- Sesquiterpènes 1.9%.

La prédominance du camphène, γ -terpinène, sabinène et du α -terpinéol dans l'huile essentielle (Figure III.1) est similaire aux autres espèces des échantillons de *Cistus libanotis* originaire du Maroc et de Tunisie. Les mêmes composants ont été détectés, comme constituants principaux, avec des proportions plus élevées [1].

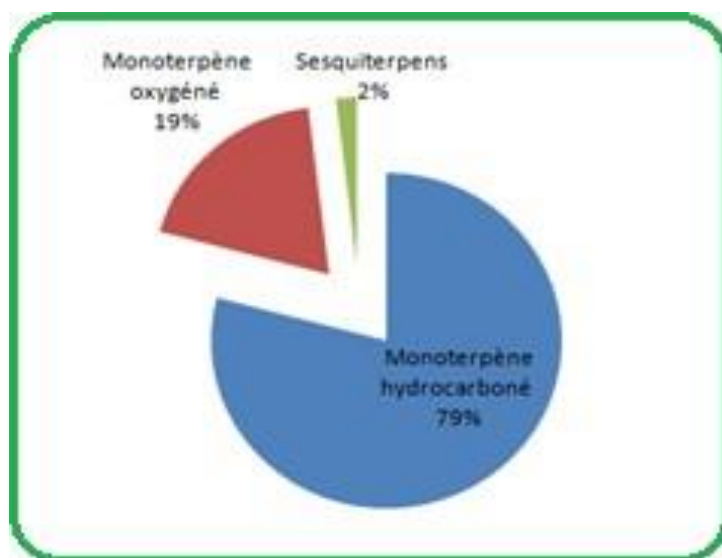


Figure III.1 Familles de composés présents dans l'HE de *C.clusii*

Des études antérieures sur la composition des HE des espèces qui poussent en Algérie et d'autres pays ont été rapportées par plusieurs auteurs. Une étude comparative du profil chimique des huiles essentielles obtenues pour les espèces Algériennes (*C. ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis*) a montré des différences qualitatives et quantitatives. Les hydrocarbures mono-terpéniques représentent les pourcentages élevés d' α -pinène, avec des valeurs qui varient de 19.46 à 47.1%, dans la plupart des travaux. Le Tableau III.2 et Figure III.2 résumant les composants majoritaires des espèces Algériennes [2].

Tableau III.2 Les principaux composants des HE des différentes espèces Algériennes.

Composé (%)	<i>C. libanotis</i>	<i>C. ladanifer</i>	<i>C. munbyi</i>	<i>C. monspeliensis</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. clusii</i>
Camphène	12.2	15.5	2.60	-	-	20.6
γ -Terpinène	12.4	3.8				16.0
Bornéol	-	12.5	0.86	0.9	-	-
Terpineol-4	17.4	6.3	23.75	0.9	-	13.4

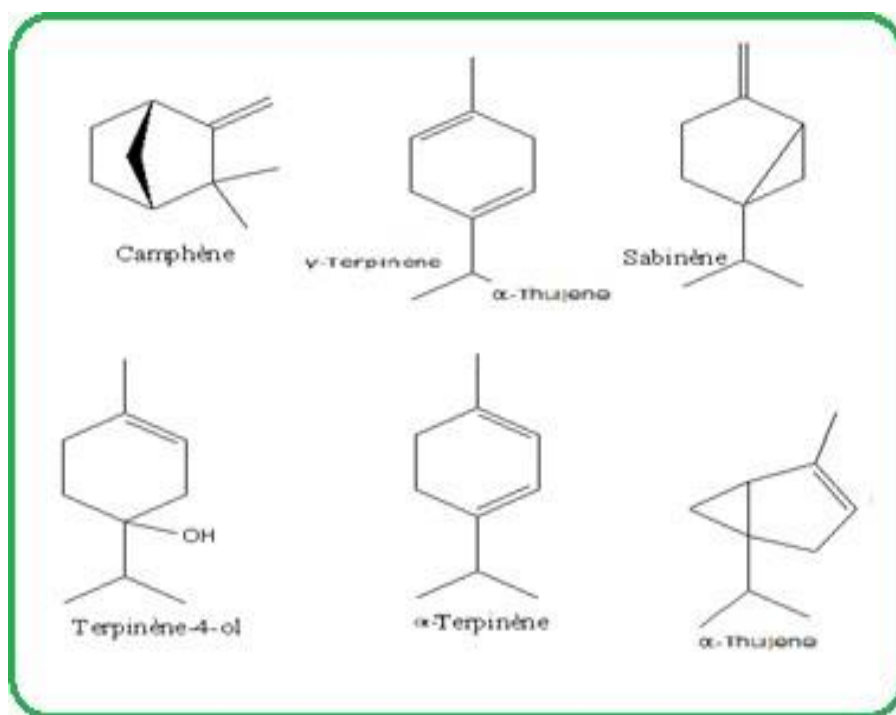


Figure III.2 Les produits majoritaires de l'HE de *C. clusii* Algérienne.

D'autres composants tels que : le Cis-Salvène, le Verbenène, le Linalool et l'aldéhyde cuminique, qui sont spécifiques à notre huile, ne sont pas détectés dans les autres espèces de la famille des Cistacea. L'huile essentielle de *C. clusii* Algérienne montre donc : un profil qualitatif et quantitatif particulier, par rapport aux autres huiles isolées des plantes Cistacea [3-6].

III.2 Analyse par GC/MS de l'exsudat

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique de l'exsudat et la fraction la plus active (activité biologique) de la plante *C. clusii*, qui n'ont jamais fait l'objet d'étude antérieure.

L'étude bio guidée de la fraction la plus active a permis l'identification des acides phénoliques majoritaires (Tableau III.3). Ces molécules analysées par GC/MS, ont été caractérisées par le biais des indices de rétention (RI), par leurs fragmentations spécifiques en

Résultats et Discussion

spectrométrie de masse et par une comparaison avec les données reportées dans la littérature. Le profil chimique de cette fraction a révélé la présence de 06 composés représentés par deux groupes distincts (Tableau III.3) :

- ✓ Acides phénoliques
- ✓ Flavonoïdes

Tableau III.3 Ions caractéristiques (m/z) détectés dans les spectres de masse des dérivés de silylation.

N°	Composants	Ions M/Z
1	L'acide Trans-cinnamique	220, 205, 161, 145, 131, 103, 73
2	L'acide 4-Hydroxy benzoïque	282, 267, 209, 193, 73
3	L'acide P-coumarique	308, 293, 249, 219, 179, 73
4	L'acide Caféique	396, 381, 219, 73
5	Catéchine	650, 368, 355, 267, 179, 73
6	L'acide ellagique	590, 575, 487, 73

La méthode GC/MS est une technique performante permettant d'obtenir des informations efficaces sur la structure des composés détectés. Les fragmentations caractéristiques des composés mènent à la détermination des structures moléculaires. L'identification des constituants est basée sur l'injection de composés standards (Acide ellagique) et par la comparaison des spectres de masse avec la base de données, NIST 2012. La Figure III.3 présente les chromatogrammes de l'extrait et de la fraction active.

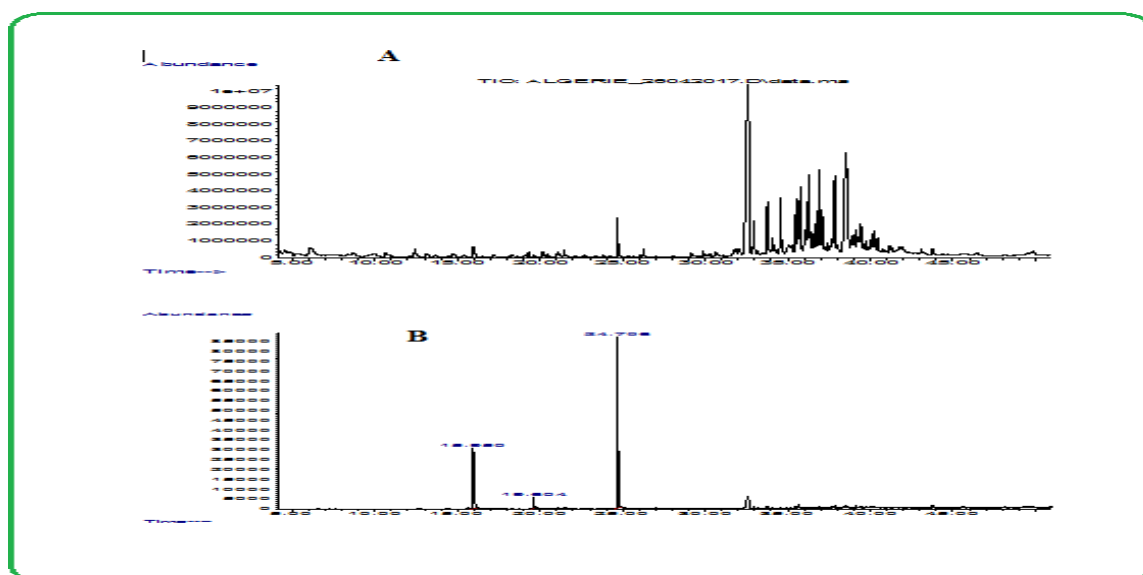


Figure III.3 Chromatogrammes (A) exsudat brute, (B) fraction F3

III.2.1 Identification du composé 1

Le composé 1 a été identifié à l'acide trans-cinnamique, en se basant sur la comparaison des fragments obtenus avec ceux des bases de données. Son spectre de masse (dérivé silylé) montre plusieurs fragments, les plus intenses ont des masses : 131, 103, et 73 m/z (C₂H₇OSi) ce dernier représente le fragment le plus abondant. La Figure III.4 représente le schéma de la décomposition de l'acide trans-cinnamique selon la base de données HMD [7].

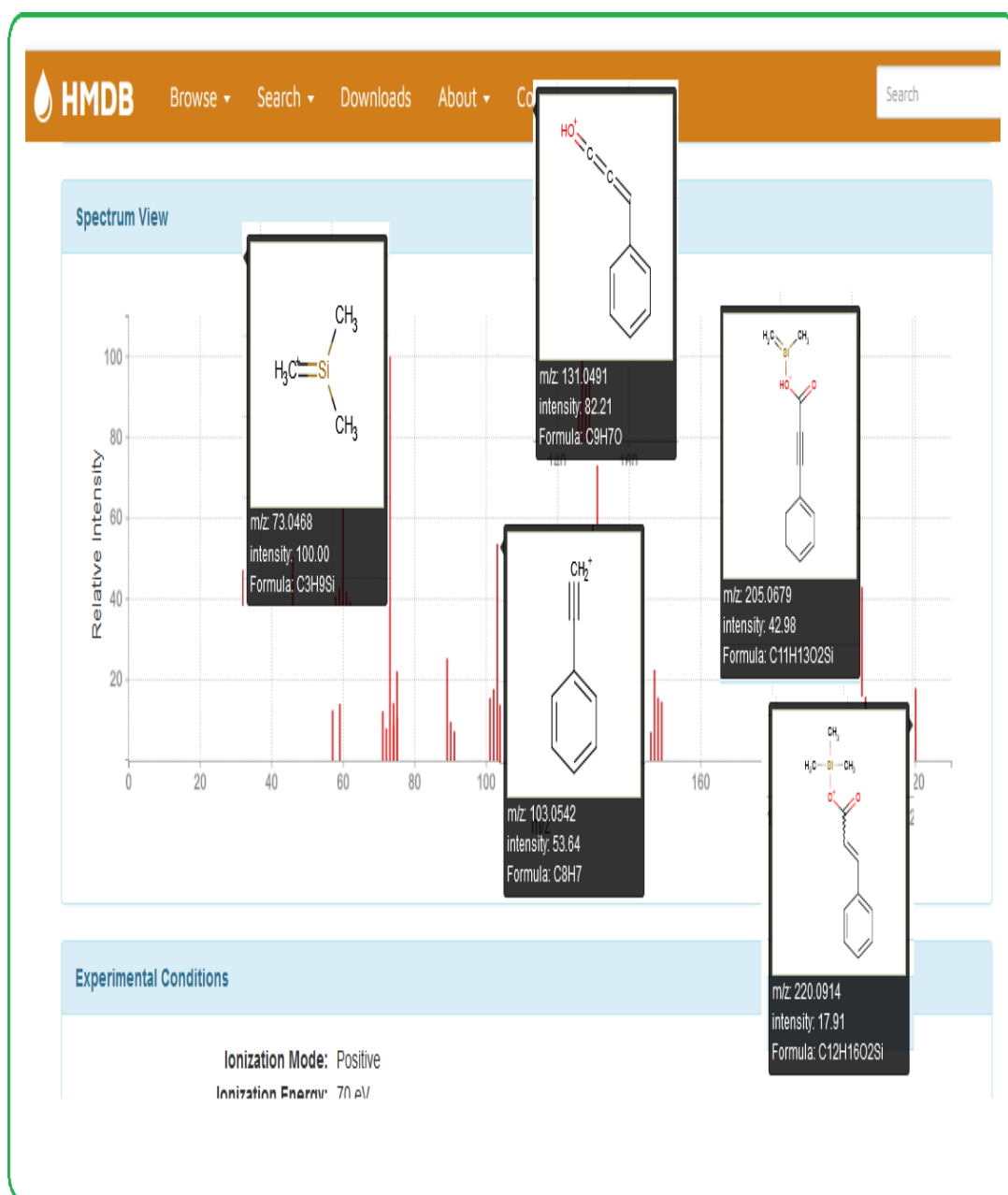


Figure III.4 Fragmentation de l'acide trans-cinnamique [7]

III.2.2 Identification du composé 2

Le **Composé 2** est identifié comme étant l'acide 4-hydroxybenzoïque sur la base d'une comparaison des masses de fragmentation avec ceux reportés dans la bibliographie. Son spectre de masse démontre que le fragment le plus abondant a une masse de 267 m/z qui résulte du départ d'un groupement méthyle lié à l'un des siliciums du dérivé silylé (**Figure III.5**).

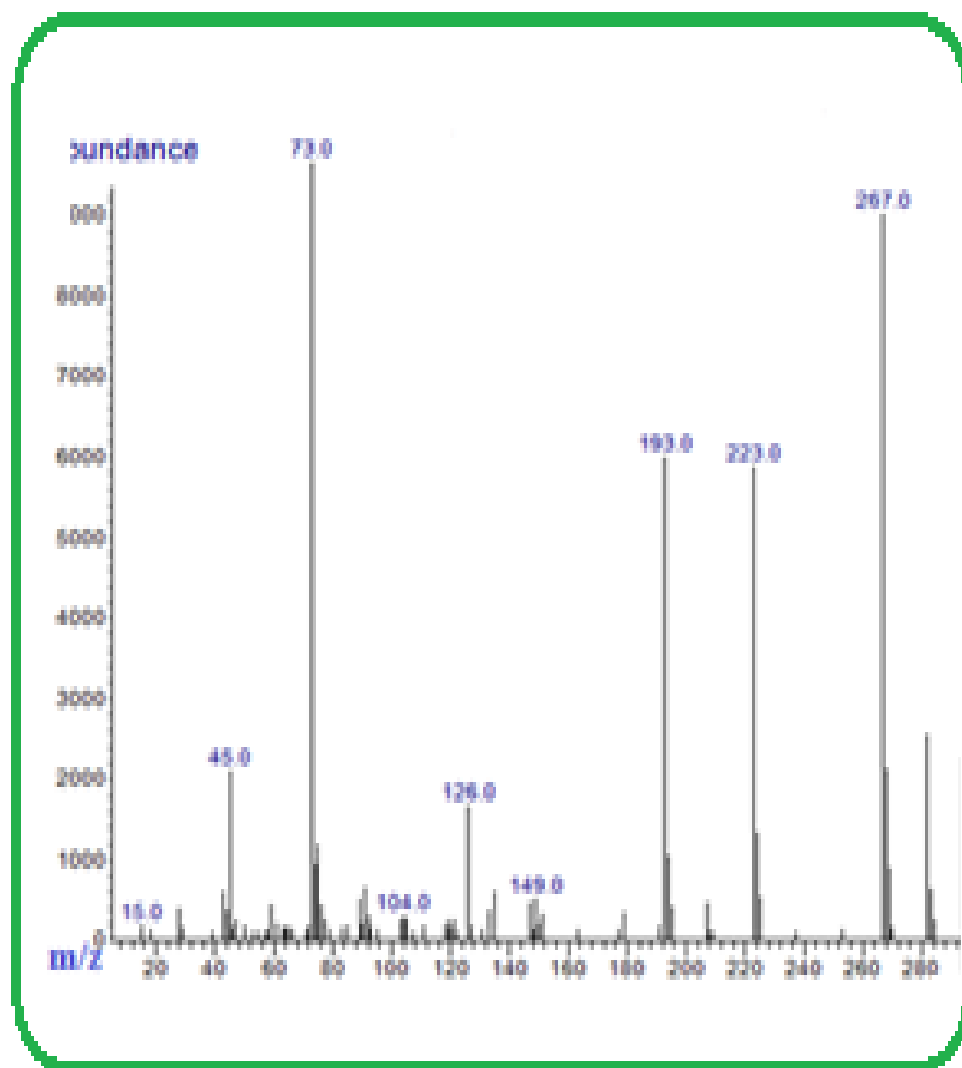


Figure III.5 Spectre de masse de L'acide 4-hydroxy benzoïque

Le fragment de masse 193 m/z provient de la scission de la liaison entre un carbone et un oxygène lié au silicium. Les fragments de masse 73 m/z et 209 m/z résultent du départ du groupement triméthylsilyl (**Figure III.6**). Ce composé identifié est connu sous le nom commercial parabènes, qui est utilisé comme conservateurs dans l'industrie des produits cosmétiques.

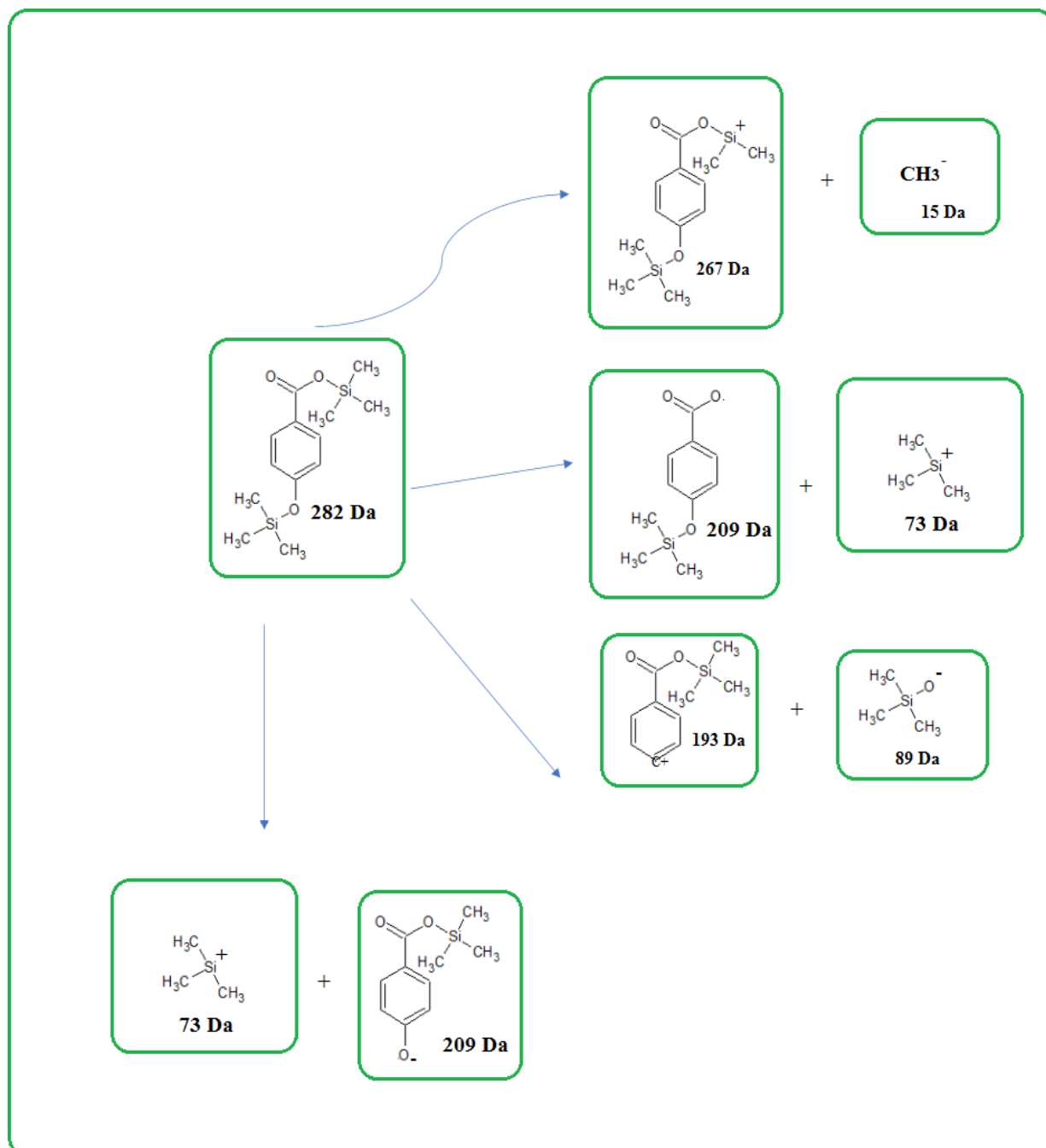


Figure III.6 Schéma de la décomposition de l'acide 4-hydroxy benzoïque [8]

III.2.3 Identification du composé 3

Le composé 3 est l'acide P-coumarique, son spectre de masse du dérivé silylé (Figure III.7) montre que le fragment le plus abondant a une masse de 293 m/z (Figure III.7). Ce fragment correspond au groupement $C_{14}H_{21}O_3Si_2$ qui résulte du départ d'un groupement ($-CH_3$). En outre il apparaît sur le spectre d'autres fragments tel que :

- Fragment de masse 219 m/z : résultat de la scission de la liaison entre l'oxygène et un carbone appartenant au cycle aromatique ;

- Fragment de masse 249 m/z : provient du départ de 4 groupements méthyles ;
- Fragment de masse 73 m/z : correspondant au groupement triméthylsilyle (-TMS)

Cette identification est confirmée par la comparaison des fragments de masse avec les données de la littérature [9].

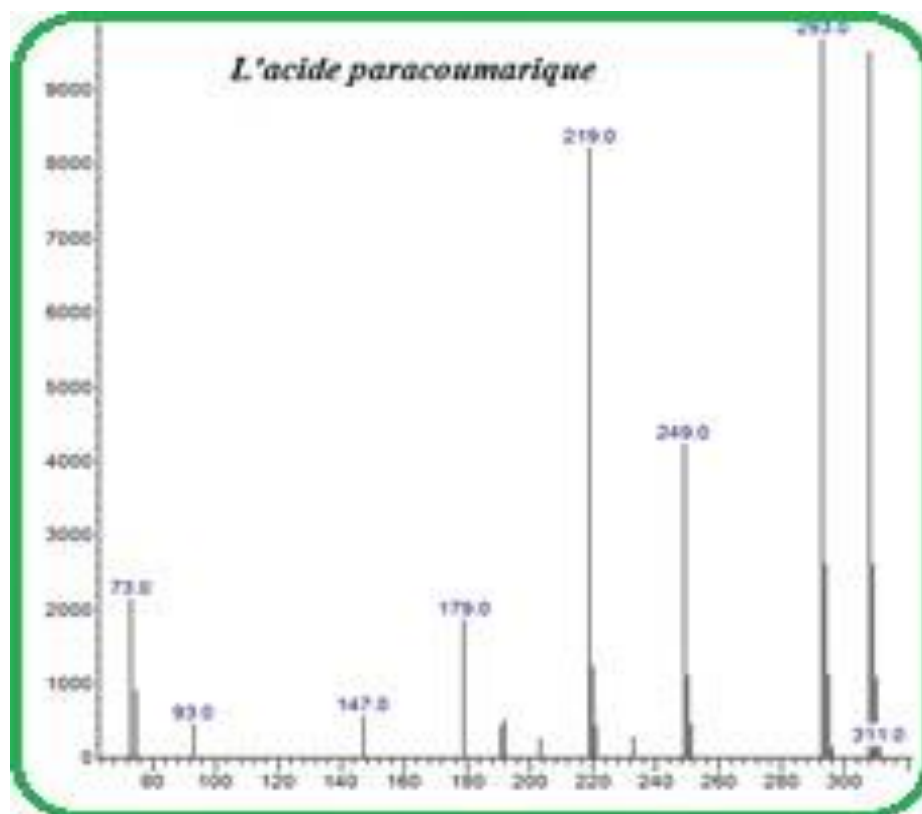


Figure III.7 Spectre de masse du composé 3 (l'acide P-coumarique).

III.2.4 Identification du composé 4

Le **composé 4** a été identifié à l'acide Caféique en se basant sur les données des fragments de la masse (Figure III.8).

Le fragment le plus abondant sur le spectre de masse de son dérivé est le fragment 219 m/z, résulte de la rupture de la liaison carbone-carbone au niveau du groupement carbonyle, suivi d'un fragment de masse 73 m/z qui provient du départ de quatre groupements méthyles. Le schéma de la décomposition de l'acide Caféique est représenté dans la (Figure III.9) [10].

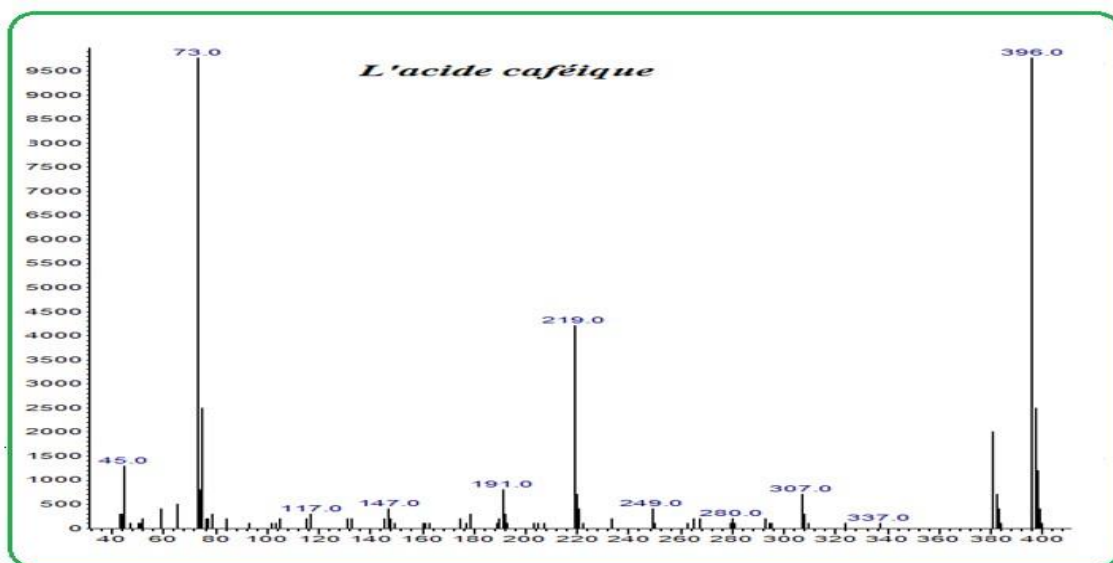


Figure III.8 Spectre de masse du composé 3 (l'acide caféique)

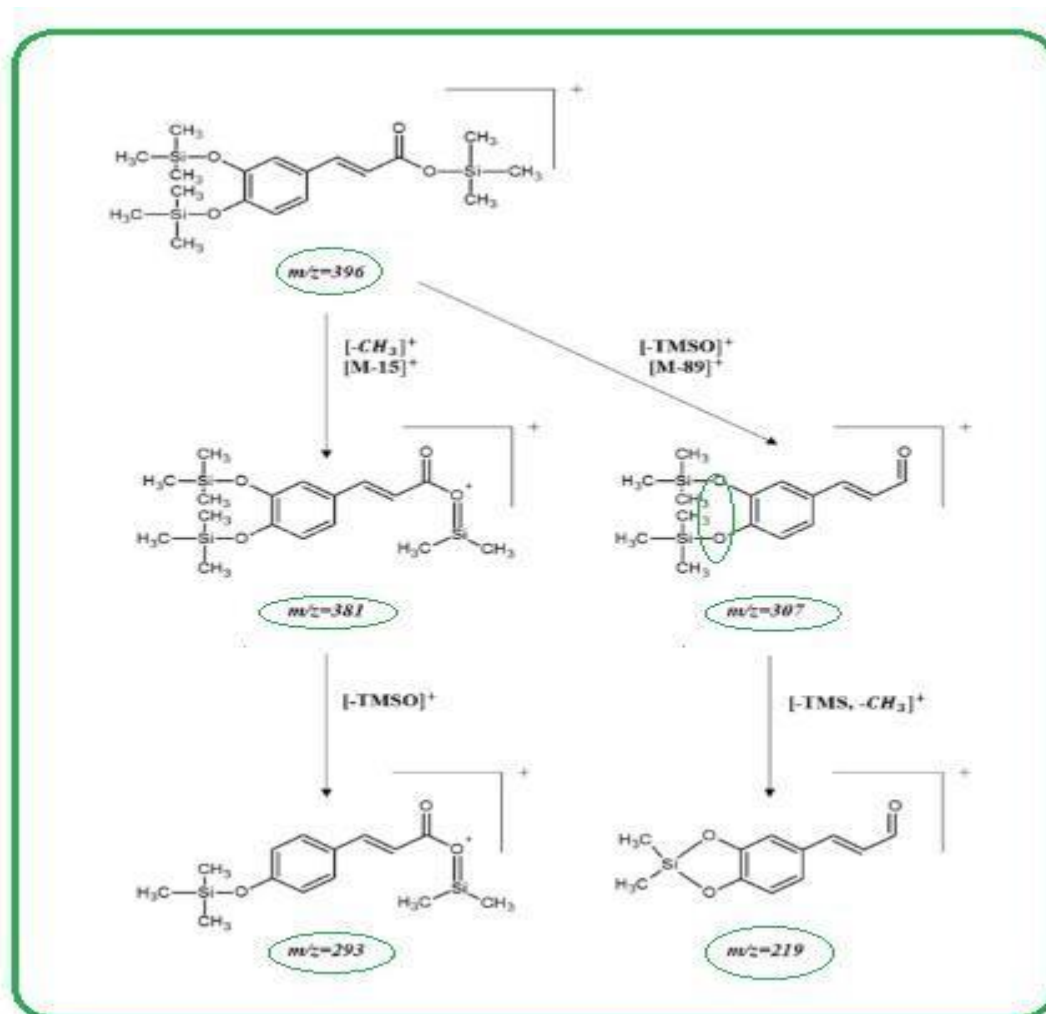


Figure III.9 Schéma de la décomposition de l'acide Caféique [10].

III.2.74 Identification du composé

L'analyse du spectre de masse du dérivés TMS du composé 5 nous a permis d'identifier une structure correspondante à la catéchine (5TMS) représentée dans (Figure III.10). La fragmentation de masse du composé 5 se trouve dans certaines banques de données tel que : MassBank, NIST Chemistry WebBook, Human Base de données du métabolome, et Golm Metabolome. Les processus de fragmentations sont décrits dans la littérature [11,12] comme suit :

- L'ion à 560 m/z, $[M-HOSi(CH_3)_3]^+$ est produit par l'élimination de la molécule neutre HO-TMS après transfert de H.
- La formation de l'ion à 368 m/z (pic de base) est initialisée par localisation de la charge positive sur l'oxygène, liée au cycle oxane, suivi de deux fissions de liaison d'oxane.
- L'ion à 383 m/z est produit par un mécanisme similaire impliquant le transfert d'un groupe CH_3 de $Si(CH_3)_3$ au cycle phényle à la place du radical, formé après la fission de la liaison C-O.

L'ion à 355 m/z est produit à partir de l'ion 383 m/z par une élimination de la molécule neutre CO.

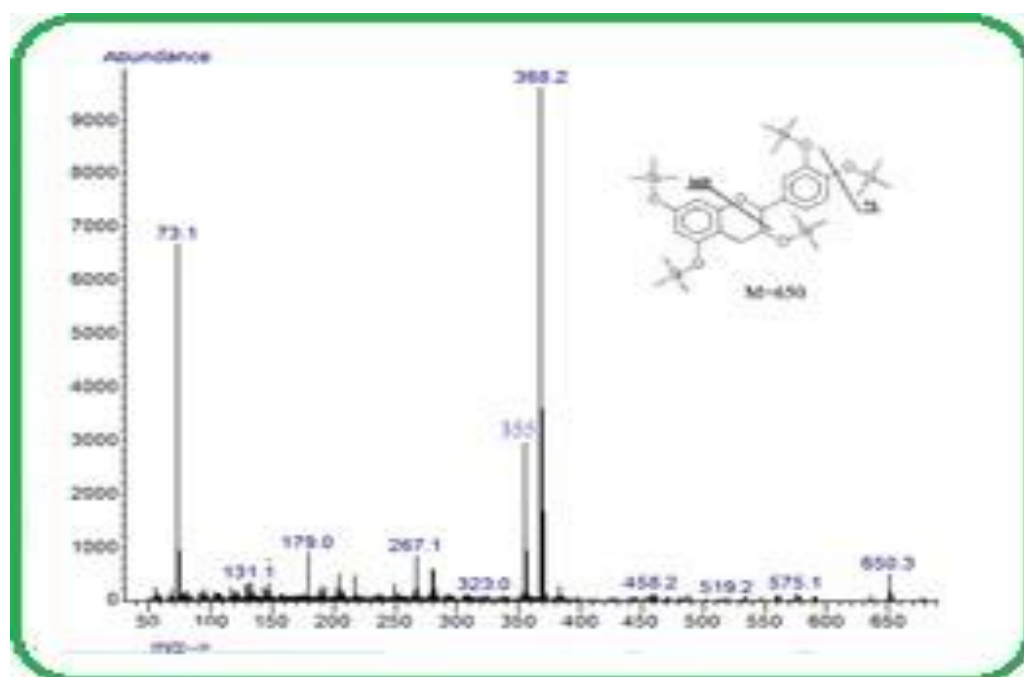


Figure III.10 Spectre de mass du composé 5

III.2.75 Identification du composé

Le spectre de masse de l'acide ellagique (**Composé 6**) a montré des signaux : à 590, 575 et 487 m/z, correspondant à M^+ , $[M - CH_3]^+$ et $[M - CH_3 - Si(CH_3)_4]^+$, respectivement. Les structures de ces ions sont représentées dans les Figures III.11 et III.12.

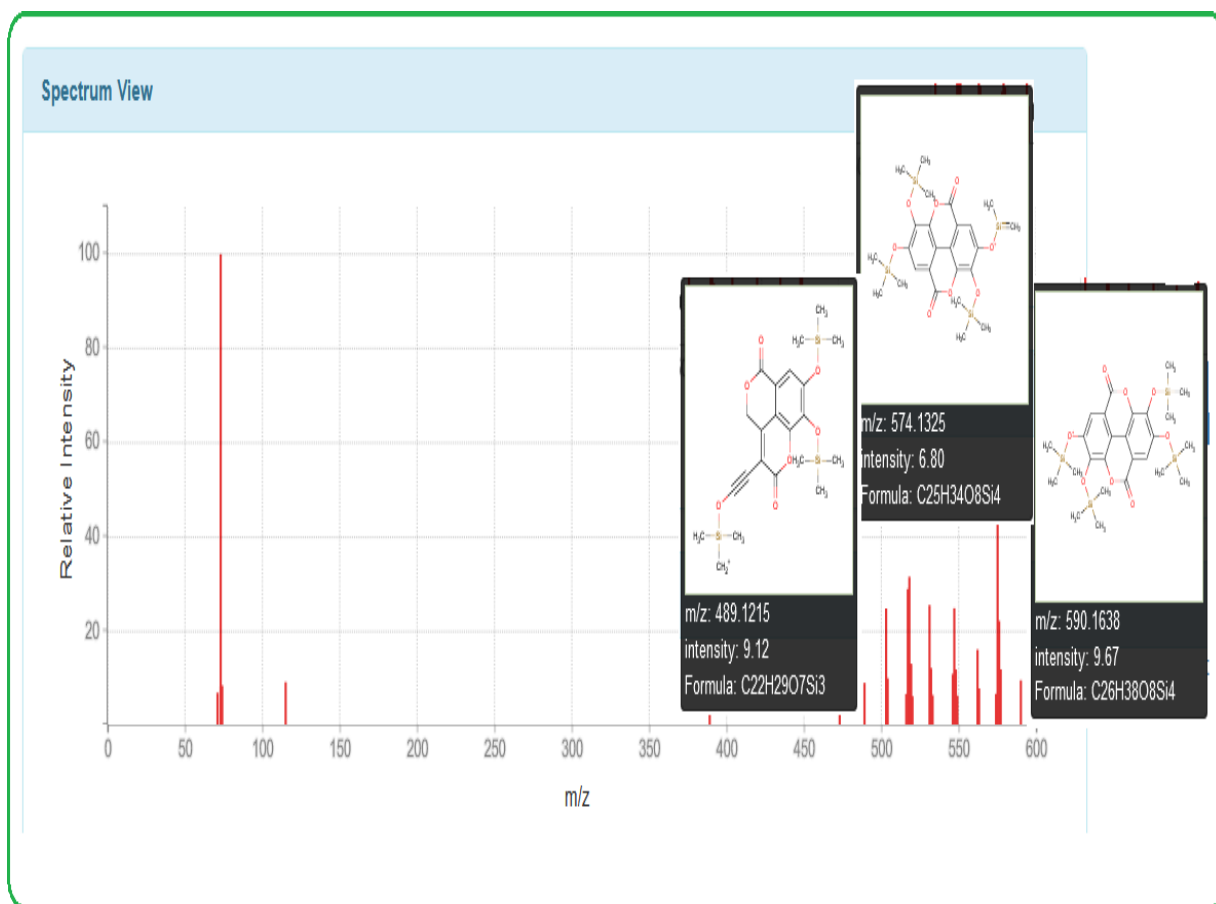


Figure III.11 Spectre de masse de l'acide ellagique / base de données FOODB [13]

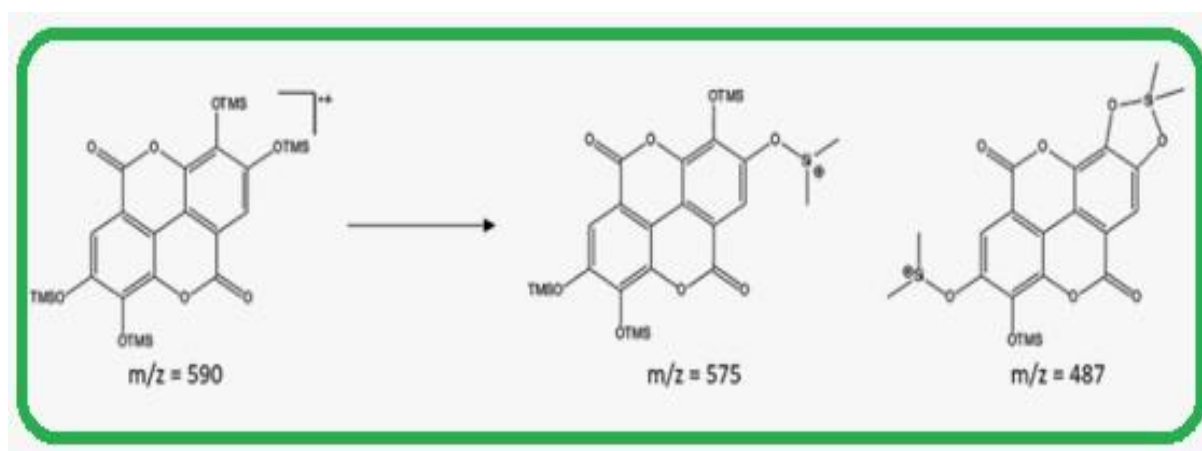


Figure III.12 Schéma de la décomposition de l'acide ellagique [14]

III.3 Identification structurale par RMN ¹H

Une première déréplication, suivi par fractionnement bioguidé visant l'identification des métabolites potentiellement bioactifs. Cette méthode apporte des informations complémentaires à l'analyse phytochimique classique. La combinaison des différentes données obtenues des techniques GC/MS, HPLC-MS avec RMN ainsi que l'utilisation des plateformes des bases de données nous a permis d'obtenir des informations précises des structures des métabolites, sujet d'isolement.

Le premier choix de notre étude était la fraction F3 de l'extrait exsudat de la plante *C.clusii* basé sur les résultats des tests bioactifs, des informations préliminaires et les résultats de la composition chimique des matrices complexes des extraits par GC/MS HPLC-MS et CCM. Cette fraction montre une forte activité anti microbienne contre *S. aureus* et *Candida albicans*.

Après l'étude de la fraction biologiquement active par GC/MS on a procédé à une purification qui a mené à l'isolement des composés : P1, P2 et P3

III.3.1 Identification structurale du composé P1.

L'identification la structure de notre composé qui est **l'acide trans-cinnamique** a été basée sur l'analyse spectrale par RMN ¹H (Figure III.13), RMN ¹³C (Figure III.14) et les fragments de masse de la fraction analysée par GC/MS du composé, en outre la comparaison avec la littérature [15] et la base de données RMN [16].

Tableau III.4 Comparaison des déplacements chimiques de l'acide trans-cinnamique.

H	P1 (400 MHz, DMSO)		(300 MHz, CDCl ₃) [15]	
	N° H	δ _H (ppm) (multiplicity, J (Hz))	N° H	δ _H (ppm) (multiplicity, J (Hz))
OH	-	-	-	-
2	1	6.51 (<i>d</i> , 16)	1	6.4 (<i>d</i>, 15.9)
3	1	7.6 (<i>d</i> , 16)	1	7.82 (<i>d</i>, 15.9)
2'/6'	2	7.35-7.44 (<i>m</i>)	2	7.65-7.54 (<i>m</i>)
3'/4'/5'	3	7.65-7.73 (<i>m</i>)	3	7.5-7.36 (<i>m</i>)

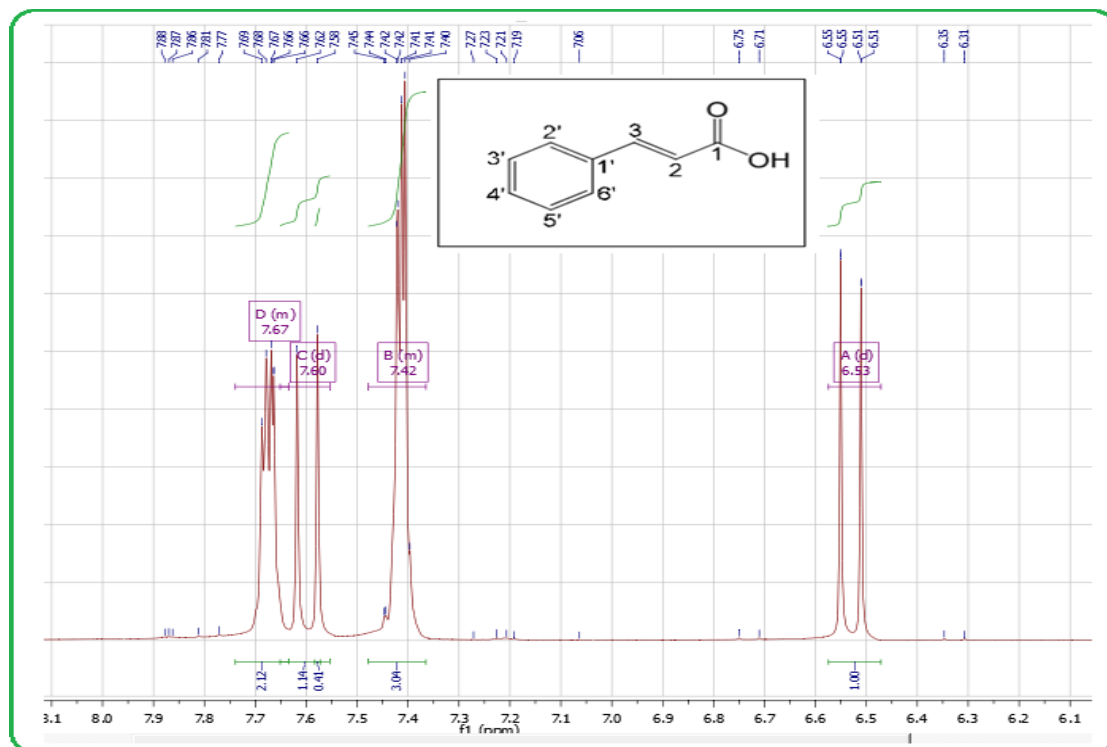


Figure III.13 Spectre RMN ¹H du produit P1

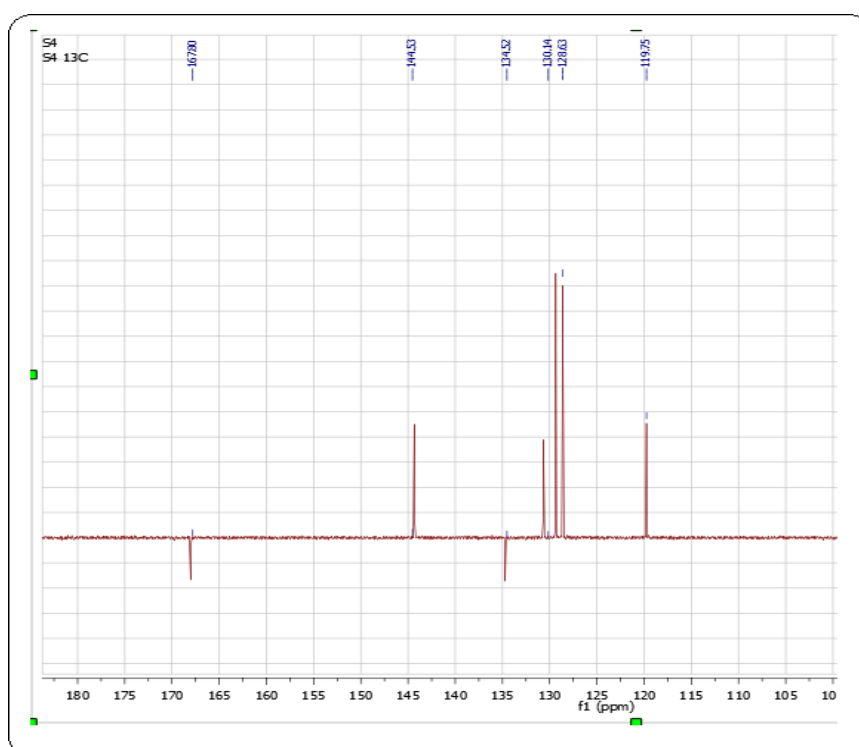


Figure III.14 Spectre RMN ¹³C du produit P1.

Résultats et Discussion

Tableau III.5 Comparaison des déplacements chimiques du ^{13}C de l'acide trans-cinnamique

C	P1 (100 MHz, DMSO)	(75 MHz, CDCl_3) [15]
N° C	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)
1	167.8	167.6
2	119.7	119.3
3	144.5	144.0
1'	134.5	134.3
2'/6'	128.6	128.2
3'/5'	128.9	128.9
4'	130.1	130.2

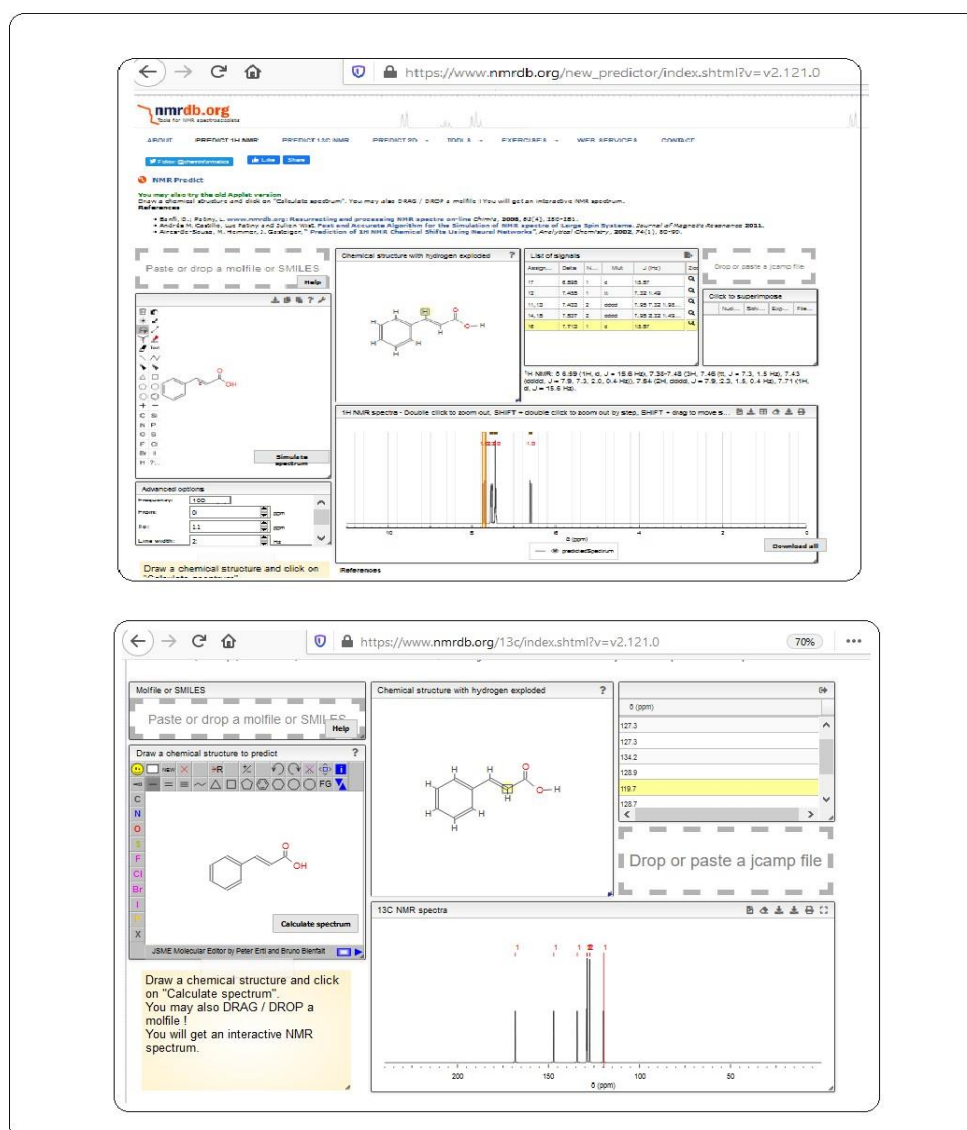
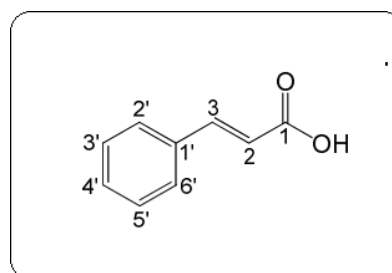


Figure III.15 Identification du composé P1 / base de données RMN [16].

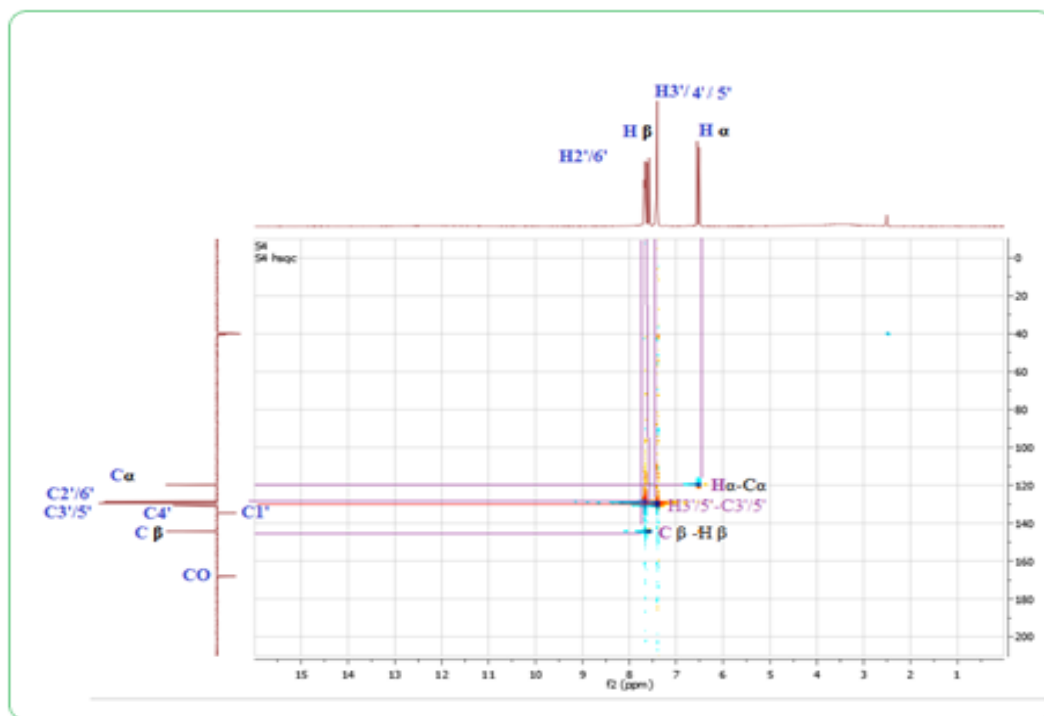


Figure III.16 Spectre HSQC du composé P1.

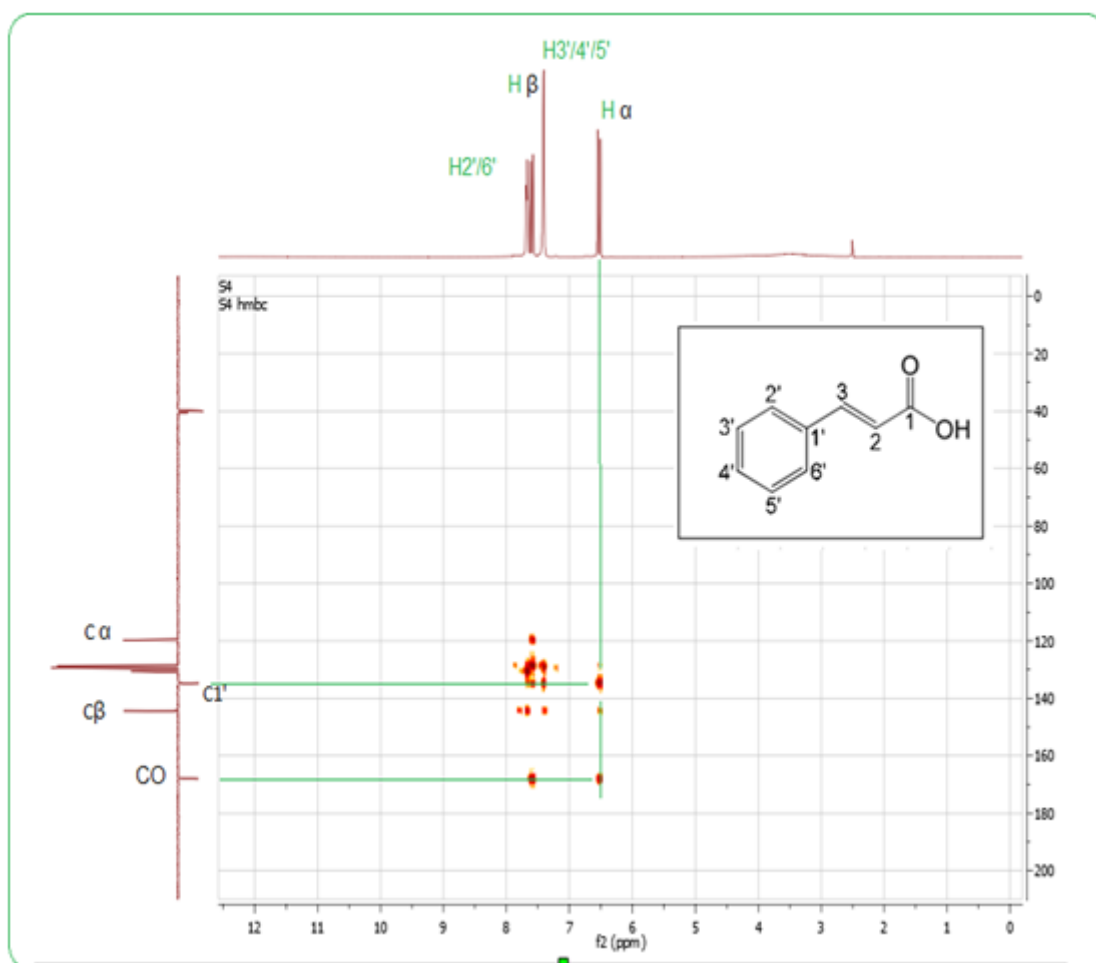


Figure III.17 Spectre HMBC du composé P1.

III.3.2 Identification structurale du P2

Le produit a été isolé sous forme de poudre blanche avec une masse de 12 mg. L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C nous a permis de déterminer la structure du composé, en se basant aussi sur la comparaison des données spectrales avec celles trouvées dans la littérature et les bases de données accessibles sur internet [17]. Cette comparaison montre une bonne concordance au niveau de tous les déplacements chimiques. Ce qui nous a permis de proposer la structure de l'acide 4-hydroxy benzoïque (Tableau III.6).

Tableau III.6 Comparaison des déplacements chimiques de l'acide 4-hydroxy benzoïque.

H		P2 (400 MHz, DMSO)		(400 MHz, DMSO) [17]	
N° H	δ_{H} (ppm)	(multiplicity, J (Hz))	N° H	δ_{H} (ppm)	(multiplicity, J (Hz))
	-	-	-	-	-
2,6	2	7.81 (<i>d</i> , 8.0)	1	7.78 (<i>d</i> , 8.0)	
3,5	2	6.8 (<i>d</i> , 8.0)	1	6.82 (<i>d</i> , 8.0)	
4(-OH)	1	10.19 (<i>S</i>)	2	10.21 (<i>S</i>)	
7(-COOH)	1	12.38 (<i>S</i>)	3	12.41 (<i>S</i>)	

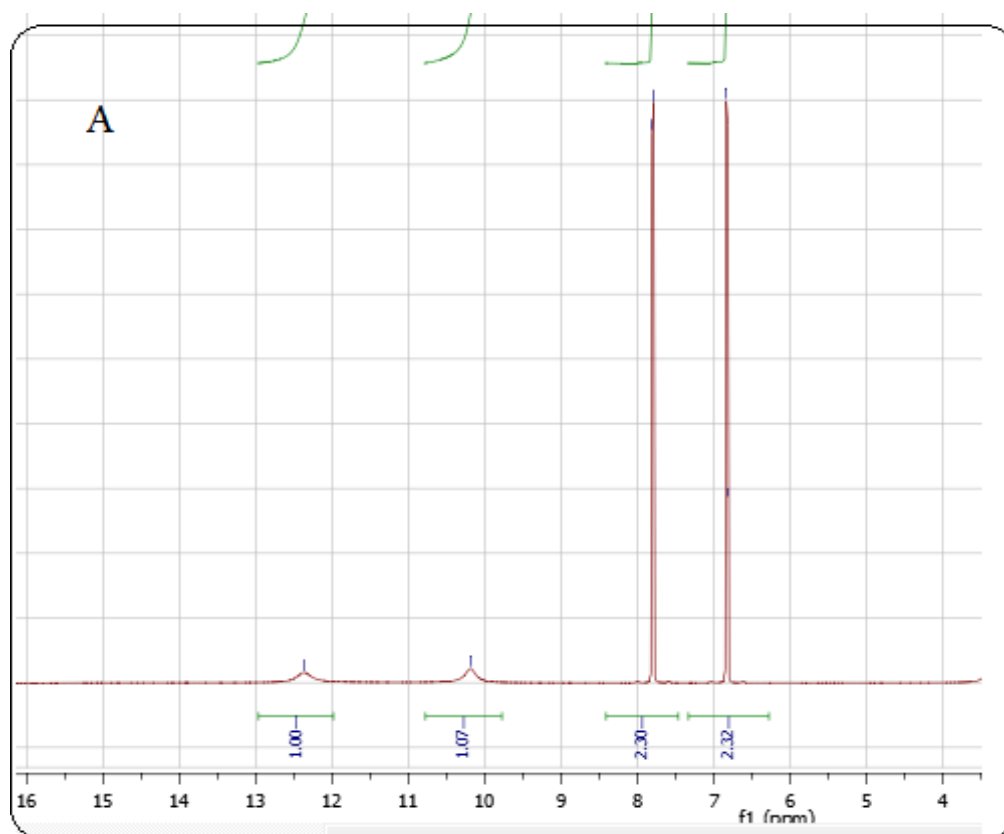


Figure III.18 Spectre RMN du composé P2

Résultats et Discussion

Suite à une étude bibliographique nous avons comparé les données spectroscopiques du ^{13}C de notre composé avec les données reportées dans la bibliographie ; cette comparaison est récapitulée dans le (Tableau III.7)

Tableau III.7 Comparaison des déplacements chimiques de l'acide 4-hydroxy benzoïque

N° C	P1 (100 MHz, DMSO) (100 MHz, MSO)	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
7	167.6	167.2
4	162.0	162.1
2,6	132.2	132
1	121.8	121.8
3,5	115.5	115.6

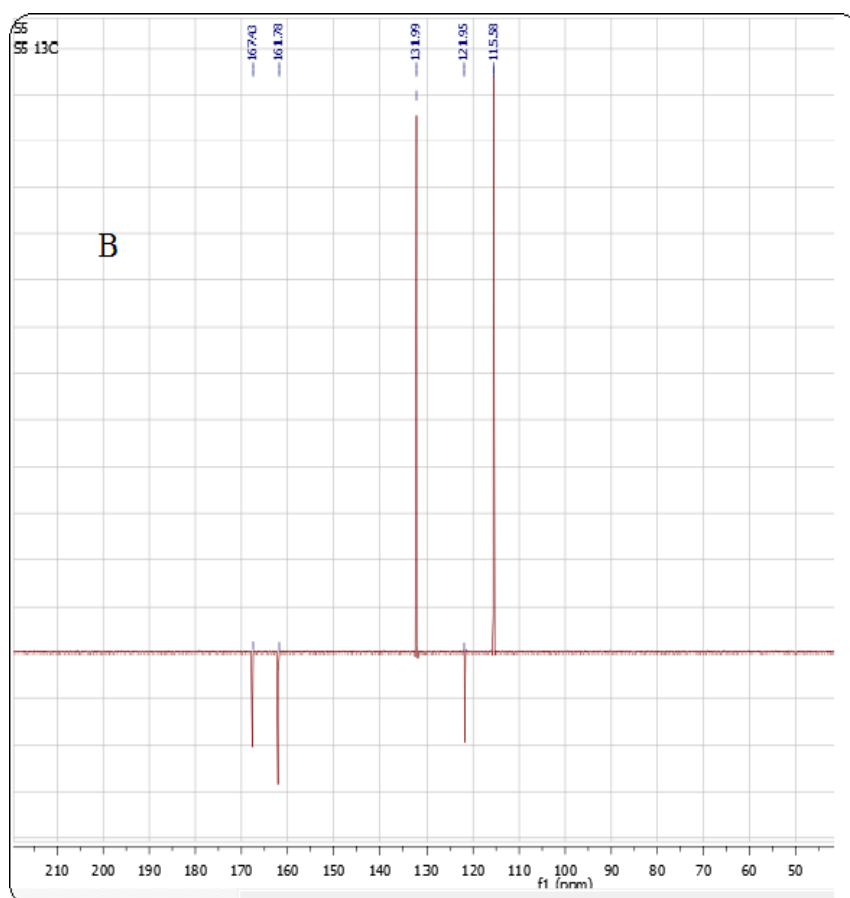
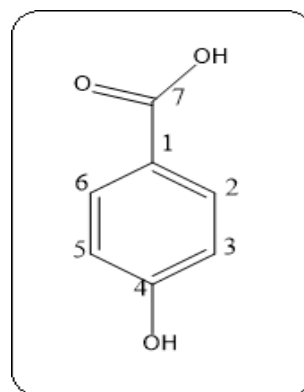


Figure III.19 Spectre ^{13}C du composé P2

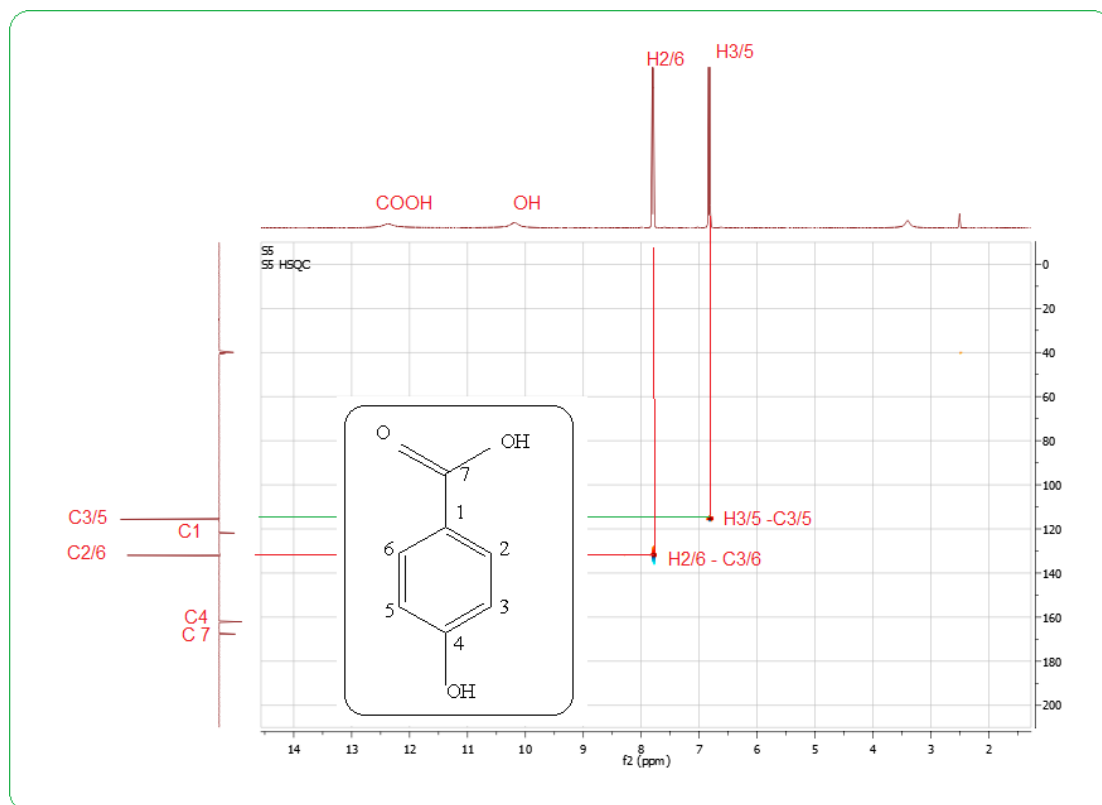


Figure III.20 Spectre HSQC du composé P2

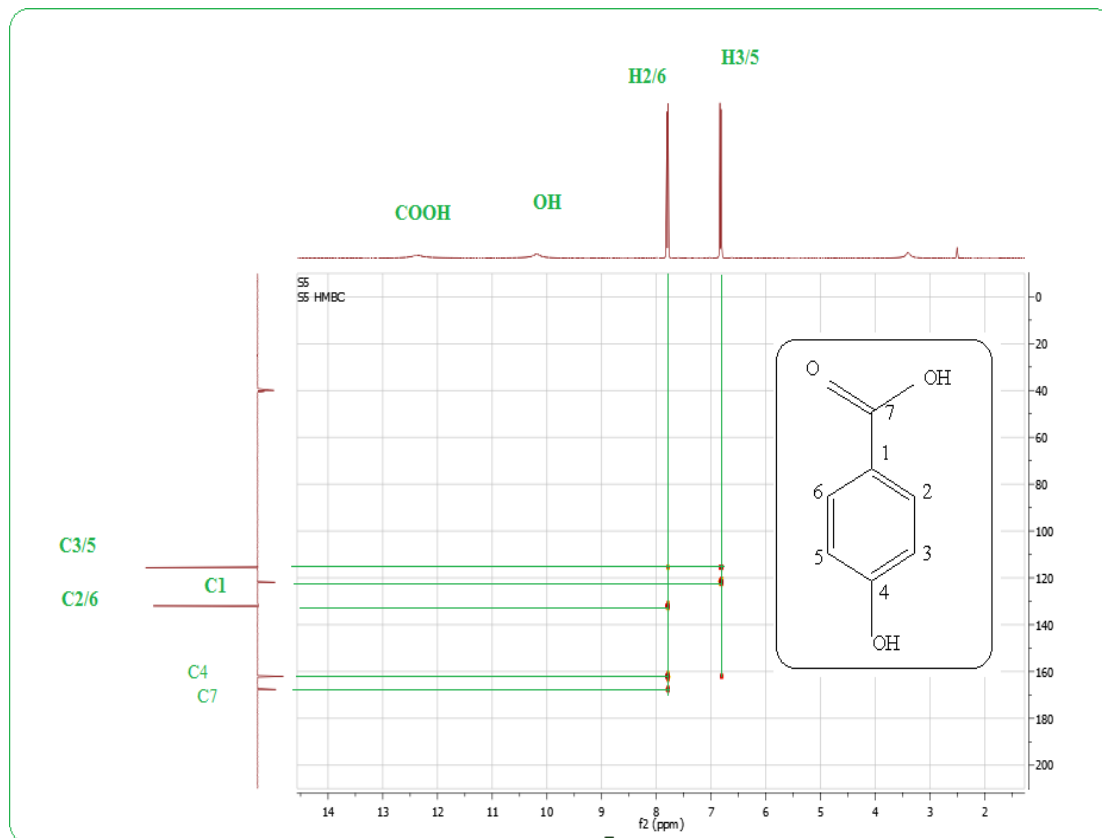


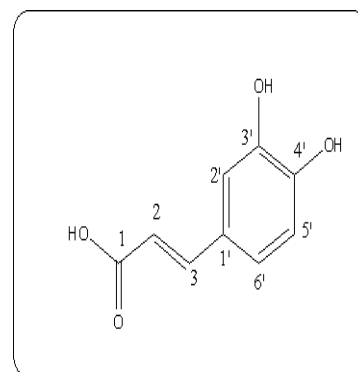
Figure III.21 Spectre HMBC du composé P2

III.3.3 Identification structurale du P3

Le produit a été isolé sous forme de poudre jaune avec une masse de 10 mg, son spectre de RMN ^1H à 400 MHz est réalisé dans le DMSO deutéré (Tableau III.8). Les déplacements chimiques ainsi que les constantes de couplages ont été comparées avec la littérature [17] (Tableau III.8).

Tableau III.8 Déplacements chimiques du composé P3.

N° H		J (Hz) [17]	N° H		J (Hz) P3
6.7	H-5'(d)	8.0	6.76(d)	08	
6.9	H-6'(dd)	8.0/2.0	6.69(dd)	8.0/2	
7.01	H-2'(d)	2.0	7.02(d)	2.0	
6.16	H-2(d)	16.0	6.17(d)	16.0	
07.42	H-3(d)	15.8	7.41(d)	16.0	
09.10	3'-OH (S)	-	9.15(S)	-	
09.46	4'-OH (S)	-	9.52(S)	-	
12.06	H-1 (S)	-	12.10(S)	-	



Une comparaison avec la littérature des données spectroscopiques en RMN ^{13}C de notre composé P 3 avec celles de l'acide caféique est résumé dans le Tableau III.9

Tableau III.9 Comparaison des déplacements chimiques du ^{13}C du composé P3.

δ	C de l'acide caféique	δ	C de P 3
168.3		168.3	
148.6		148.5	
115.1		115.0	
126.2		126.1	
115.6		115.5	
145.0		145.0	
146.0		146.0	
116.2		116.2	
121.6		121.6	

Cette comparaison confirme une bonne concordance au niveau de tous les déplacements chimiques. Ce qui nous a permis de proposer la structure de l'acide caféique à notre composé P3 (Figure III.22).

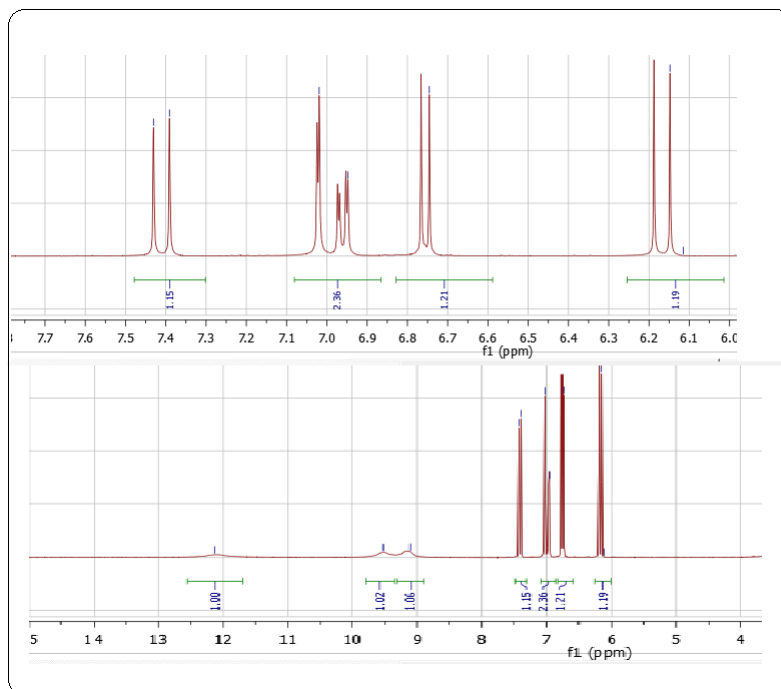


Figure III.22 Spectre RMN ^1H du composé P3

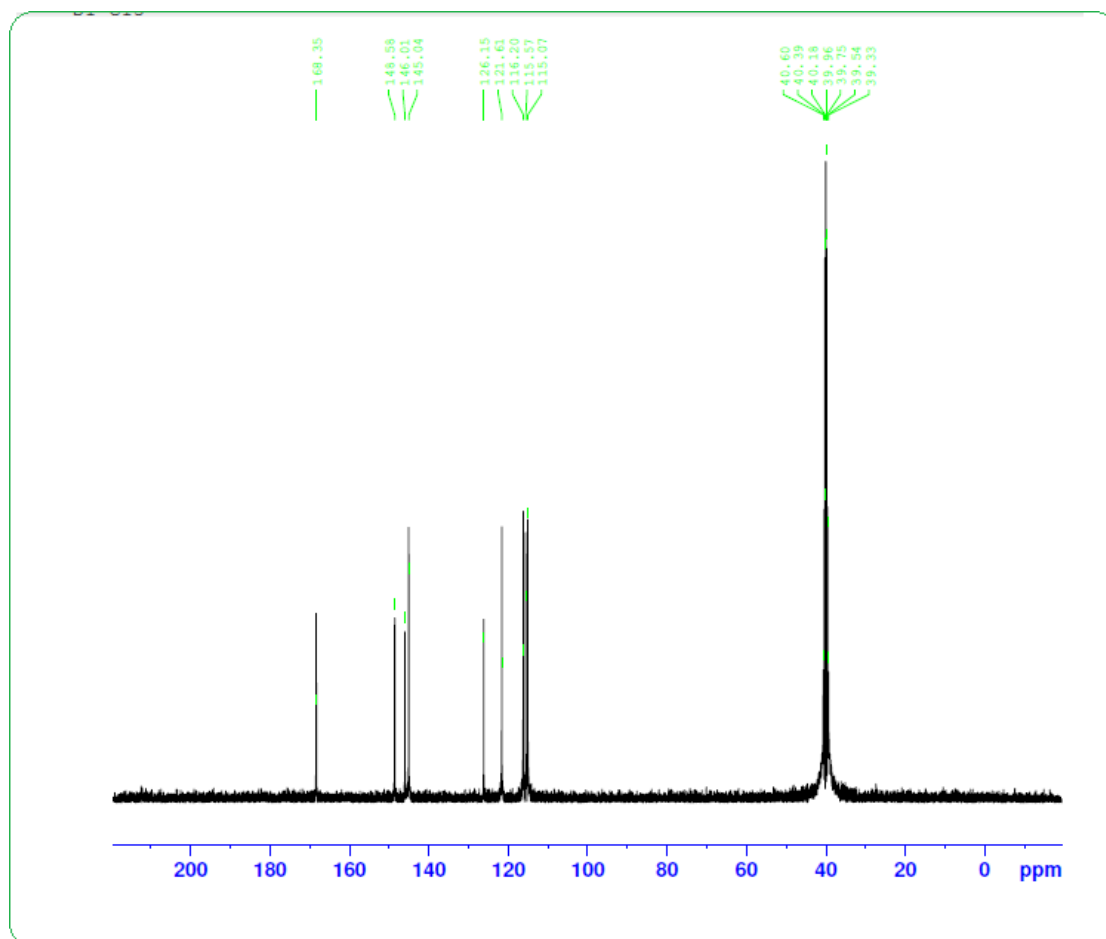


Figure III.23 Spectre RMN ^{13}C du composé P3

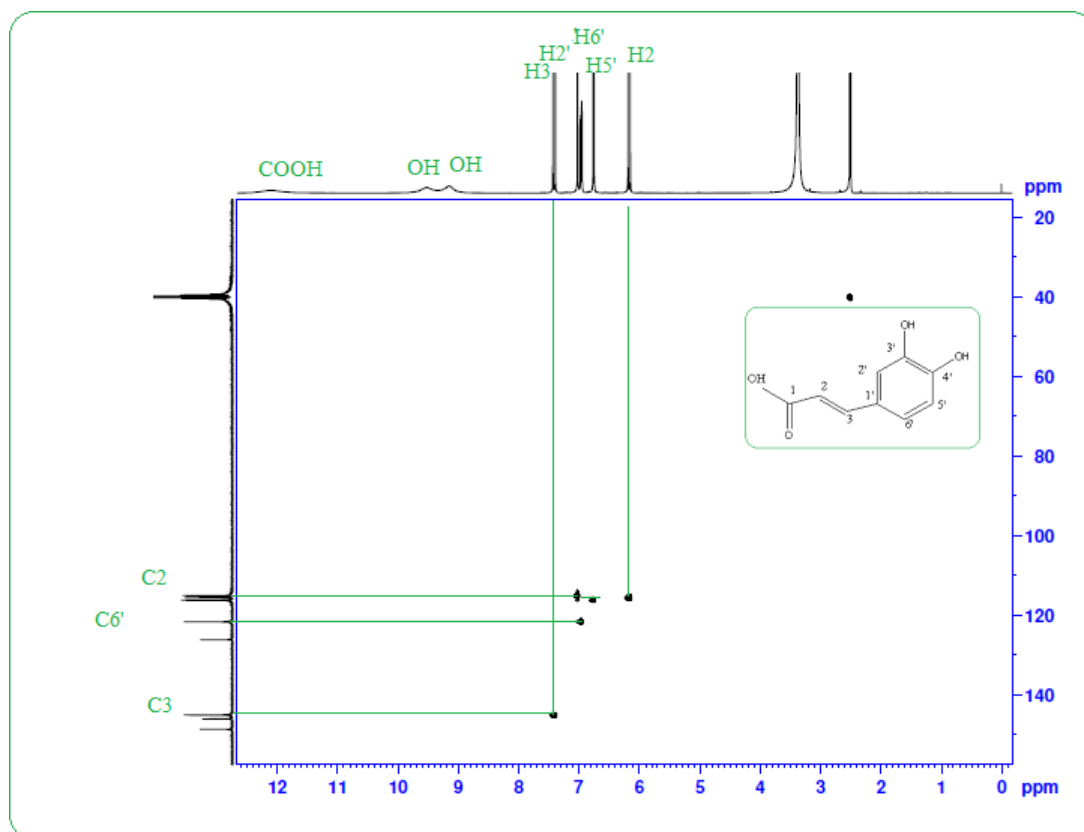


Figure III.24 Spectre HSQC du composé P3

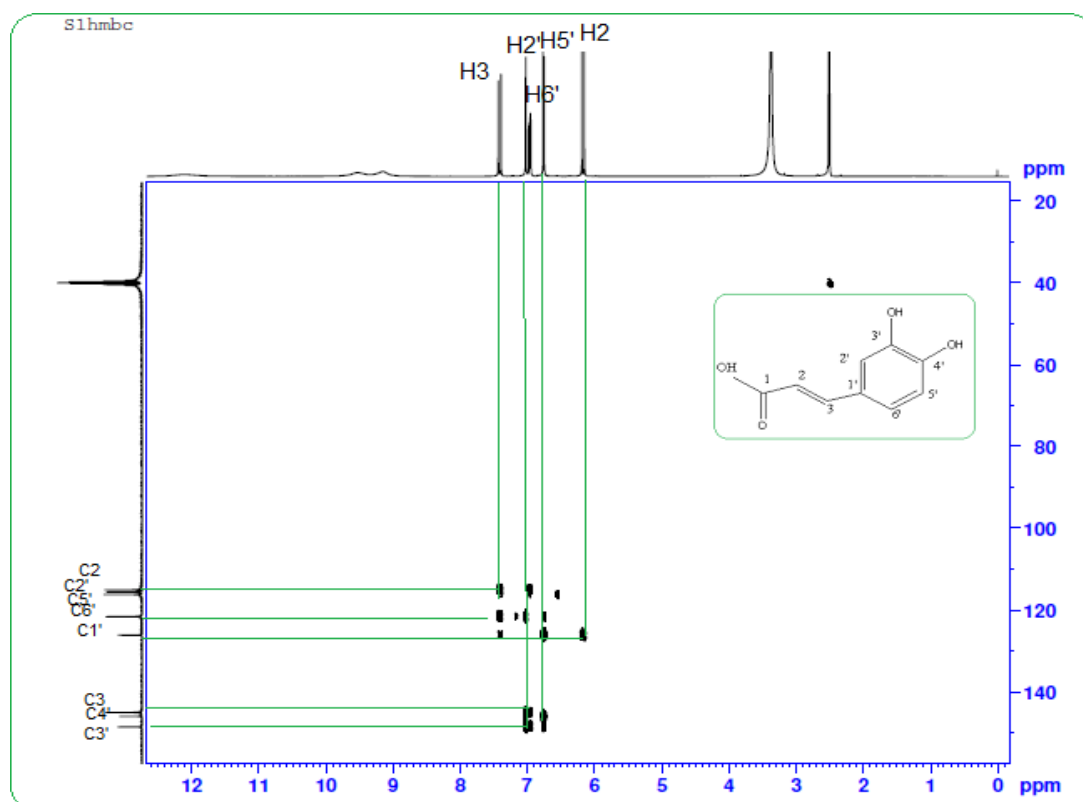


Figure III.25 Spectre HMBC du composé P3

III.4 Analyse de l'extrait aqueux de l'espèce *C. clusii* par LC/MS

Dans le but d'une valorisation de l'usage de cette plante dans le cadre d'une phytothérapie, nous avons entrepris le choix de l'étude de l'extrait aqueux comme forme habituelle d'administration orale.

La méthode de déréplication apporte des informations complémentaires pour une bonne caractérisation phytochimique. Cette approche nous a permis de mettre en évidence les molécules déjà isolées et identifiées de cette plante.

Après une extraction aqueuse des feuilles de *C. clusii* suivit par une lyophilisation, le profil chimique de l'extrait (Eaqcc) a été déterminé par la technique UHPLC-DAD-ESI-MSn.

Le profil chromatographique à différentes longueurs d'onde : à 280, 320 et 360 nm montre la présence de 14 composés (Figure III.26)

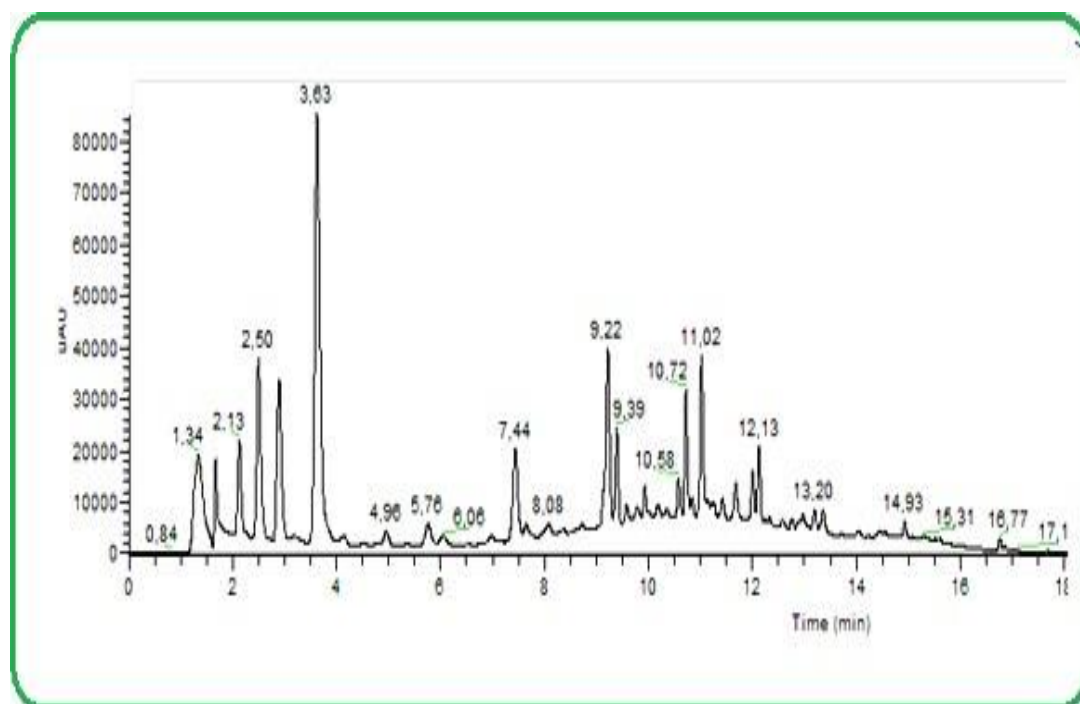


Figure III.26 Chromatogramme de l'extrait aqueux de *C. clusii*

Le Tableau III.10 présente les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés et leurs hypothèses structurales, ainsi que la nature de chaque composé phénolique identifié dans l'extrait aqueux de *C. clusii*, les ions moléculaires et les ions fils issus des différentes fragmentations.

Tableau III.10 Profil chimique de l'extrait aqueux de *C. clusii*.

N° du Composé	[M-H] ⁻	MS/MS	Nom du composé
1	[133]	115, 89,71	L'acide malique
2	[331]	313,271, 211, 193, 169	Monogalloylglucose
3	[781]	601,301	Punicaline
4	[169]	125, 107,79	L'acide gallique
5	[315]	225, 153, 109	Gentisoil glucoside
6	[1083]	781,601,301	Punicalagine
7	[1083]	781,601,301	Punicalagine isomère
8	[285]	153, 109	Uralennéoside
9	[1251]	1083	Punicalagin gallate
10	[301]	257 229 185	L'acide ellagique
11	[609]	301,309	rutine
12	[593]	285 257, 179, 151	Lutéolin-7-O-rutinosose
13	[623]	315, 300, 271	Isorhamnetin-3-O-rutinoside
14	[477]	315,357	Isorhamnetin3-glucoside

III.4.1 Identification structurale du Composé 1

L'acide malique (pic 1) apparaît en premier, avec un ion précurseur de masse 133 m/z ([M-H]⁻) et des ions fils 115, 89 et 71 m/z.

L'ion fils 115 m/z ([M-H-18]⁻) provient d'une perte d'une molécule H₂O, et l'ion 89m/z est le résultat d'une perte d'une molécule CO₂ (44 uma) (Figure III.27). L'identification de cette molécule a été aussi confirmée par une comparaison des fragments MS avec ceux trouvés dans la bibliographie et les bases de données accessibles sur net [18].

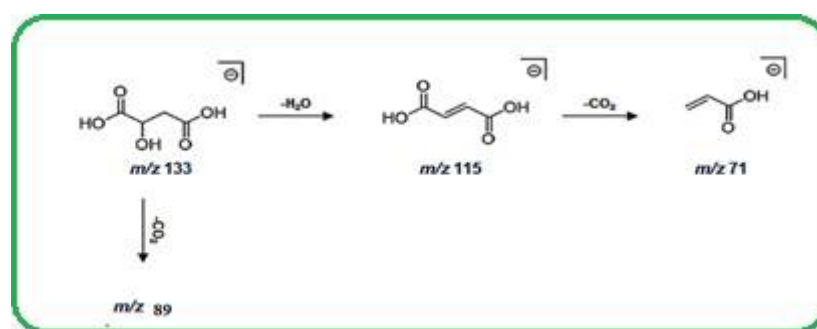


Figure III.27 La fragmentation MS/MS du composé 1 [18]

III.4.2 Identification structurale du Composé 2

Le composé 2 a été identifié comme étant monogalloylglucose. En effet, une comparaison des fragments MS/MS avec les données de la littérature (Figure III.28) [19], et la base de données (FoodDB) (Figure III.29) nous a permis d'interpréter le mécanisme de fragmentation en mode négatif de la molécule comme suivants :

Résultats et Discussion

- ✓ Le fragment de masse à 313 m/z est le résultat de la perte d'une molécule H₂O [M - H - 18]⁻ m/z
- ✓ Le fragment de masse à 271 m/z provient de l'élimination de deux groupements (CH₂O) du glucose [M - H - 60]⁻ m/z.
- ✓ Le fragment de masse à 211 m/z est le résultat d'une perte de quatre groupement CH₂O [M - H - 60 - 60]⁻ m/z
- ✓ Le fragment de masse à 193 m/z provient d'une élimination de quatre groupement CH₂O et une molécule d'eau H₂O [M - H - 2 × 60 - 18]⁻ m/z
- ✓ Le fragment de masse à 169 m/z est le résultat d'une élimination d'une unité glucose [M - H - 162]⁻

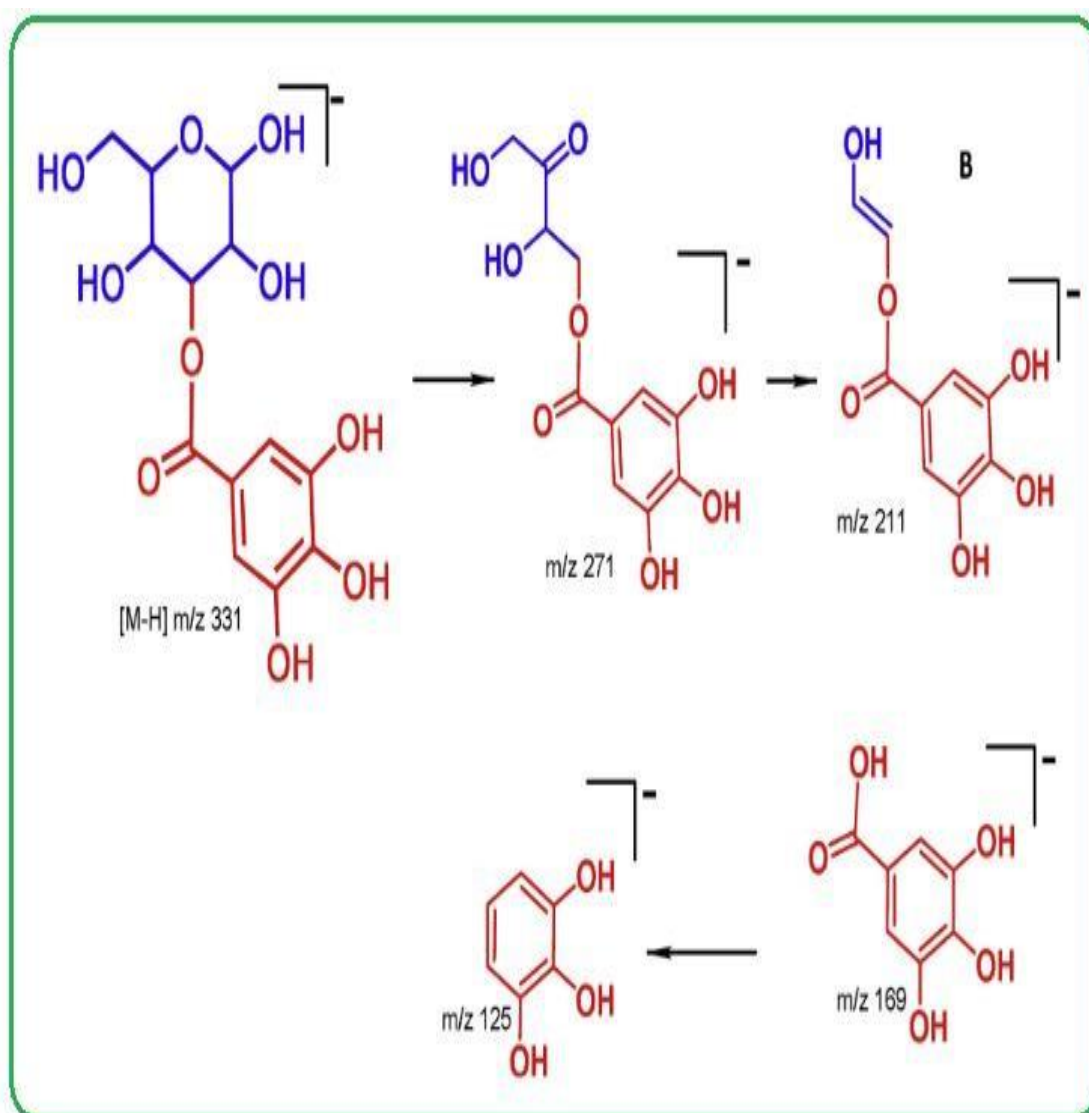


Figure III.28 Mécanisme de fragmentation de monogalloylglucose [20]

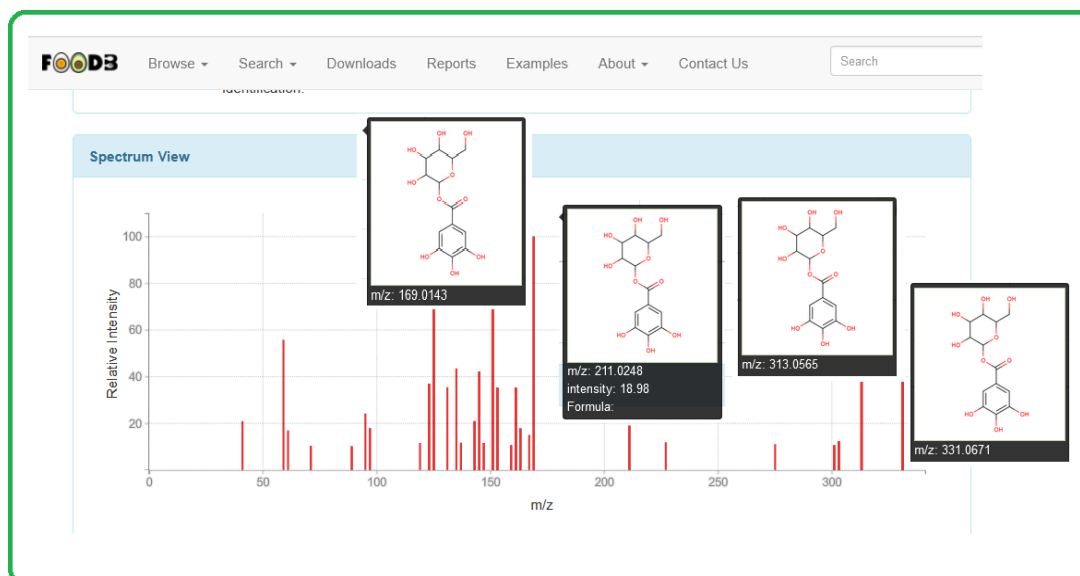


Figure III.29 Mécanisme de fragmentation de glucogalline / base de données FoodDB

III.4.3 Identification structurale du Composé 3

Le composé **3** présente un ion pseudo moléculaire à 781 m/z, et des fragments en MS/MS à 601 et 301 m/z correspondant à la formule $C_{34}H_{21}O_{22}$. Une comparaison avec les données rapportées par la littérature [21], nous a permis d'identifier le composé **3** comme étant punicaline.

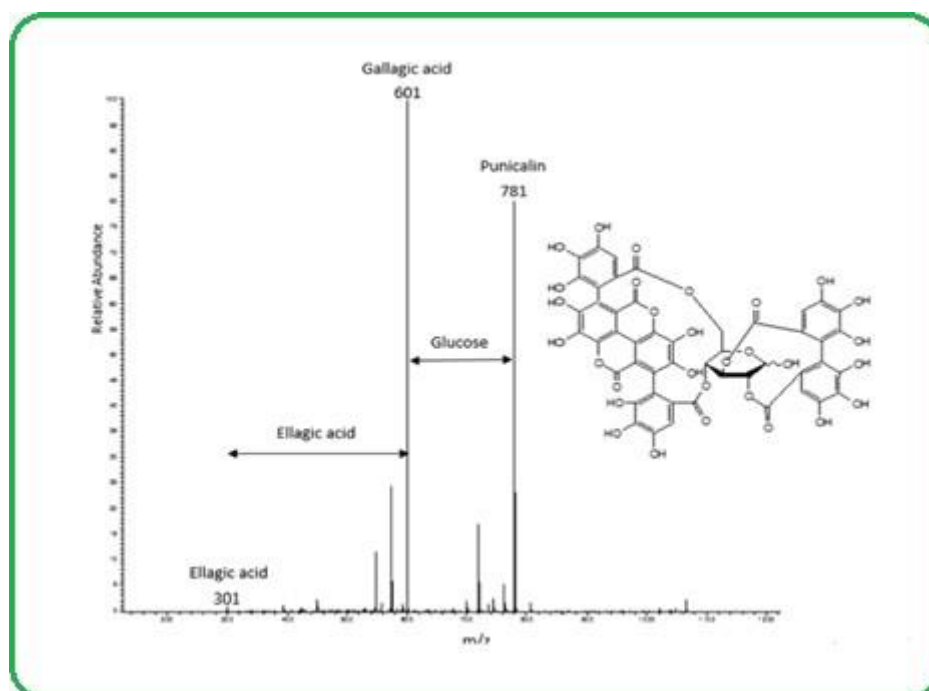


Figure III.30 Spectre de masse de punicaline [22]

III.4.4 Identification structurale du Composé 4

Le composé **4** présente un ion pseudo moléculaire à 169 $[M - H]^-$ m/z. Il a été identifié comme étant l'acide gallique en se basant sur la comparaison des fragments de mass avec les données issues de la bibliographie.

- ✓ Le fragment de masse à 125 m/z est le résultat de la perte d'une molécule CO_2 $[M - H - 44]^-$ m/z
- ✓ Le fragment de masse à 107 m/z provient d'une perte d'une molécule de CO_2 et une molécule d'eau H_2O $[M - H - 44 - 18]^-$ m/z
- ✓ Le fragment de masse à 79 m/z est le résultat de la perte des molécules : CO_2 , H_2O et CO $[M - H - 44 - 18 - 28]^-$ m/z, respectivement.

Le schéma de fragmentation de ce composé (Figure III.31) est en accord avec la fragmentation de l'acide gallique rapporté par Fathoni et al [23].

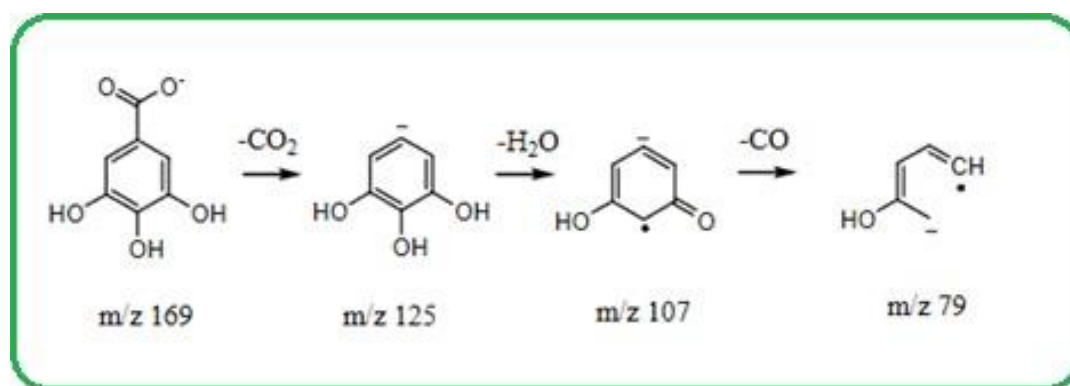


Figure III.31 Schéma de fragmentation MS de l'acide gallique [23]

III.4.5 Identification structurale du Composé 5

Le pic **5** correspond au glucoside de gentisoil, avec un profil MS/MS des ions : à 315, 153 et 109 m/z résultant de la perte successive des unités : glucose et CO_2 [24].

III.4.6 Identification structurale des Composé 6 et 7

Les pics 6 et 7, à 1083 m/z, ont été identifiés comme étant punicalagine α et punicalagin β . Trois fragments à 781, 601 et 301 m/z ont été trouvés [24,25], ils résultent du clivage de la punicalagine, qui produit successivement de la puniecaline, l'acide gallique et l'acide ellagique. Cette fragmentation se concorde avec celle proposée par Seeram et al. (2005)

III.4.7 Identification structurale du Composé 8

Le spectre de masse en mode négatif du composé **8** montre un ion quasi-moléculaire 285 $[M-H]^-$ m/z. La fragmentation MS/MS de l'ion 285 $[M-H]^-$ génère des ions fils à 153 et 109

m/z (Figure III.32), indiquant la perte successive d'une unité xylose et de CO₂. Une Comparaison avec les fragments cités dans la bibliographie et à la base de données (hmdb) a confirmé la structure de l'uralennéoside (C₁₂H₁₄O₈) [25,26].

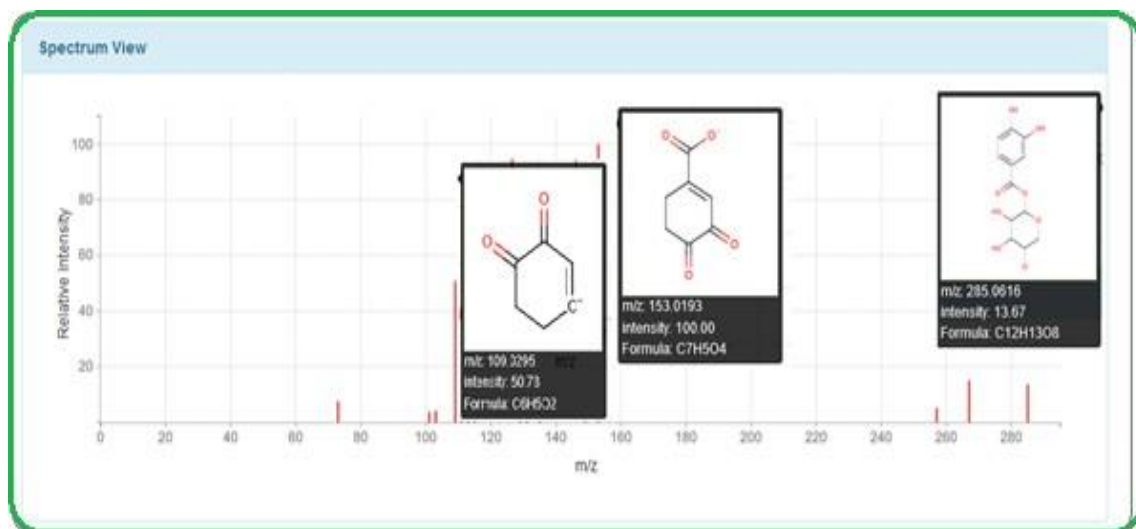


Figure III.32 Identification du composé 8 / base de données Hmdb [26]

III.4.8 Identification structurale du Composé 9

Le pic 9 (1251 [M-H]⁻ m/z) a été identifié comme étant un dérivé de la punicalagine attaché à l'acide gallique (punicalagine gallate), le fragment m/z 1083 indique la perte d'acide gallique [27,28].

III.4.9 Identification structurale du Composé 10

Le composé 10 présente un schéma de fragmentation caractéristique de l'acide ellagique avec des pertes de 44 uma (CO₂) et 28 uma (CO), respectivement. Les ions ont été détectés à partir de l'ion précurseur 301 m/z de l'acide ellagique, ce dernier produit les ions 257 [M - H - CO₂]⁻ m/z, 229 [M - H - CO₂ - CO]⁻ m/z, et 185 [M - H - 2CO₂ - CO]⁻ m/z [29].

III.4.10 Identification structurale du Composé 11

Le spectre en ESI du composé 11 montre un ion quasi-moléculaire à 609 [M - H]⁻ m/z. Sur le spectre MS/MS de l'ion précurseur, nous observons les ions fragments fils : 301 et 309 m/z. Les fragments : 301 [M - C₁₂H₂₁O₉]⁻ m/z, et 309 [C₁₂H₂₁O₉]⁻ m/z représentent les fragments de la quercétine et l'unité rutinose du composé, respectivement. En se basant sur ces données et la base de données (hmdb) on peut suggérer pour le composé une structure de la rutine (Figure III.33) [30].

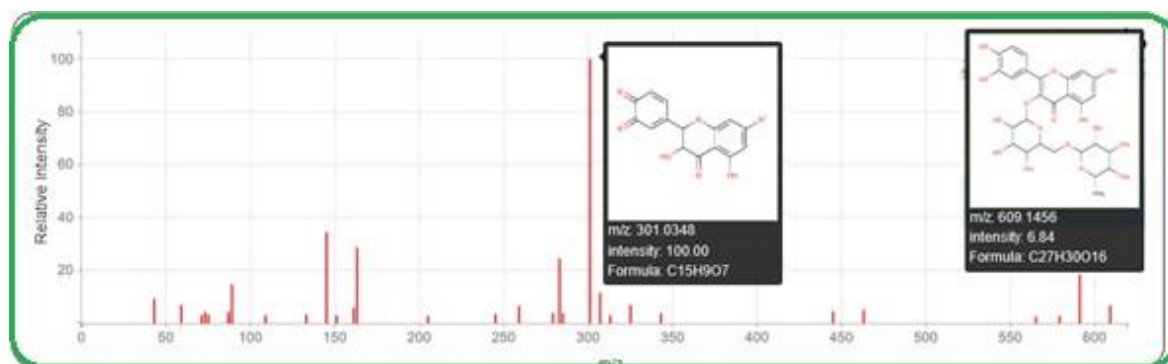


Figure III.33 Spectre de masse du composé 11 /base de données hmdb [31]

III.4.11 Identification structurale du Composé 12

Le spectre MS du pic 12 a montré un ion parent à 593 m/z et des ions fils à 285 [M - H - rutinose] - m/z, 257, 179 et 151 m/z correspondant à la lutéoline aglycone et ses ions fragments. Le composé a été identifié comme étant la lutéoline-7-O-rutinoside [32].

Le spectre de masse et le schéma de la fragmentation en mode négatif, selon la base de données hmdb, du composé 12 est présentés dans la Figure III.34.

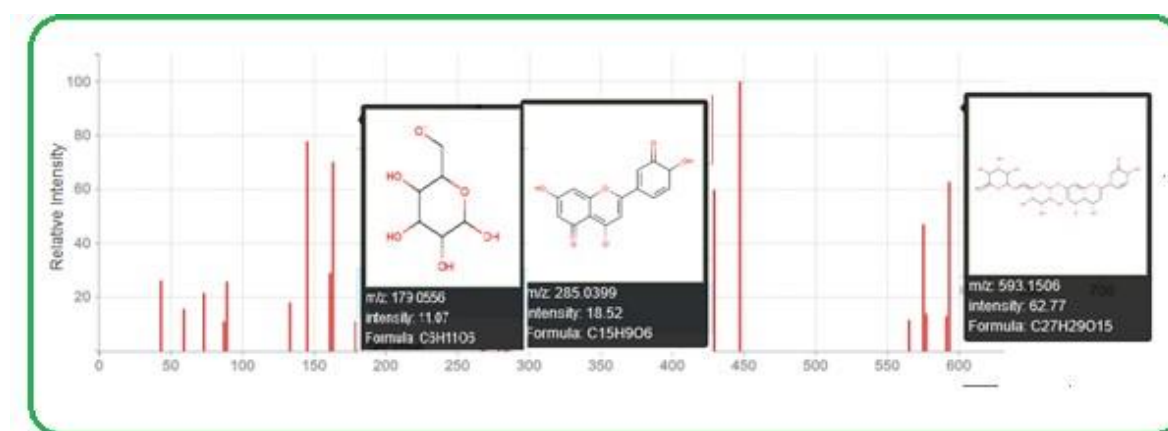


Figure III.34 Schéma de la fragmentation du composé 12 / base de données hmdb

III.4.12 Identification structurale du Composé 13

Le profil ESI/MS en mode négatif du pic 13 a révélé un pic de l'ion moléculaire déprotoné à 623 ([M-H]⁻). Son spectre MS₂ montre la présence de trois ions fils 315, 300, 285 et 271 m/z le premier ion obtenu à m/z 315 correspondant à une perte d'une unité [-glucose-rhamnose] : [M-H-162-146]. Le deuxième ion obtenu à m/z 300 résulte de la perte d'un groupement méthyle -CH₃, le troisième ion provient de la perte d'un groupement -CO₂. Par une comparaison avec

les données de la littérature (Figure III.35) [33]. Ce composé correspond à une Isorhamnetin-3-O-rutinoside.

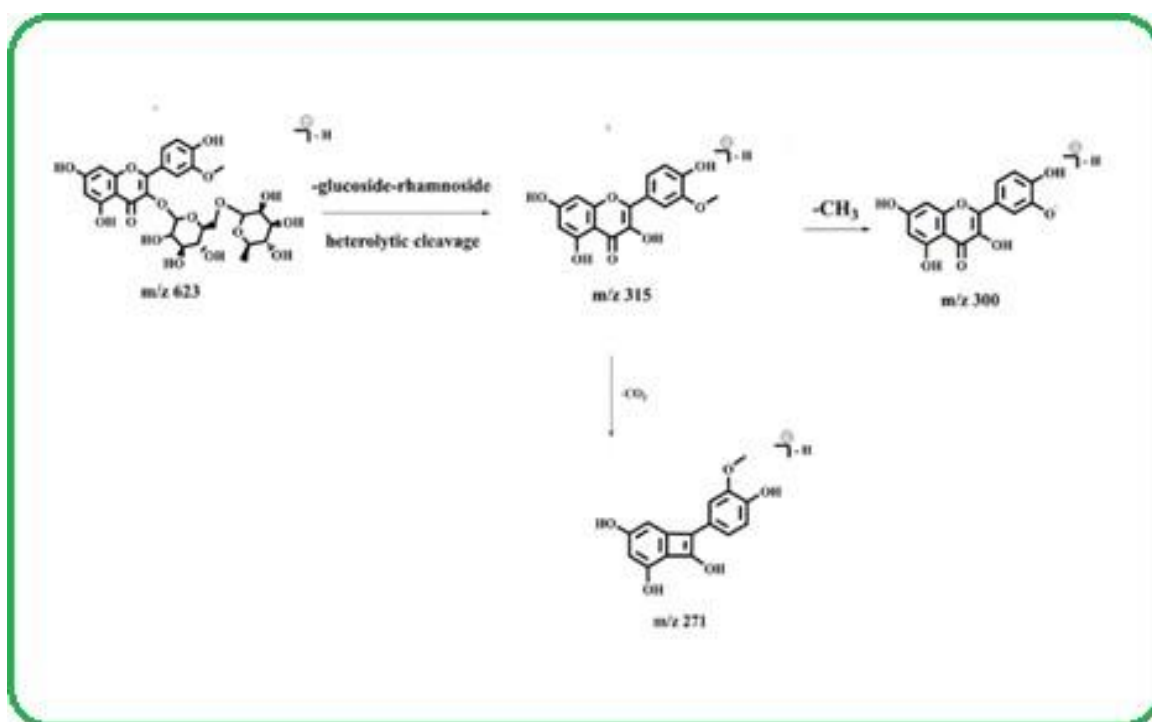


Figure III.35 Schéma de fragmentation du composé 13 [33]

III.4.13 Identification structurale du Composé 14

Le pic 14 présente un ion moléculaire à 477 m/z et des ions MS2 à 315, 357 m/z , ce composé a été identifié comme isorhamnetin-3-O-glucoside. La Figure III.36 illustre le schéma de fragmentation de ce composé proposé par Le-yue Du et al. [34].

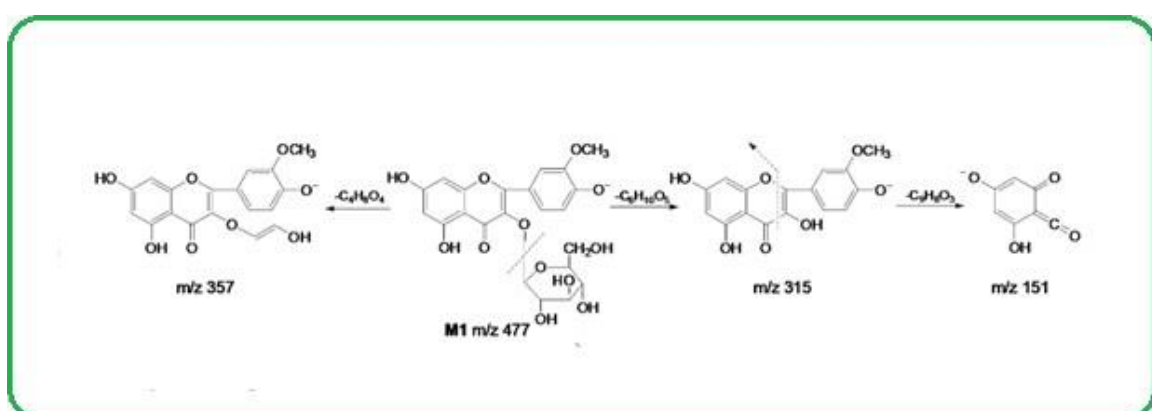


Figure III.36 Schéma de fragmentation du composé 14 [34]

Plante II « M. alysson »

III.5 Etude phytochimique de la plante *M. alysson*

La déréplication est une technique utilisée en phytochimie pour éviter d'isoler les composants déjà connus dans la plante [35].

Notre choix d'étude a été basé sur la fraction la plus active de point de vue biologique. Les extraits de n-BuOH et AcOEt, des feuilles de *M. alysson*, ont été utilisés pour les tests d'activités antioxydante et antimicrobienne. L'analyse par UHPLC-DAD-ESI-MSn de l'extrait n-BuOH (l'extrait le plus actif) (Figure III.37), nous a permis d'identifier 08 molécules. Le Tableau III.11 représente les noms des composés et les fragments de masse majoritaires.

Les résultats obtenus par LC-MS/MS, réalisée en mode impact électronique (ESI) négatif, révèlent une forte teneur en composés phényl-ethaoïde. L'identification de ces molécules a été basée sur une comparaison des spectres de masse, des fragmentations caractéristiques de ces molécules, et des indices de rétention (RI) avec les données de la littérature.

Les principaux composants de l'extrait butanolique appartiennent à la famille des polyphénols dans laquelle on retrouve la sous famille des phényléthanoïde.

Les principaux composants de l'extrait butanolique appartiennent à la famille des polyphénols dans laquelle on retrouve la sous famille des phényléthanoïde.

L'interprétation des données LC-MS des composés a été faite en deux voies :

- Par comparaison du spectre de masse MS² des standards ;
- Par comparaison avec la bibliographie

Les deux voies sont menées parfois ensemble car elles peuvent se révéler complémentaires.

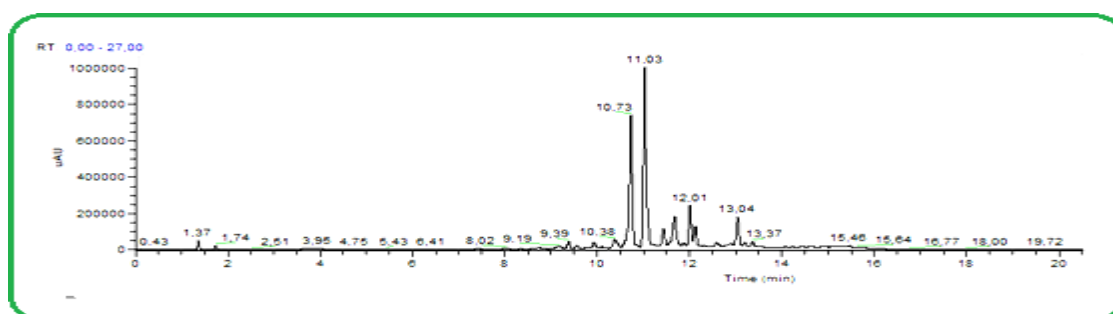


Figure III.37 Chromatogramme de l'extrait n-BuOH de *M. alysson*

Tableau III.11 Profil phytochimique de l'extrait Butanolique de *M.alysson*.

Numéro du pic	Nom de composé	m/z	Fragments majoritaires m/z
1	Echinacoside	785	623, 461, 315
2	Marruboside	887	725,593
3	ForsythosideB	755	623, 593, 461, 315
4	Acteoside	623	461, 315, 161
5	Alyssonoside	769	593,461, 447, 315
6	Cistanoside B	813	619,473, 491
7	Cistanoside G	445	299,161
8	Leucosceptoside B	783	607,589

III.5.1 Identification du Composé 1

Le Premier pic du chromatogramme (Figure III.38) apparait avec une masse de 786 m/z, déduite à partir de l'ion quasi moléculaire 785 [M-H]⁻ m/z. La fragmentation MS₂ de l'ion 785 m/z a donné un ion principal à 623 m/z, produit de la perte d'un groupement cafféoyle [M-H-162]⁻. Le spectre MS₃ de l'ion à 623 m/z présente un ion majeur à 461 m/z et un ion mineur à 315 m/z. La différence entre le fragment de masse 623 et 461 m/z donne un fragment de masse 162 m/z, correspond à la perte d'un groupement caféoyle.

Le schéma de fragmentation de ce composé (Figure III.39) est en accord avec la fragmentation de l'Echinacoside. Ce résultat est en accord avec une étude antérieure mentionnant la présence de différentes structures phénylethanoïdes glucosidé dans l'espèce *Marrubium cylleneum* dont la molécule Echinacoside a été identifiée dans les feuilles de la plante [36].

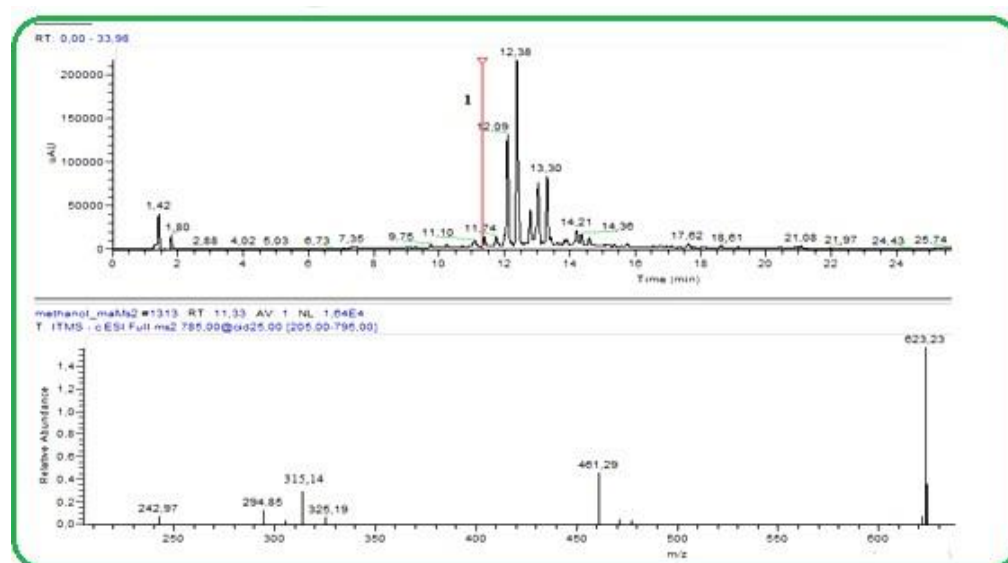


Figure III.38 Spectre de masse du composé 1

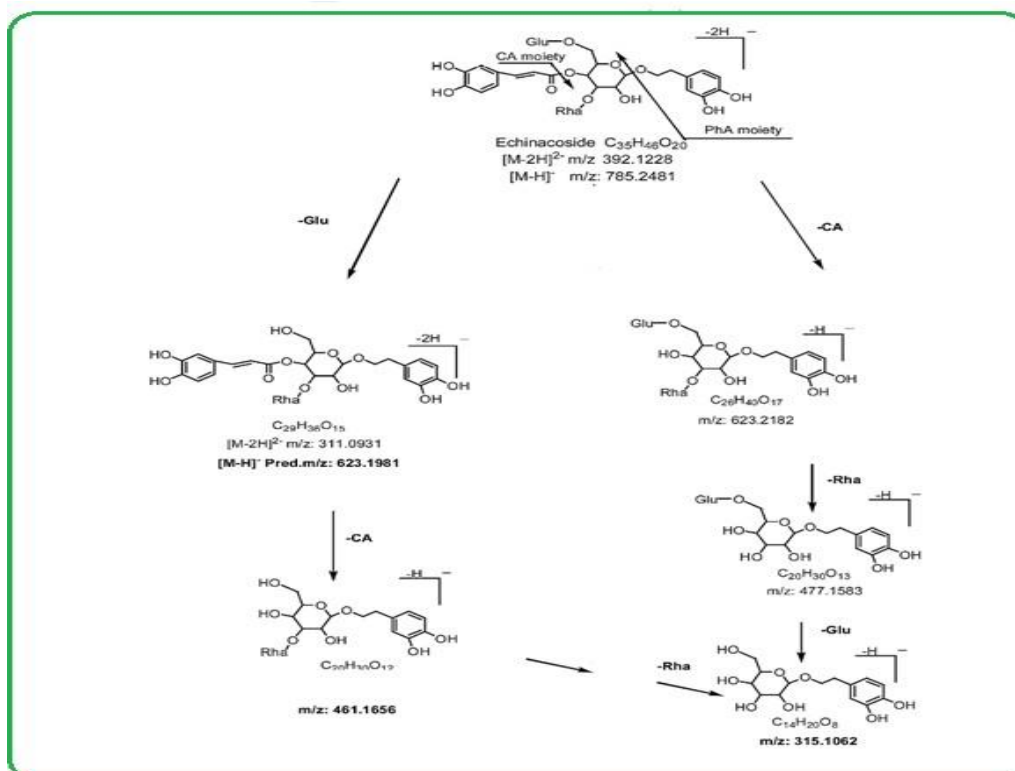


Figure III.39 Mécanisme de formation des ions de fragmentation [37]

III.5.2 Identification du Composé 2

Le deuxième pic (Figure III.40) a été attribué au marruboside qui est un phénylétanoïde glycosilé. Le mécanisme de fragmentation de cette molécule est comme suit :

- Fragmentation à 725 $[M - H - 162]^-$ m/z provient de la perte d'une unité caféoyl ;
- Fragmentation à 593 $[M - H - 162 - 132]^-$ m/z provient de la perte successive d'une unité caféoyl et pentose [38].

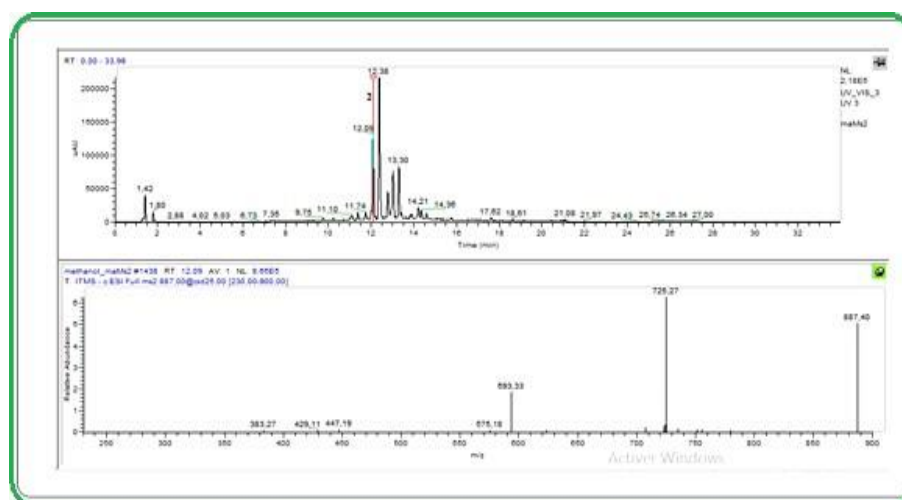


Figure III.40 Spectre de masse du composé 2

III.5.97 Identification du Composé

Le spectre ESI-MS du composé 3 (Figure III.41) a montré une fragmentation à 755 [M-H]⁻ m/z, cette dernière a été produite par la perte initiale de l'unité caféoylle pour donner un ion majoritaire à 593 m/z. Les pertes de l'apiose et du rhamnose, ou les deux, ont mené à la formation des ions à 461 [593-132]⁻, 447 [593-146]⁻ et 315 [593-132-146]⁻ m/z.

Ces fragments ont confirmé la structure du forsythoside B [39]. Le mécanisme de formation des fragments de mass est illustré dans la (FigureIII.42).

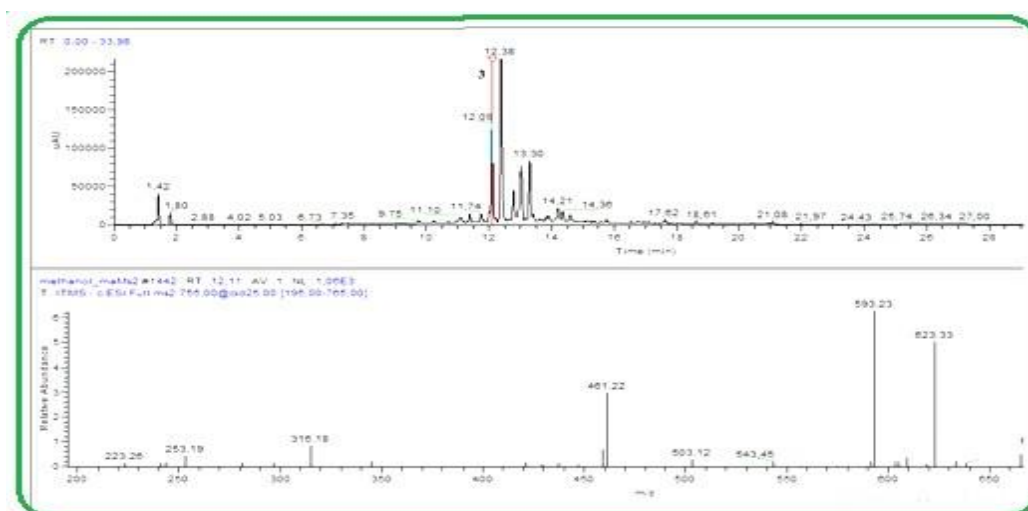


Figure III.41 Spectre de masse du composé 3

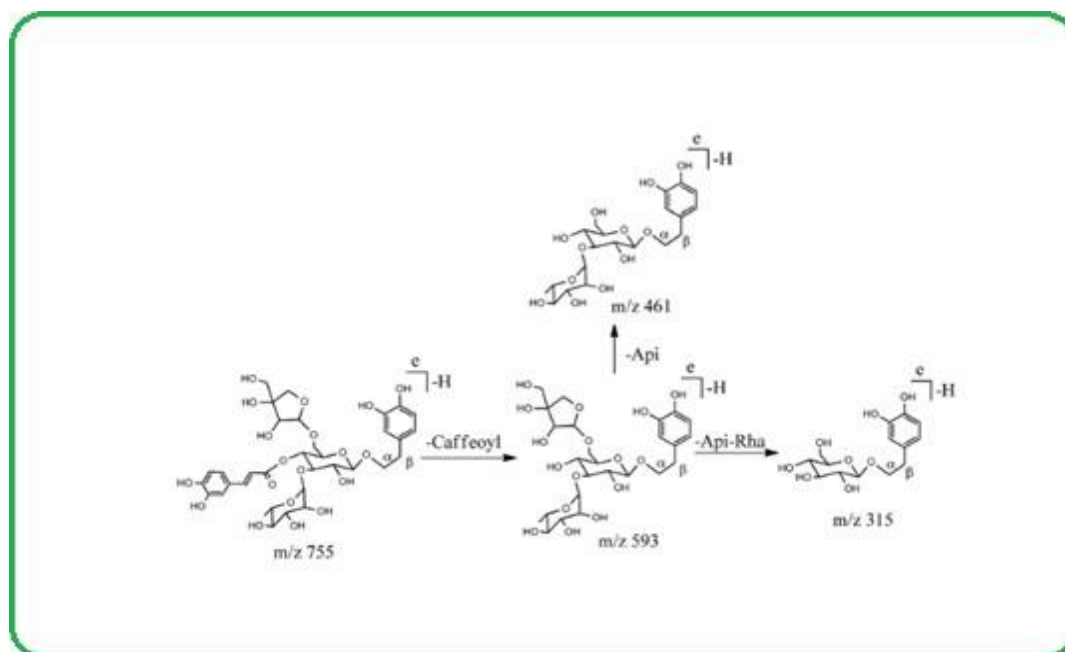


Figure III.42 Mécanisme de formation des ions de fragmentation [39].

III.5.98 Identification du Composé

Le spectre ESI/MS en mode négatif de ce composé (Figure III.43) montre un pic de l'ion moléculaire déprotoné à 623 [M-H]⁻ m/z et des ions fils à 461, 315 et à 161 m/z, correspondant à une fragmentation typique de la structure de l'acteoside (Figure III.44).

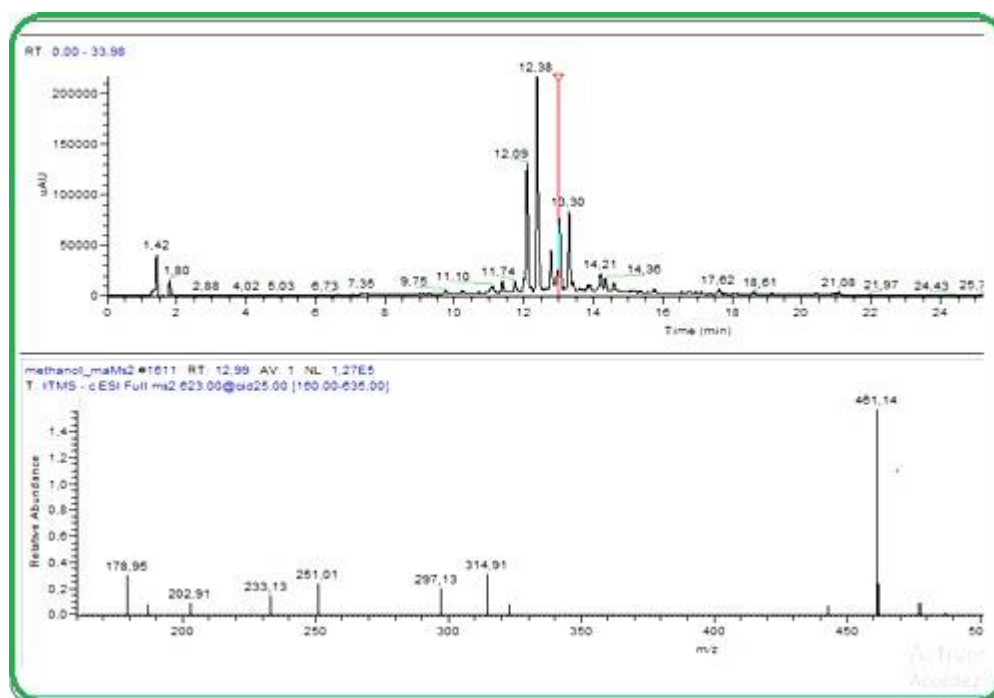


Figure III.43 Spectre de masse du composé 4

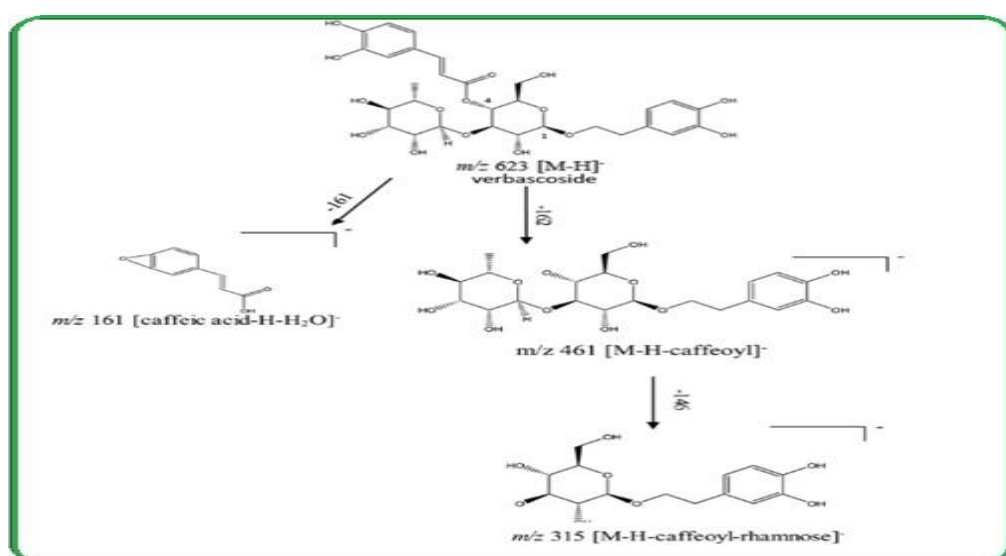


Figure III.44 Mécanisme de fragmentation du composé 4 [40]

III.5.5 Identification du composé 5

Ce produit a donné un ion précurseur à 769 m/z et un fragment majeur à 593 m/z (Figure III.45), ce fragment est dû à la perte du groupe acyle (unité féruloyle). La fragmentation MS₃ a montré des ions à 461 [M-H-176 (féruloyle)-132 (apiose)]⁻ m/z, 447 [M-H-176-146 (rhamnose)]⁻ m/z, et 315 [M-H-176 132-146]⁻ m/z en raison de la perte d'un groupe acyle, pentose et rhamnose de l'ion parent, respectivement. Ce composé a été caractérisé comme étant alyssonoside, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature [41]. Nous nous sommes également basés pour l'interprétation de ces résultats sur une base de données web CFM-ID (Figure III.46).

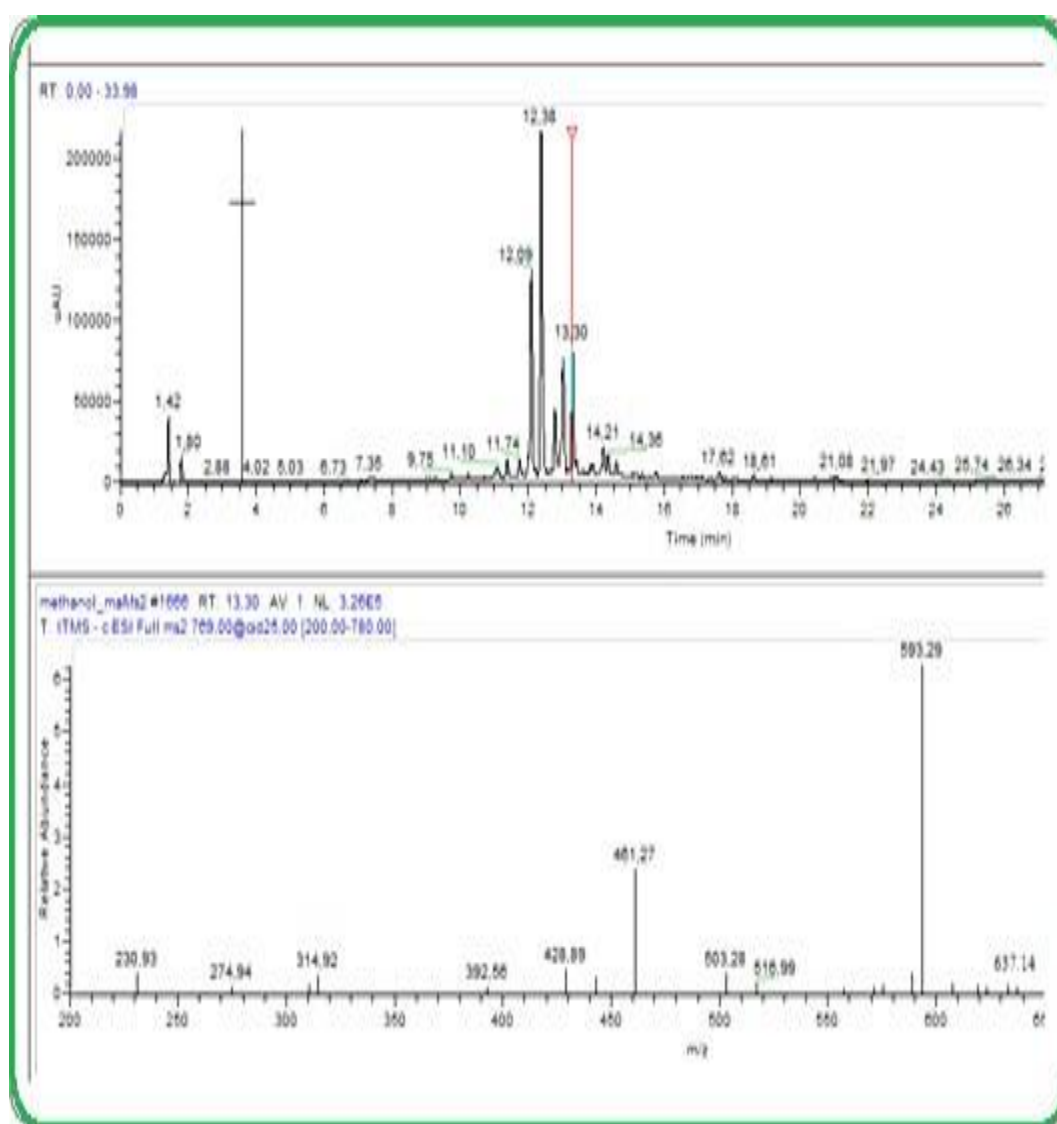


Figure III.45 Spectre de masse du composé 5



Figure III.46 Identification des métabolites par la base de données CFM-ID

III.5.6 Identification du composé 6

L'analyse du spectre de masse du composé 6 (Figure III.47) a permis d'observer un ion moléculaire déprotoné à 813 $[M-H]^-$ m/z suggérant une masse de 814 m/z correspondant à la molécule cistanoside B. L'identification a été basée sur une comparaison des spectres de masse des ions caractéristiques à 473 et 491 m/z avec les données de la littérature et la base de données (CFM-ID) [42].

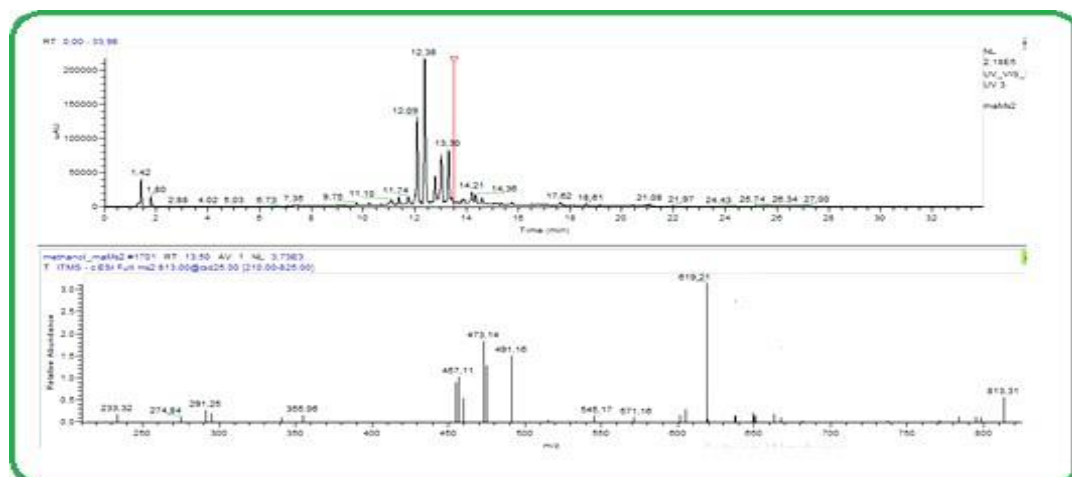


Figure III.47 Spectre de masse du composé 6



Figure III.48 Identification du spectre de masse du composé 6 par CFM-ID

III.5.7 Identification du composé 7

Le spectre ESI/MS en mode négatif de ce composé (Figure III. 49) montre un pic de l'ion moléculaire déprotoné à 445 $[M-H]^-$ m/z et des ions à 299 et 161 m/z correspondant à une fragmentation de la structure de Cistanoside G [42].

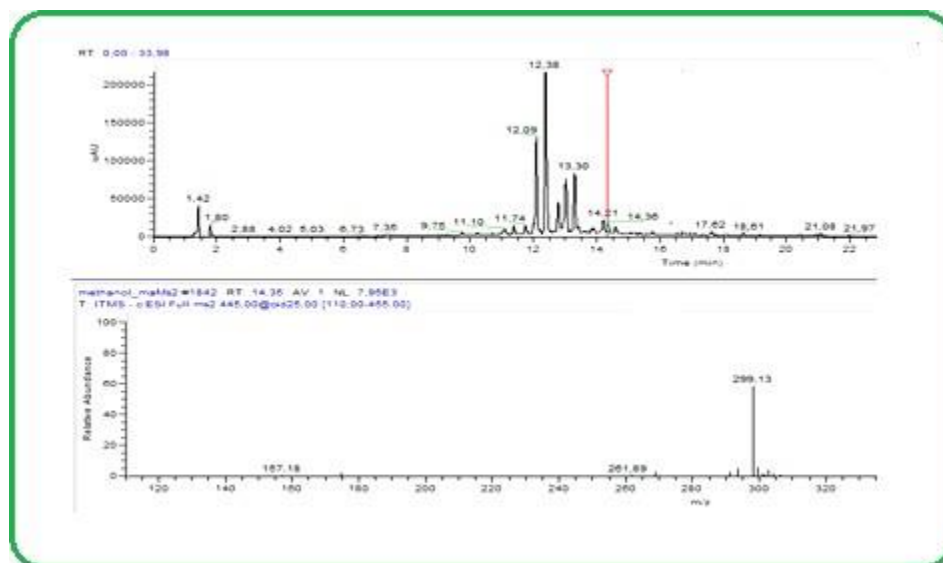


Figure III.49 Spectre de masse du composé 7

III.5.8 Identification du composé 8

Le composé 8 a été identifié comme étant leucoseptoside B, il a montré un ion pseudo-moléculaire à 783 m/z correspondant à l'ion $[M-H]^-$ dans le spectre MS. Le spectre MS / MS, obtenu à partir de la fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire à 783 m/z, a montré un ion plus abondant à 607 m/z suite à une perte d'un motif féruloylé [43]. La fragmentation MS₃ sur ce dernier ion a montré une perte supplémentaire d'unité pentose (fragment à 475 m/z) ainsi qu'une perte d'une unité désoxyhexose (fragment à 461 m/z).

La Figure III.50 [41] représente les fragmentation proposée des molécules phénylétanoides identifiées dans l'espèce *Macedonian Sideritis* (verbascoside, leucoseptoside et forsythoside A).

Plusieurs travaux antérieurs ont été réalisées sur cette plante à savoir l'étude de :

Çalış et al. 1992 [44] qui ont rapporté la présence du leucoseptoside B dans la partie aérienne de *M.alysson*. Ce dernier composé appartient à la sous-classe des PhG qui sont dotés de propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoire

Sahpaz et al. 2002 [45] ont pu isoler la molécule marruboside de l'extrait butanolique de l'espèce *M. vulgare* L.

Deux phénylétanoides « Velutinoside I et Velutinoside » ont été obtenus de l'extrait méthanolique de la plante *M. velutinum* selon l'étude de Kariotia et al. 2003 [46]

Göger et al. 2019 [47] ont abouti à l'identification des composés phénoliques à savoir le forsythoside B, leucoseptoside A, verbascoside, alyssonoside et martynoside dans l'extrait méthanolique de l'espèce *M. sivasense*.

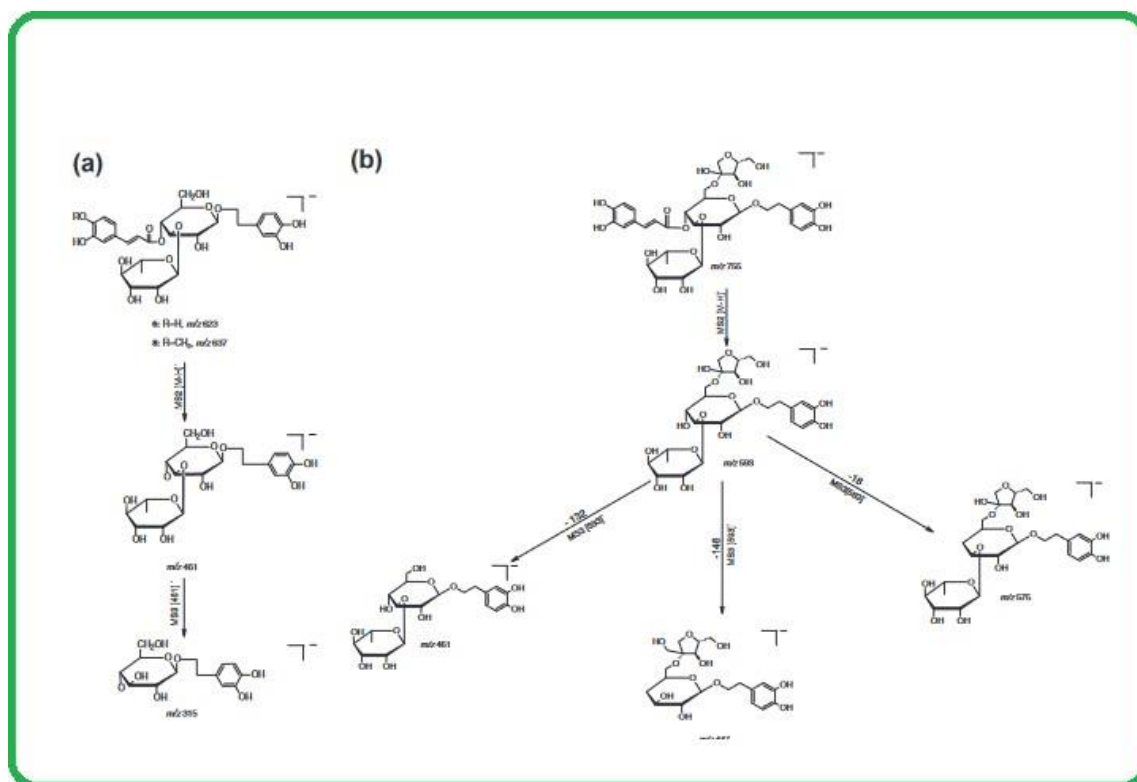


Figure III.50 Voie de fragmentation proposée pour verbascoside, leucoseptoside et forsythoside A

L'étude phytochimique de deux espèces étudiées *C.clusii* et *M.alysson* a permis d'identifier certaines familles des molécules chimiques. La méthode de déréplication (GC/MS et LC MS/MS) suivie par isolation des composés de l'extrait exsudat de l'espèce *C.clusii* a permis de déterminer des composés appartenant à la famille des acides phénoliques (acide gallique, l'acide caféique, l'acide malique et l'acide ellagique) et à la famille des flavonoïdes (rutine, Lutéolin-7-O-rutinoside, Isorhamnetin-3-O-rutinoside et Isorhamnetin-3-glucoside). D'autre part, l'étude du profil chimique de l'huile essentielle de *C.clusii* a montré une composition riche en composés monoterpéniques : Camphène (20.6%), α -Terpineol (13.4%), Sabinène (12.8%) et α -Terpinène (8.9%).

L'étude de l'extrait n-ButOH de l'espèce *M.alysson* a révélé que les phényléthanoides présentent une gamme de composés majeurs dans l'extrait butanolique de la plante *M. alysson*, il s'agit de : Echinacoside, Marruboside, Forsythoside B, Acteoside, Alyssonoside, Cistanoside B, Cistanoside G et Leucoseptoside B

III.6 Activités Biologiques

III.6.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols des extraits des plantes *C. clusii*, et *M. alysson* a été mise en évidence par la technique colorimétrique (Folin-Ciocalteux). L'acide gallique a été utilisé comme molécule standard dans le dosage des polyphénols des extraits étudiés (Figure III.51).

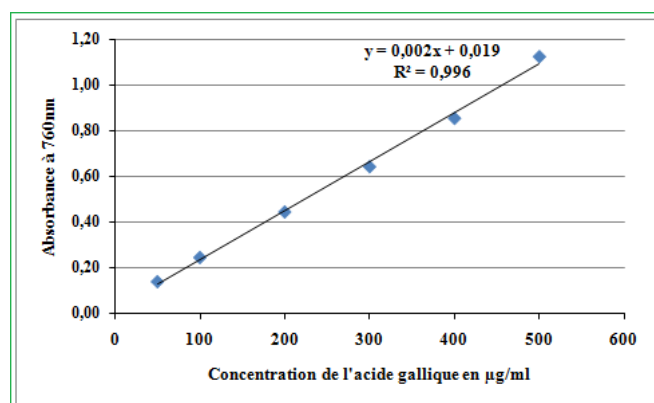


Figure III.51 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

(µg GAE/ml) *: µg gallic acid equivalent/ml (µg GAE/ml) pour les polyphénols.

(µg QE/ml)** : µg quercetin equivalent /ml (µg QE/ml) pour les flavonoïdes.

Les valeurs des polyphénols obtenus varient entre $18,75 \pm 0,5$ et $173,59 \pm 1,83$ (µg GAE/ml) pour les extraits : EP et Eaqcc (µg GAE/ml) ; et entre $9,28 \pm 0,91$, $30,44 \pm 1,27$ µgQE/ml pour les flavonoïdes des extraits : Exsudat (EExd) et l'extrait aqueux de *C. clusii* Eaqcc), les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau III.12.

Tableau III.12 Teneur en phénols totaux et flavonoïdes des plantes *C. clusii* et *M. alysson*.

Plantes	Extraits	Teneur en polyphénols	Teneur en Flavonoïdes
<i>C. clusii</i>	EExd	$120,78 \pm 0,58$	$9,28 \pm 0,91$
	Eaqcc	$173,59 \pm 1,83$	$30,44 \pm 1,27$
<i>M. alysson</i>	n-BuOH	$106,29 \pm 0,69$	$18,90 \pm 1,10$
	EEP	$18,75 \pm 0,5$	$0,008 \pm 0,050$
	AcOEt	$30,20 \pm 0,33$	$0,06 \pm 0,050$

Les données expérimentales ont été exprimées en moyenne \pm écart-type (n=3). Les composés phénoliques totaux ont été calculés en µg d'équivalent acide gallique/ml (µg EAG/ml).

D'après les résultats obtenus du dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes il apparaît que l'extrait Eaqqc de la plante *C. clusii* est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes ($173,59 \pm 1,83$) suivis par l'extrait EExd ($120,78 \pm 0,58$).

Les extraits de la plante *M. alysson* ont montrés des valeurs qui varient entre $18,75 \pm 0,5$ et $106,29 \pm 0,69$ μg EAG/ml dont l'extrait n-BuOH a donné la teneur la plus élevée par rapport aux autres extraits.

Les teneurs en poly phénols des extraits de *M. alysson* trouvés sont proches de celles rapporté par de Edziri et al [48].

Des études sur plusieurs espèces du genre Marrubium présentent une richesse en composés phénoliques. L'étude de Amessis-Ouchemoukh et al. (2014) [49] a montré que les teneurs en composés phénoliques des extraits méthanoliques et acitonique de *M. vulgare* ont des valeurs élevées ($56,76 \pm 1,62$, et $58,52 \pm 1,06$ mg GAE/g), par contre les teneurs en flavonoides présentent les valeurs les plus faibles ($81,21 \pm 0,69$, $26,30 \pm 0,31$ mg RE/g).

Une étude réalisée sur plusieurs espèces du genre *Cistus* (extraits aqueux et méthanolique) présente une richesse en polyphénols de l'espèce *Cistus salviifolius* ($408,43 \pm 1,09$ mg EAG/g) pour l'extrait aqueux et ($336,51 \pm 1,22$ mg EAG/g) pour l'extrait méthanolique, ces valeurs sont supérieures à celles que nous avons trouvé [50].

III.6.2 Activités biologiques de l'HE de *C. clusii*

III.6.2.1 Activité antioxydante

a) Test DPPH

L'activité antioxydante de l'HE de *C. clusii* a été réalisée en utilisant deux techniques DPPH, et β -carotène-acide linoléique. Les résultats du piégeage du radical libre DPPH de l'HE, sont présentés dans la Figure III.52. L'activité antioxydante la plus forte de l'HE a été trouvée à une concentration de 1 mg/ml avec un pourcentage d'inhibition de ($62 \pm 2,1$) %. Cette activité est inférieure à celle de l'antioxydant standard BHT ($99,83 \pm 2,8$) %. Les valeurs de l'IC₅₀ de l'huile essentielle et du BHT sont respectivement : $157,3 \pm 8,5$ et $6,1 \pm 0,4$ g / ml.

La comparaison des résultats obtenus avec les données de la littérature, nous a conduit à constater que la valeur IC₅₀ de l'huile essentielle de *Cistus clusii* est supérieure à celle du BHT et inférieure à celle de l'huile essentielle de *Cistus libanotis* qui présente une valeur IC₅₀ de 499,9 et 272,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement, pour les tests DPPH et ABTS [3].

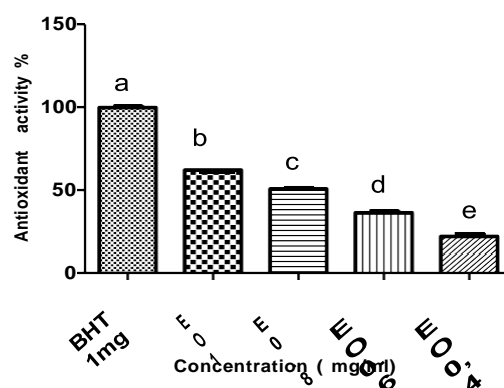


Figure III.52 L'activité antioxydante de l'HE de *C. clusii* (Test DPPH)

b) Test de blanchiment du β -carotène

L'aptitude de l'HE a empêché la peroxydation lipidique testée par la technique de blanchiment du β -carotène (Figure III.53) a révélé une forte activité antioxydante de l'HE ($84 \pm 2,1$) %. La capacité antioxydante de l'HE est inférieure à celle du standard positif BHT ($p > 0,01$). Nous avons observé aussi que le pouvoir antioxydant, évalué par la technique de blanchiment du β -carotène, est plus élevé que celui trouvé par la méthode du piégeage du radical DPPH. Ceci est dû à la spécificité du test de la décoloration du β -carotène pour les molécules lipophiles [51].

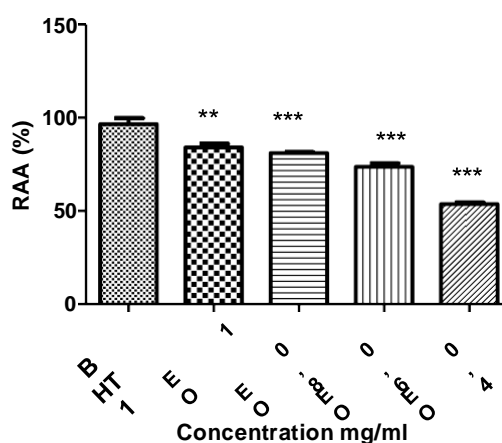


Figure III.53 L'activité antioxydante de l'HE de *C. clusii* (Technique de blanchiment de β -carotène).

Plusieurs auteurs ont mentionné que les mono-terpènes hydrocarbonés ont une activité antioxydante importante [51,52]. Choi et al. (2000) [53] ont rapporté que le γ -Terpinène, le terpinolène et le géraniol présente un effet antioxydant plus élevé que celui du Trolox.

Une autre étude menée par Quintans-Júnior et al. (2013) [54] a révélé que le camphène a prouvé une activité puissante de piégeage vis à vis les différents radicaux libres (tests TBARS et TRAP / TAR). Par conséquent, la combinaison du Camphène, γ -Terpinène et d'autres terpènes, présents dans l'huile essentielle de *Cistus clusii*, justifié son effet antioxydant dans les deux tests DPPH et β -carotène. Portant que, les autres composants minoritaires pourraient interférer avec l'effet synergique sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *C. clusii*.

III.6.2.2 Activité antimicrobienne de l'HE

La méthode de diffusion de disque a été utilisée pour tester la sensibilité des souches aux antibiotiques, selon les diamètres d'inhibition. Les souches sont classées, selon leurs sensibilités aux antibiotiques, en trois catégories :

S : Sensibles, I : Intermédiaire et R : résistante

L'activité antibactérienne de l'HE de *C.clusii* a été évaluée par la méthode de diffusion de disque sur :

- ✓ Trois souches bactériennes de références : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27865) ;
- ✓ Trois souches cliniques : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus* ;
- ✓ Deux levures *Candida albicans*.

Le Tableau III.13 récapitule les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE.

Tableau III.13 Résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE de *C.clusii*.

Microorganismes	D (mm) HE (10 μ l)	D (mm) GENT	D (mm) FLC	CMI (μ g/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	20.6 \pm 1.2	25.3 \pm 0.5	-	125
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	9.6 \pm 0.5	20.3 \pm 0.5	-	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27865)	8.3 \pm 0.5	16.3 \pm 0.5	-	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 \pm 0.5	-	-	250
<i>Proteus mirabilis</i>	11 \pm 0.5	-	-	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	19 \pm 0.5	20.3 \pm 1.2	-	125
<i>Candida albicans</i>	20 \pm 0.0	-	18 \pm 0.0	125

Résultats et Discussion

Les valeurs sont des moyennes \pm SD de trois mesures. D: Diamètre de la zone d'inhibition, y compris le diamètre du disque (6 mm), Contrôles positifs utilisés: Gentamicine 30, FLC: Fluconazole, CMI : Concentration minimal inhibitrice.

Selon les résultats présentés dans (Tableau III.13), l'HE de *C. clusii* a montré un fort potentiel antimicrobien contre *Candida albicans*. Les plus grandes zones d'inhibition et les valeurs de CMI pour les souches bactériennes, qui étaient sensibles à l'HE, étaient dans la gamme de $20,6 \pm 1,2$ - $11 \pm 0,5$ mm et 125-250 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement. Nous avons détecté une résistance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* testée à l'HE. Cette résistance peut s'expliquer par la nature de la surface de la membrane externe de la bactérie, qui est composée de lipopolysaccharides formant particulièrement une barrière imperméable aux composés hydrophobes et qui peut probablement inactiver l'huile essentielle ou certains agents antimicrobiens [55].

Nous avons également constaté que les microorganismes les plus sensibles sont les bactéries Gram positives. Les résultats obtenus sont en accord avec les études précédentes rapportées dans la littérature qui ont confirmé que les huiles essentielles sont plus actives contre les bactéries Gram-positive que les Gram-négative [55,56].

La corrélation entre l'activité antimicrobienne de l'HE de *C. clusii* et le profil chimique peut être attribuée aux principaux composés présents dans l'HE comme le camphène, le Terpèneol-4, le Sabinène et le γ -Terpinène. En outre, l'acétate d'isobornyle, l'oxyde de caryophyllène et β -caryophyllène sont détectés avec faible proportion par rapport au pourcentage des composés majoritaires. Ces composants peuvent également intervenir dans l'activité antimicrobienne. De nombreuses études signalent l'influence des composés minoritaires sur l'activité antimicrobienne et l'effet synergique entre les composants majoritaires et minoritaires de l'HE [57-59].

Thakre et al. (2010) [60] ont rapporté que le Camphène a démontré une activité antifongique puissante contre *Candida albicans*. Ce résultat justifié la forte activité antifongique de l'HE de *Cistus clusii* qui est riche en camphène (20,6%).

III.6.3 Activité antioxydante des extraits des plantes *C. clusii*, et *M. alysson*

L'activité antioxydante a été déterminée par plusieurs techniques pour les extraits des espèces:

- L'espèce *C. clusii* : Extrait aqueux (Eaqcc, exsudat (EExd) et les fractions issues de l'extrait exsudat
- L'espèce *M. alysson* : l'extrait butanolique (n-BuOH).

Trois techniques (CUPRAC, DPPH, β -carotène) ont été utilisées pour déterminer l'activité antioxydante des extraits des plantes étudiées.

III.6.3.1 Test de la réduction du cuivre (CUPRAC)

Le pouvoir réducteur des extraits a été estimé en utilisant le test de réduction de cuivre (CUPRAC). Le principe de ce test est basé sur la réduction de Cu^{2+} en Cu^{+} en présence des antioxydants et de Néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline). Le BHA et le BHT ont été utilisés comme étant des molécules antioxydantes standards. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.14.

Tableau III.14 Résultats du test CUPRAC

Plantes	Extraits	A _{0.50} (µg/mL)	A _{0.50} du BHA (µg/mL)	A _{0.50} du BHT (µg/mL)
<i>M. albysson</i>	EP	-	5,30±0,70	8,90±3.95
	AcOEt	89,58± 0,55		
	n-BuOH	30,60± 0,58		
<i>C.clusii</i>	EExd	36,30±1,40		
	F1	ND		
	F2	ND		
	F3	15,54± 0,55		
	Eaqcc	13,94± 0,58		

Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± écart-type (n=3).

L'efficacité des extraits via le test de réduction de cuivre est inversement proportionnelle aux valeurs A_{0.50}. La valeur la plus faible a été remarquée avec l'extrait aqueux (Eaqcc) de *C.clusii* (13,94± 0,58 µg/ ml) suivi par l'extrait n-BuOH (30,60± 0,58 µg/ ml) de l'espèce *M.alysson*. D'après les résultats mentionnés dans le Tableau III.14, on peut classer l'efficacité des extraits vis-à-vis le test du CUPRAC selon l'ordre suivant :

Eaqcc > F3 > n-BuOH > EExd > AcOEt > EEP

A la lumière de ces résultats, on peut conclure que l'extrait aqueux de *C.clusii* et l'extrait n-BuOH de *M.alysson* présentent des propriétés antioxydantes puissantes. Cette activité est due à la richesse de ces extraits en composés phénoliques, flavonoïdes et phényléthanols.

Diverses études ont montré qu'il existe une corrélation entre les polyphénols et l'activité antioxydante des extraits [61].

L'extrait aqueux a montré la plus grande valeur en composés phénoliques avec une teneur de 173,59±1,83 µg EAG/ml. Tandis que l'extrait EEP a donné la valeur la plus faible

Résultats et Discussion

(18,75±0,5(µg EAG/ml). Nos résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs études, qui ont rapporté une corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante [62,63].

L'analyse par UHPLC/MSMS a permis d'enregistrer la richesse des extraits n-BuOH et Eaqqc respectivement, de *M.alysson* et *C.clusii* en principes actifs, en particulier les polyphénols et les phenylethanoides glucosidés.

Un nombre important des PhG présente des capacités antioxydantes citons l'exemple de l'acteoside qui a un l'effet important de piégeage des radicaux libres [64-66].

Carmen Burgos et al. (2020) [67] ont démontré que les capacités de piégeage du radical DPPH de l'acteoside sont semblables à celles de BHT et du α -tocophérol, indiquant le potentiel de l'utilisation de l'acteoside comme agent protecteur naturel contre le rancissement oxydatif.

Zheng-Dan. He et al. (2000) [68] ont décrit que la teneur en composés phénoliques spécialement les phénylethanoides (verbascosie, poliumoside, et brandioside) de l'extrait ethanologique était à l'origine de son pouvoir antioxydant.

III.6.3.2 Test antiradicalaire DPPH

Le test antiradicalaire DPPH montre que tous les extraits testés disposent d'une activité antioxydante à l'exception des deux extraits : EEP et AcOEt de *M.alysson* . L'extrait Eaqqc de *C.clusii* a présenté une bonne activité antiradicalaire (25,35±0,19) mais elle reste inférieure à celle de la molécule standard (BHA). L'extrait exsudat (EExd) a manifesté aussi une bonne activité antioxydante (30,46±0,5). Le Tableau III.15 représente l'activité antiradicalaire exprimée en valeurs IC₅₀.

Tableau III.15 Activité antiradicalaire (Test DPPH).

Plantes	Extraits	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ du BHA (µg/mL)
<i>M.alysson</i>	EEP	>800	6.14±0.41
	AcOEt	>800	
	EM-OH	157,35±8,58	
	n-BuOH	130,35±3,02	
<i>C.clusii</i>	EExd	30,46±0,5	
	F1	ND	
	F2	ND	
	F3	18,57±0,5	
	Eaqqc	25,35±0,19	

L'ordre d'efficacité antiradicalaire des extraits étudiés est comme suit :

F3 > Eaqqc > EExd > n-BuOH

Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait aqueux de *C.clusii* est due à sa richesse en flavonoïdes, qui possèdent une structure aromatique caractérisée par une délocalisation électronique importante qui donne une très bonne stabilisation de leurs formes radicalaires. De ce fait, les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont très souvent exprimées en termes de potentiel antiradicalaire [69].

III.6.3.3 Test de blanchiment du β -carotène

Les résultats de l'activité antioxydante obtenus par la méthode de blanchissement du β -carotène sont présentés dans le Tableau III.16. Les valeurs IC₅₀ indiquent les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testés. Le BHA a été utilisé comme étant une molécule antioxydante standard.

Tableau III.16 Activité antioxydante (Test de β -carotène)

Plantes	Extraits	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ du BHA (µg/mL)
<i>M.alysson</i>	EEP	40,15±1,95	0,90±0,020
	AcOEt	38,50±0,90	
	n-BuOH	30,96±3,05	
<i>C.clusii</i>	EExd	30,85±3,05	
	F1	45,50 ±30,55	
	F2	40,88±1,05	
	F3	25,57±0,90	
	Eaqqc	16,55±1,85	

L'analyse des valeurs IC₅₀ nous a permis de classer l'efficacité des extraits comme suit :

Eaqqc > F3 > EExs > n-BuOH > AcOEt > EEP

Plus la valeur de IC₅₀ est faible plus l'activité antioxydante de l'extrait est forte. L'extrait aqueux a montré une bonne activité antioxydante comparativement aux autres extraits. En outre, les extraits polaires présentent des valeurs IC₅₀ plus faibles par rapport aux extraits apolaires. Le pouvoir antioxydant des extraits polaires (Eaqqc, EExd, et n-BuOH) pourrait s'expliquer par leur richesse en substances poly-phénoliques.

Nos résultats sont en concordance avec les données bibliographiques qui ont rapporté une corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir anti-oxydant [70].

Résultats et Discussion

Les résultats des trois tests (DPPH, CUPRAC, et β -carotène) ont montré que les extraits les plus actifs sont les extraits polaires et la fraction F3 de l'exsudat.

L'ordre d'activité des extraits est le suivant :

- Test CUPRAC : Eaqqc > F3 > n-BuOH > EExd > AcOEt > EEP
- Test DPPH : F3 > Eaqqc > EExd > n-BuOH
- Test de β -carotène : Eaqqc > F3 > EExs > n-BuOH > AcOEt > EEP

III.6.4 L'Activité antimicrobienne des extraits des espèces *M. alysson* et *C. clusii*

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des deux plantes sont représentés dans le tableau III.17. La gentamicine 50 μ g, a été utilisée comme contrôle positif des bactéries et le Fluconazole pour les souches fongiques.

La variation des diamètres des zones d'inhibition des extraits varie d'une souche à une autre. Les extraits : Eaqqc, la fraction F3, et n-BuOH étaient les plus actifs pour les deux plantes étudiées et avec des effets proches à ceux des antibiotiques standards utilisés.

Les extraits de *C. clusii* ont montré des diamètres des zones d'inhibition les plus grands (12, 0 \pm 0,50mm et 24 \pm 1,0 mm). Les souches les plus sensibles aux extraits sont : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*.

La fraction F3 présente une bonne activité antibactérienne sur les souches : *S. aureus*, *E. coli*, et *C. albicans*, avec des diamètres d'inhibition allant de 12, 0 \pm 0,50 à 22,33 \pm 1,53mm. Cette activité s'est avérée supérieure à celle de son extrait brut (exudat). On a constaté que les souches les plus sensibles aux extraits sont : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* par contre, on a remarqué une résistance de toutes les souches testées aux extraits EEP et AcOEt.

Tableau III.17 Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de *M. alysson* et *C. clusii*.

Souches/Plantes	<i>M. alysson</i> D (mm)							ATB /ATFD (mm)	
	Eaqqc	EExd	F3	EP	AcOEt	n-BuOH	Me-OH	GENT	FLC
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	24,00 \pm 1,0	10,00 \pm 0,00	12,00 \pm 0,50	-	09,00 \pm 1,0	11,00 \pm 0,50	10,50 \pm 1,15	24,33 \pm 1,53	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	20,67 \pm 0,58	08,00 \pm 0,50	14,00 \pm 0,55	-	08,55 \pm 1,15	10,0 \pm 0,57	10,57 \pm 0,50	20,00 \pm 1,0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27865)	8,00 \pm 1,73	8,00 \pm 0,0	8,00 \pm 1,0	-	-	12,05 \pm 1,0	11,0 \pm 1,0	26,0 \pm 00	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18,67 \pm 1,53	-	10,66 \pm 0,58	-	-	11,00 \pm 0,0	09,00 \pm 1,0	28,00 \pm 1,0	-

Résultats et Discussion

<i>Proteus mirabilis</i>	20,0 ±1,0	8,00 ±0,0	18,00 ±0,0	-	-	20,67 ±2,02	12,0 ±1,0	20,00 ±1,0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,0 ±1,0	12,00 ±0,55	12,33 ±1,53	-	-	10,00 ±1,0	8,00 ±1,0	22,00 ±0,5	-
<i>Candida albicans</i>	24,0 ±0,50	11,05 ±1,0	22,33 ±1,53	-	-	14,00 ±0,5	10,00 ±0,5	-	18,00 ±00

L'analyse des données du Tableau III.17 nous a permis aussi de constater une résistance remarquable de la souche *P. aeruginosa* aux différents extraits des plantes étudiées. Cette résistance pourrait être expliquée par la nature de la paroi cellulaire. En général, les bactéries Gram négatif possèdent une résistance intrinsèque aux composés biocides qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes [71].

L'efficacité des extraits : Eaqcc, F3 et n-BuOH contre la majorité des souches testées peut être expliquée par la prédominance des composés phénoliques. Les résultats obtenus sont en accord avec diverses études phyto-chimiques qui montrent l'existence d'une corrélation entre la capacité antimicrobienne et la teneur en polyphénols, spécialement les acides phénoliques (acides hydroxy-benzoïques, acides hydroxy-cinnamiques) [72].

Le pouvoir antimicrobien de la fraction F3 pourrait être expliqué, par une relation entre le profil chimique riche en composés phénoliques et flavonoïdes de cette fraction et l'activité antimicrobienne. Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes ont été démontrées par diverses études. Cette activité est due notamment à l'aptitude de ces molécules à inhiber la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes [73]. De même, plusieurs études [74-75] ont été menée sur le pouvoir antimicrobien de : l'acide trans-cinnamique, l'acide 4-hydroxy benzoïque, l'acide P-coumarique, l'acide caféique et la rutine.

III.6.5 Activité in silico anti covid 19

Depuis l'apparition de la pandémie du covid 19, plusieurs recherches sont orientées vers les produits naturels antiviraux ; notamment les acides phénoliques qui ont prouvé leur pouvoir antiviral [76-79]. De ce fait, nous avons étudié l'activité antivirale in silico des quatre composants identifiés dans les extraits de la plante *C. clusii*.

Le logiciel Pyrx, un outil de Docking, a été utilisé pour la réalisation de l'activité in silico anti covid 19 des composants : L'acide caféique, l'acide Trans- cinnamique, l'acide P-hydroxy benzoïque et la rutine (comme ligands) et la chaîne des protéines du SRAS-CoV-2 (comme récepteur). Lopinavir a été utilisée comme molécule standard (l'énergie d'interaction égale à - 8.3 kcal/mol).

Résultats et Discussion

Le criblage virtuel, fondé sur la structure du complexe protéine-ligand, a été utilisé pour identifier les molécules disposant d'une forte affinité au récepteur. Dans notre cas de figure, les résultats du criblage virtuel entre les acides phénoliques avec la glycoprotéine SARS-CoV-19 (ligands-récepteur) ont été visualisés à l'aide du logiciel Dicovery studio 2021. Les composés étudiés ont présenté des affinités significatives différentes avec les récepteurs des protéines. Les meilleures énergies d'interaction observées avec la protéase SRAS-CoV-2 ont été trouvées avec la rutine et l'acide trans cinnamique.

Selon leur affinité au site actif, les molécules criblées sont classées selon l'ordre suivant : Rutine > acide trans-cinnamique > acide caféïque > acide P-hydroxy benzoïque.

Les différentes position, Ligands-récepteurs, sont présentés par les quatre Figures ci-dessous (Figure III.54- 58).

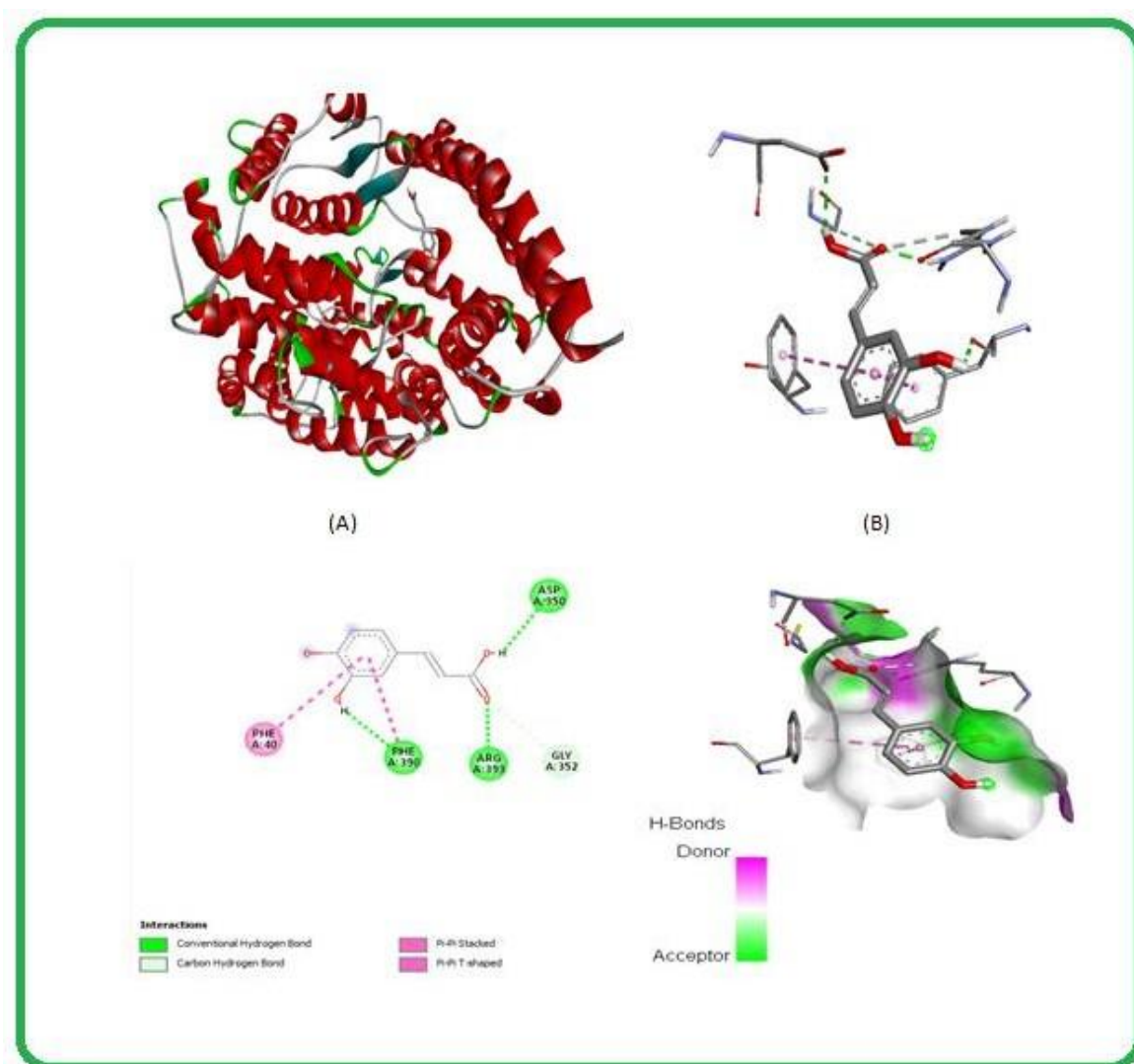


Figure III.54 Interactions ligands- Protéine (2AJF-Acide caféïque)

Le complexe [2AJF-Acide caféique] formé (Figure III.54) est stabilisé par trois liaisons hydrogènes (PHE390, ARG393, ASP350) et deux liaisons Pi Stack (**empilement $\pi-\pi$**) formées avec le résidu PH40 et PH390 ; l'énergie d'interaction égale à -6.5 kcal/mol.

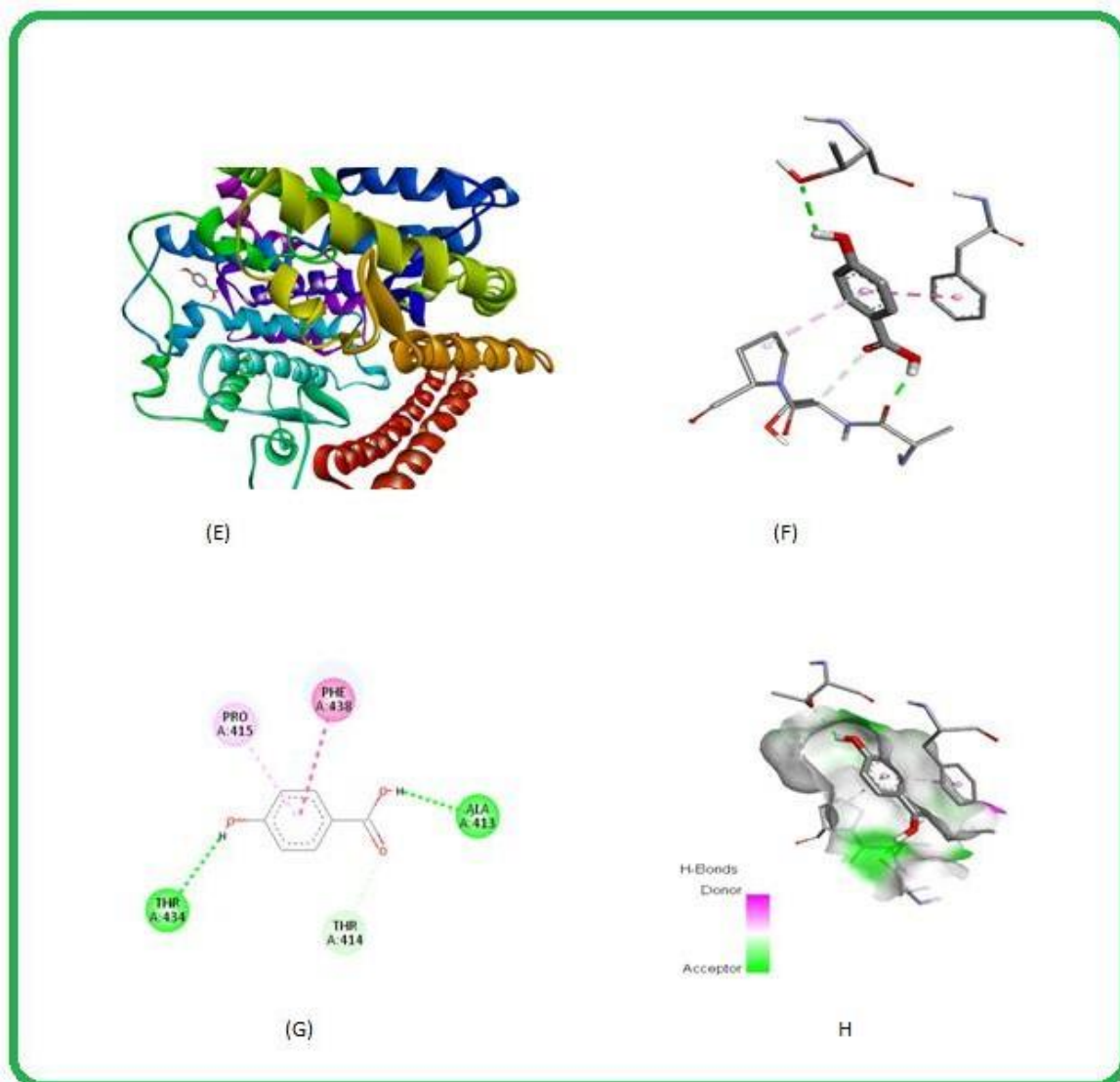


Figure III.55 Interactions ligands-Protéine (2AJF- P-hydroxy benzoïque)

L'analyse du complexe [2AJF- P-hydroxy benzoïque] indique la présence des deux liaisons hydrogènes (THR434, et ALA413), une liaison Pi-Pi stack PH438 ; avec une énergie d'interaction égale à -6.1 kcal/mol (Figure III.55).

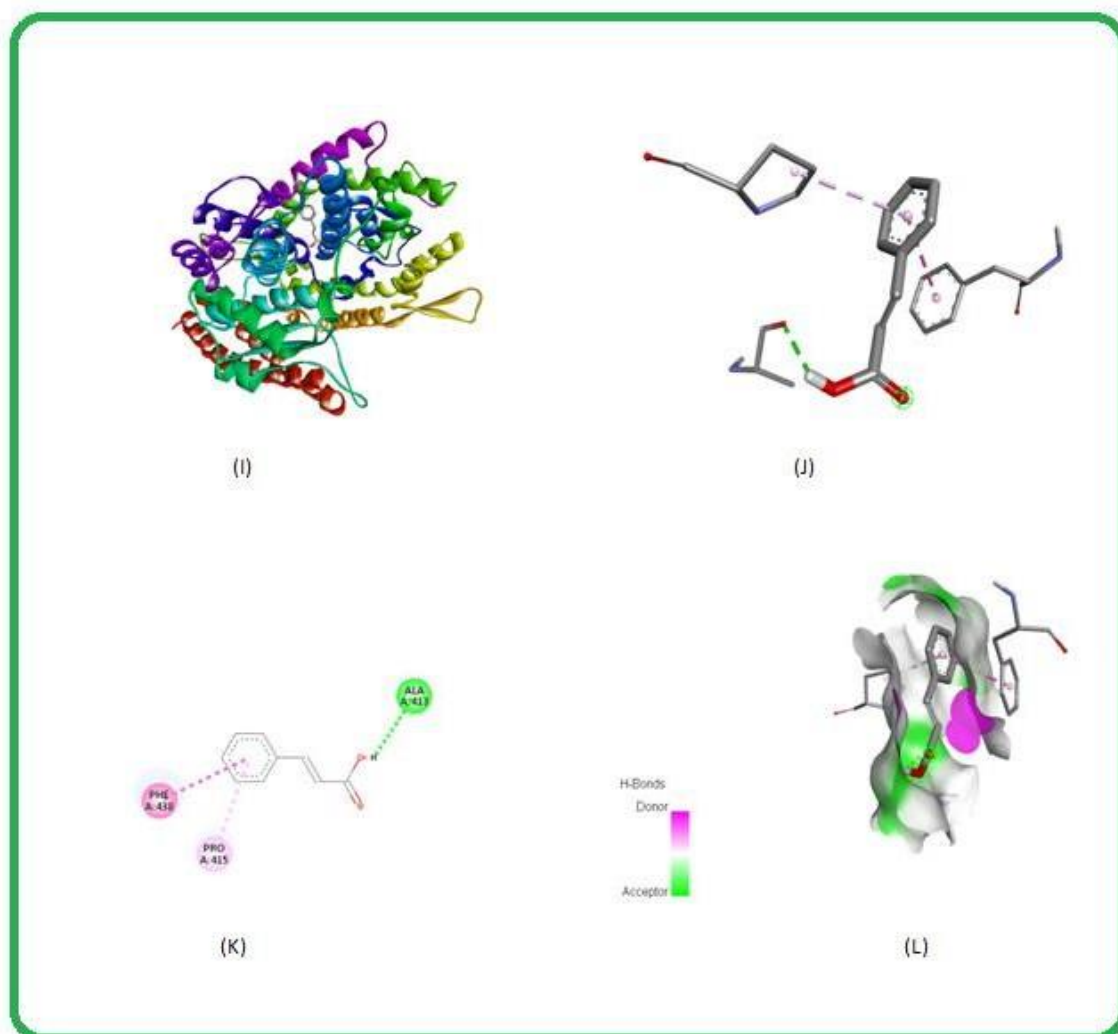


Figure III.56 Interaction ligands-Protéine (2AJF-acide trans-cinnamique)

L'analyse visuelle du complexe [2AJF-acide trans-cinnamique] indique la présence d'une liaison hydrogène avec ALA413 et une liaison Pi-Pi avec le résidu PH438 ; son énergie d'interaction est égale à -6.7 kcal/mol (Figure III.56).

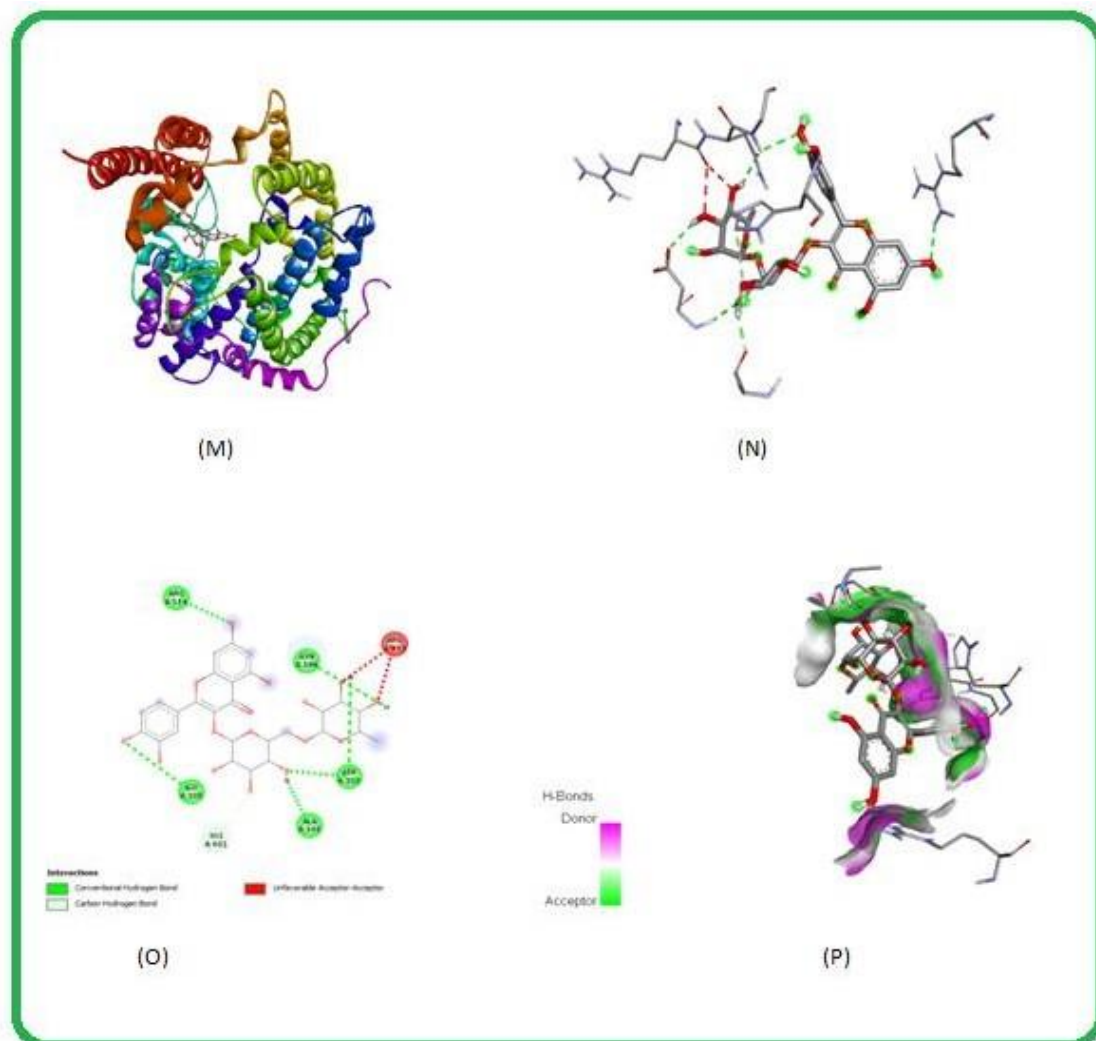


Figure III.57 Interaction ligands-Protéine (2AJF-Rutine)

Les interactions qui interviennent à la formation du complexe [2AJF-Rutine] présentent quatre liaisons hydrogènes (avec les résidus GLY395, ALA348, ASP350, ASN394) et une liaison avec le résidu ARG514 ; avec une énergie d'interaction de -9.3Kcal/mol (Figure III.57-III.58)

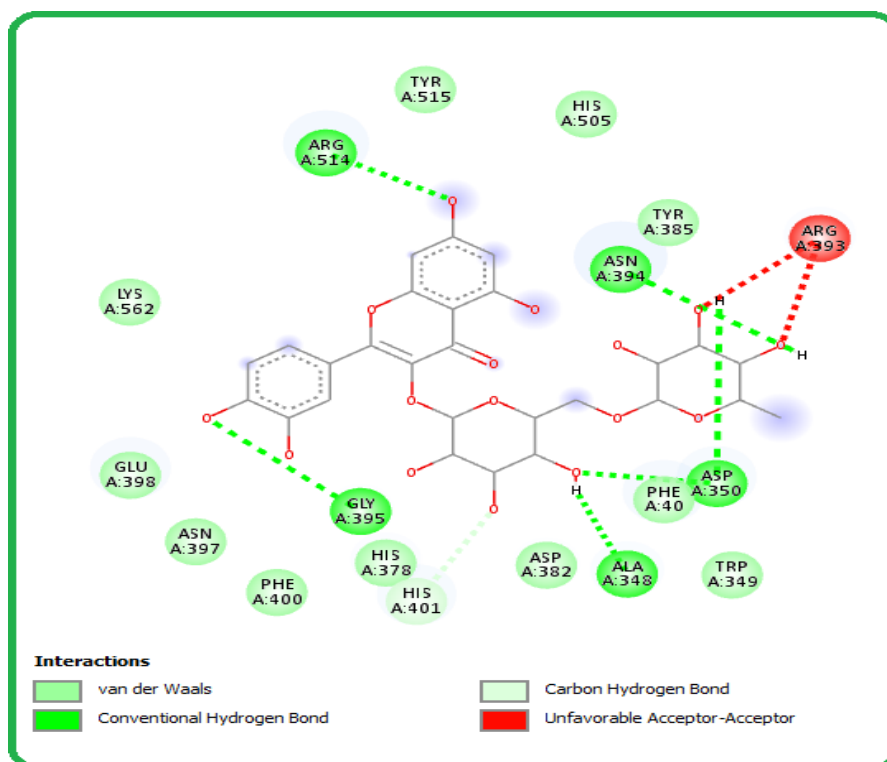


Figure III.58 Mode d'interaction 2AJF-Rutin 2D

A la lumière des résultats de criblage virtuelle des inhibiteurs de sars- cov19, on remarque que :

- Les molécules inhibitrices d'origine naturelle présentent des interactions de type hydrogène avec la chaîne de la protéine.
- Le meilleur score a été trouvé avec la rutine
- La stabilité énergétique des complexes formés 2AJF-Molécule est due aux liaisons hydrogènes.

L'affinité élevée d'une molécule dépend du type de la liaison qui se produit avec le site actif de la protéine. Les analyses d'amarrage moléculaire ont permis d'évaluer les modes de liaison probables des cinq molécules testées avec la protéine (2AJF). Parmi les composés testés, la rutine s'est avérée la plus puissante car elle révèle la plus grande affinité à cette protéine. Ainsi des études in vivo devraient être effectuées afin de valider ces résultats promotrice d'inhibition du COVID-19.

- [1] H. Zidane, M. L. Fauconnier, M. Sindic, and A. El Bachiri, “Comparative study of volatile secondary metabolite of *cistus libanotis* during different process,” *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 6, no. 8, pp. 281–287, 2014.
- [2] K. Bechlaghem, H. Allali, H. Benmehdi, N. Aissaoui, and G. Flamini, “Chemical analysis of the essential oils of three *cistus* species growing in North-West of Algeria,” *Agric. Conspec. Sci.*, vol. 84, no. 3, pp. 283–293, 2019.
- [3] M. R. Loizzo, M. Ben Jemia, F. Senatore, M. Bruno, F. Menichini, and R. Tundis, “Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 586–594, 2013.
- [4] H. Zidane¹, M. Elmiz, F. Aouinti, A. Tahani, J. Wathelet, M. Sindic and A. Elbachiri., “Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco,” *African J. Biotechnol.*, vol. 12, no. 34, pp. 5314–5320, 2013. [DOI:10.5897/ajb2013.12868](https://doi.org/10.5897/ajb2013.12868).
- [5] D. Angelopoulou, C. Demetzos, and D. Perdetzoglou, “An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece),” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 29, no. 4, pp. 405–415, 2001. [DOI:10.1016/S0305-1978\(00\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00071-5).
- [6] P. G. Rossi et al., “Antibacterial action of essential oils from corsica,” *J. Essent. Oil Res.*, vol. 19, no. 2, pp. 176–182, 2007. [DOI:10.1080/10412905.2007.9699254](https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699254)
- [7] https://hmdb.ca/spectra/c_ms/37847.
- [8] K. Patrick, F. Olivier., “Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l ’ identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne » Thèse de doctorat, 2019. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02055347>.
- [9] J. Rohloff, “Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling,” *Molecules*, vol. 20, no. 2, pp. 3431–3462, 2015. [DOI:10.3390/molecules20023431](https://doi.org/10.3390/molecules20023431).
- [10] M. I. Razboršek, M. Ivanović, and M. Kolar, “Validated stability-indicating GC-MS method for characterization of forced degradation products of trans-caffeic acid and trans-ferulic acid,” *Molecules*, vol. 26, no. 9, 2021. [DOI:10.3390/molecules26092475](https://doi.org/10.3390/molecules26092475).
- [11] S. Gabriella, A. Veronica, C. Virginia, D. Leontin, and M. Zaharie, “Determination of phenolic compounds from wine samples by GC/MS system,” *Rev. Chim.*, vol. 63, no. 9, pp. 855–858, 2012.
- [12] F. de Souza Dias, M. F. Silva, and J. M. David, “Determination of Quercetin, Gallic Acid, Resveratrol, Catechin and Malvidin in Brazilian Wines Elaborated in the Vale do São Francisco Using Liquid-Liquid Extraction Assisted by Ultrasound and GC-MS,” *Food Anal. Methods*, vol. 6, no. 3, pp. 963–968, 2013. [DOI:10.1007/s12161-012-9507-2](https://doi.org/10.1007/s12161-012-9507-2).
- [13] https://foodb.ca/spectra/ms_ms/181826.

- [14] M. Mattonai and E. Ribechini, “Fast screening for hydrolysable and condensed tannins in lignocellulosic biomass using reactive Py-GC/MS with in situ silylation,” *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 135, pp. 242–250, 2018. [DOI:10.1016/j.jaap.2018.08.029](https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.08.029)
- [15] S. Januar, P. Sugita, and B. Arifin, “Identification of Trans-Cinnamic Acid in Sinyo Nakal (*Duranta repens*) Fruits’ Methanol Extract,” *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.*, vol. 8, no. 2, pp. 73–80, 2015. [DOI:10.9734/irjpac/2015/17616](https://doi.org/10.9734/irjpac/2015/17616).
- [16] https://www.nmrdb.org/new_predictor/
- [17] Z. Lin, Y. Fang, A. Huang, L. Chen, S. Guo, and J. Chen, “Chemical constituents from *Sedum aizoon* and their hemostatic activity,” *Pharm. Biol.*, vol. 52, no. 11, pp. 1429–1434, 2014. [DOI:10.3109/13880209.2014.895019](https://doi.org/10.3109/13880209.2014.895019).
- [18] Mauro R. Silva et al., “Antioxidant activity and metabolomic analysis of cagaitas using paper spray mass spectrometry,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 30, no. 5, pp. 1034–1044, 2019. [DOI:10.21577/0103-5053.20190002](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190002).
- [19] C. C. Wyrepkowski et al., “Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity,” *Molecules.*, vol.19, pp. 16039–16057, 2014. [DOI:10.3390/molecules191016039](https://doi.org/10.3390/molecules191016039)
- [20] M. Sobeh et al., “*Albizia anthelmintica*: HPLC-MS/MS profiling and in vivo anti-inflammatory, pain killing and antipyretic activities of its leaf extract,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 115, 2019. [doi.org /10.1016/j.biopha.2019.108882](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108882).
- [21] G. D’Urso, G. Sarais, C. Lai, C. Pizza, and P. Montoro, “LC-MS based metabolomics study of different parts of myrtle berry from Sardinia (Italy),” *J. Berry Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 217–229, 2017.
- [22] S. Cheikhrouhou and I. Khemakhem, “Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC – MS / MS of selected Tunisian pomegranate peels,” vol. 54, no. August, pp. 2890–2901, 2017. [doi.org /10.3233/JBR-170158](https://doi.org/10.3233/JBR-170158)
- [23] A. Fathoni, E. Saepudin, A. H. Cahyana, D. U. C. Rahayu, and J. Haib, “Identification of Nonvolatile Compounds in Clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado,” vol. 1862, no. 1, 2017. [DOI:10.1063/1.4991183](https://doi.org/10.1063/1.4991183)
- [24] N. Seeram, R. Lee, M. Hardy, and D. Heber, “Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry,” *Sep. Purif. Technol.* vol. 41, pp. 49–55, 2005. [doi.org /10.1016/j.seppur.2004.04.003](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.04.003).
- [25] S. Fernández-Arroyo, E. Barrañón-Catalán, V. Micol, A. Seguera-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, “High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract,” *Phytochem. Anal.*, vol. 21, no. 4, pp. 307–313, 2010. [doi.org /10.1002/pca.1200](https://doi.org/10.1002/pca.1200).
- [26] https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2539087.
- [27] E. Saracini, M. Tattini, M. L. Traversi, F. F. Vincieri, P. Pinelli, “Simultaneous LC-DAD and LC-MS Determination of Ellagitannins, Flavonoid Simultaneous LC-DAD and LC-MS

- Determination of Ellagitannins , Flavonoid Glycosides , and Acyl-Glycosyl Flavonoids in *Cistus salvifolius* L . Leaves,” *Chromatographia*, vol. 62, no. 5/6, pp 245–249, 2005. [DOI:10.1365/s10337-005-0623-7](https://doi.org/10.1365/s10337-005-0623-7)
- [28] J. Pinela, L. Barros, A. Maria, C. Santos-buelga, and I. C. F. R. Ferreira, “Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples : Effects of drying and oral preparation methods,” *Food Chem.*, vol. 135, pp. 1028–1035, 2012. [DOI:10.1016/j.foodchem.2012.05.038](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.038).
- [29] L. Yan, P. Yin, C. Ma, and Y. Liu, “Method Development and Validation for Pharmacokinetic and Tissue Distributions of Ellagic Acid Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS),” *Molecules.*, vol.19, pp. 18923–18935, 2014. [Doi:10.3390/molecules191118923](https://doi.org/10.3390/molecules191118923)
- [30] M. Xu, Q. Shao, S. Ye, S. Li, M. Wu, M. Ding and Y.Li, “Simultaneous Extraction and Identification of Phenolic Compounds in *Anoectochilus roxburghii* Using Microwave-Assisted Extraction Combined with UPLC-Q-TOF-MS / MS and Their Antioxidant Activities,” *Front. Plant Sci.*, vol. 8, pp. 1–11, 2017. [DOI:10.3389/fpls.2017.01474](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01474).
- [31] https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/273297.
- [32] M. J. Simirgiotis, J. Benites, C. Areche, and B. Sepúlveda, “Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS,” *Molecules* Vol. 20, pp. 11490–11507, 2015. [Doi:10.3390/molecules200611490](https://doi.org/10.3390/molecules200611490).
- [33] A. Li, X. Hou, and Y. Wei, “Fast screening of flavonoids from switchgrass and: *Mikania micrantha* by liquid chromatography hybrid-ion trap time-of-flight mass spectrometry,” *Anal. Methods*, vol. 10, no. 1, pp. 109–122, 2018. [DOI:10.1039/c7ay02103h](https://doi.org/10.1039/c7ay02103h).
- [34] L.-y. Du, M. Zhao, J. Xu, D.-w. Qian, S. Jiang, E.-x. Shang, J.-m. Guo, and J.-a. Duan., “Analysis of the metabolites of isorhamnetin-3-O-glucoside produced by human intestinal flora in vitro applying UPLC-Q-TOF/MS,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, pp. 2489-2495,2014. [DOI:10.1021/jf405261a](https://doi.org/10.1021/jf405261a)
- [35] P. Waridel, “Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L. (*Potamogetonaceae*)”. Thèse de doctorat, Faculté des sciences. Institut de Pharmacognosie et Phytochimie. Université de Lausanne, 2003
- [36] A. Karioti, a A. Protopappa, N. Megoulas and H. Skaltsa., “Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*,” vol. 15, pp. 2708–2714, 2007. [DOI:10.1016/j.bmc.2007.01.035](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.035).
- [37] Y. Wang et al., “An approach to identifying sequential metabolites of a typical phenylethanoid glycoside, echinacoside, based on liquid chromatography – ion trap-time of

flight mass spectrometry analysis,” vol. 80, pp. 572–580, 2009. [DOI:10.1016/j.talanta.2009.07.027](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.027).

[38] B. Amri et al., “Marrubium vulgare L. Leave Extract: Phytochemical Composition, Antioxidant and Wound Healing Properties,” *J. Molecules*, Vol. 22, 2017. [DOI:10.3390/molecules22111851](https://doi.org/10.3390/molecules22111851).

[39] Y. Li et al., “Analytical Methods HPLC-LTQ-orbitrap MS n profiling method to comprehensively characterize multiple chemicals,” *Anal. Methods*, vol. 00, pp. 1–16, 2015. [DOI:10.1039/C5AY00420A](https://doi.org/10.1039/C5AY00420A).

[40] Y. M. Attia, D. M. El, H. A. Wagd, and M. M. Elmazar, “Verbascoside : Identification , Quantification , and Potential Sensitization of Colorectal Cancer Cells to 5-FU by Targeting PI3K / AKT Pathway,” *scientific reports.*, pp. 25–27, 2018. [DOI:10.1038/s41598-019-55121-x](https://doi.org/10.1038/s41598-019-55121-x).

[41] J. Petreska, M. Stefkov, F. Ferreres, D. A. Moreno, F.A. Tomás-Barberán, G. Stefova, & Gil-Izquierdo., “Potential bioactive phenolics of Macedonian Sideritis species used for medicinal “Mountain Tea,” *Food Chemistry.*, vol. 125 (1), pp. 13-20, 2011. [Doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.019](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.019).

[42] J. Zhang et al., “LTQ-Orbitrap-based strategy for traditional Chinese medicine targeted class discovery , identification and herbomics research : a case study species of Herba Cistanches,” *RSC Adv.*, vol. 5, pp. 80816–80828, 2015. [DOI:10.1039/C5RA13276B](https://doi.org/10.1039/C5RA13276B).

[43] H. Kırmızıbekmez, P. Montoro, S. Piacente, C. Pizza, A. Dönmez, and I. Çalı, “Identification by HPLC-PAD-MS and Quantification by HPLC-PAD of Phenylethanoid Glycosides of Five Phlomis Species,” *Phytochem. Anal.*, vol. 16, pp. 1–6, 2005. [DOI:10.1002.pca.802](https://doi.org/10.1002.pca.802).

[44] H. Calis, M. Hosny, T. Khalifa and P. Ruedi, “Phenylpropanoid glycosides from marrubium alysson,” *Phytochemistry.*, vol. 31, no. 10, pp. 3624–3626, 1992. [DOI:10.1016/0031-9422\(92\)83740-p](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83740-p)

[45] S. Sahpaz, T. Hennebelle, and F. Bailleul, “Marruboside , a New Phenylethanoid Glycoside from Marrubium Vulgare L,” *Nat Prod Lett.*, Vol. 16, no. 3, pp. 195–199, 2002. [DOI:10.1080/10575630290013576](https://doi.org/10.1080/10575630290013576).

[46] A. Kariotia, H. Skaltsa, J.Heilmannb, O. Sticher, “Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from Marrubium velutinum,” *Phytochemistry.*, vol. 64, pp. 655–660, 2003. [DOI:10.1016/S0031-9422\(03\)00242-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00242-5)

[47] F. Göger, G. Özek, , M. Tekin, S.Yur , T. Özek, “Phytochemical Profiling and Evaluation of Marrubium sivasense Aytaç , Akgül & Ekici for Antioxidant Activity and Inhibition Effects on α -Amylase , Lipoxxygenase , Xanthine Oxidase and Tyrosinase Enzymes,” *JOTCSA.*,vol. 6, no. 3, pp. 281–292, 2019. [DOI:10.18596/jotcsa.516888](https://doi.org/10.18596/jotcsa.516888).

[48] H. Edziri,M. Mastouri ,M.A. Mahjoub, S.Ammar, Z. Mighri, L.Gutmann, and M. Aouni, “Antiviral activity of leaves extracts of Marrubium alysson L,” *J. Med. Plant Res.*, Vol. 5, no 3, pp. 360-363, 2011.

- [49] N. Amessis-ouchemoukh, I. M. Abu-reidah, R. Quirantes-piné, K. Madani, and A. Segura-carretero, “Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria,” *Ind. Crop. Prod.*, vol. 61, pp. 120–129, 2014. [DOI:10.1016/j.indcrop.2014.06.049](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.049)
- [50] K. Sayah, I. Marmouzi, H. N. Mrabti, Y. Cherrah, M. El, and A. Faouzi, “Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia,” *BioMed Res. Int.*, 2017. [DOI:10.1155/2017/2789482](https://doi.org/10.1155/2017/2789482)
- [51] E. N. Frankel and A. S. Meyer, “Review The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants,” *J Sci Food Agric.*, vol. 80, pp. 1925–1941, 2000. [DOI:10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4)
- [52] H. Zengin and A. H. Baysal, “Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy, *Molecules*, vol. 19, pp. 17773–17798, 2014. Doi: 10.3390/molecules191117773
- [53] H. Choi, H. S. Song, H. Ukeda, and M. Sawamura, “Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, pp. 4156–4161, 2000. [DOI:10.1021/jf000227d](https://doi.org/10.1021/jf000227d).
- [54] L. Quintans-júnior et al., “Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+) -Camphene, p -Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models,” *ISRN Toxicology.*, vol. 2013, 2013. [DOI:10.1155/2013/459530](https://doi.org/10.1155/2013/459530).
- [55] S. D. Cox and J. L. Markham, “Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, pp. 930–936, 2007. [DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03353.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03353.x).
- [56] J. E. Patterson, L. McElmeel, and N. P. Wiederhold, “In Vitro Activity of Essential Oils Against Gram- Positive and Gram-Negative Clinical Isolates, Including Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae,” *Open Forum Infect Dis.*, vol. 6, no 12, 2019. [DOI:10.1093/ofid/ofz502](https://doi.org/10.1093/ofid/ofz502).
- [57] I. Stappen, J. Wanner, N. Tabanca, et al. “Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Dracocephalum heterophyllum* and *Hyssopus officinalis* from Western Himalaya” *Nat. Prod. Commun.*, Vol. 10, no 1, pp 133-138, 2015. [DOI:10.1177/1934578X1501000131](https://doi.org/10.1177/1934578X1501000131).
- [58] D. Saidana, M. A. Mahjoub, O. Boussaada, J. Chriaa, I. Chéraif, M. Daami, Z. Mighri, and A.N. Helal, “Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae),” *Microbiol. Res.*, vol. 163, pp 445-455, 2008. [doi:10.1016/j.micres.2006.07.009](https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.009).
- [59] S. Burt, “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, pp. 223–253, 2004. [doi.org 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022).

- [60] A. D. Thakre, S. V. Mulange, S. S. Kodgire, G. B. Zore, and S. M. Karuppaiyl, “Effects of Cinnamaldehyde, Ocimene, Camphene, Curcumin and Farnesene on *Candida albicans*,” *Adv Microbiol.*, Vol. 6, pp. 627–643, 2016. [DOI:10.4236/aim.2016.69062](https://doi.org/10.4236/aim.2016.69062)
- [61] K. S. Evenamede, K. Kpegba, O. Simalou, P. Boyode, A. Agbonon, and M. Gbeassor, “Etude comparative des activités antioxydantes d’extraits éthanoliques de feuilles, d’écorces et de racines de *Cassia sieberiana* Comparative antioxidant potential study of different parts of *Cassia sieberiana*,” *Int. J. Biol. Chem. Sci.* Vol.11, no. 6, pp. 2924–2935, 2017. [DOI:10.4314/ijbcs.v11i6.29](https://doi.org/10.4314/ijbcs.v11i6.29).
- [62] N. Ghedadba, H. Bousselsela, L. Hambaba, S. Benbia, and Y. Mouloud, “Évaluation de l’activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L.,” *Phytothérapie.*, vol. 12, pp. 15–24, 2014. [DOI:10.1007/s10298-014-0832-z](https://doi.org/10.1007/s10298-014-0832-z).
- [63] B. Bamba, C. K. D. Benie, A. Ouattara, D. N. Doukourou, R. K. Kamou and Karamoko Ouattara, “Teneurs en phénols totaux, activités antioxydantes des macérés et décoctés des feuilles de *Uvaria chamae* P. Beauv. (Annonaceae),” *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol.15, no. 1, pp. 54–67, 2021. [DOI:10.4314/ijbcs.v15i1.6](https://doi.org/10.4314/ijbcs.v15i1.6).
- [64] H. D. Lee, J. H. Kim, Q. Q. Pang, P. M. Jung, E. J. Cho, and S. Lee, “Antioxidant activity and acteoside analysis of *Abeliophyllum distichum*,” *Antioxidants.*, vol. 9, no. 11, 2020. [doi:10.3390/antiox9111148](https://doi.org/10.3390/antiox9111148).
- [65] C. H. Chen, Y. S. Lin, M. Y. Chien, W. C. Hou, and M. L. Hu, “Antioxidant and antihypertensive activities of acteoside and its analogs,” *Bot. Stud.*, vol. 53, no. 4, pp. 421–429, 2012.
- [66] L. V. Bose, G. K. Varghese, and S. Habtemariam, “Identification of acteoside as the active antioxidant principle of *Premna serratifolia* root wood tissues,” *Pharmacol.*, vol. 4, no. 2, pp. 228–236, 2013. Corpus ID: 4939507.
- [67] C. Burgos, D. Muñoz-Mingarro, I. Navarro, C. Martín-Cordero, and N. Acero, “Neuroprotective potential of verbascoside isolated from *Acanthus mollis* L. leaves through its enzymatic inhibition and free radical scavenging ability,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 12, 2020. [DOI: 10.3390/antiox9121207](https://doi.org/10.3390/antiox9121207).
- [68] Z. D. He, K. M. Lau, H. X. Xu, P. C. Li, and P. Pui-Hay But, “Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 71, no. 3, pp. 483–486, 2000. [DOI: 10.1016/s0378-8741\(00\)00189-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00189-6).
- [69] J. H. Salem, “Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique.”, Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique Félix Houphoët Boigny, 2019. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748769>.
- [70] H. Kilicgun and D. Altiner, “Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*,” *Pharmacogn. Mag.*, vol. 6, no. 23, pp. 238–241, 2010. [DOI: 10.4103/0973-1296.66943](https://doi.org/10.4103/0973-1296.66943).

- [71] D. Diarrassouba et al., “Evaluation de la composition phytochimique et des propriétés antimicrobiennes de deux plantes aromatiques utilisées dans la production du moût sucré et du tchapalo, deux boissons artisanales de Côte d’Ivoire,” *Int. J. Biol. Chem. Sci.* Vol.14, no.9, pp. 3215-3230, 2020. [DOI:10.4314/ijbcs.v14i9.19](https://doi.org/10.4314/ijbcs.v14i9.19).
- [72] A. Pernin, ‘Action antioxydante et antimicrobienne de composés phénoliques dans des milieux modèles et des émulsions riches en lipides insaturés’, tel-02139084, Thèse de doctorat de l’Université Paris-Saclay, (2018).
- [73] T. Ozawa, T. H. Lilley, and E. Haslam, “Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit,” *Phytochem*, vol. 26, no. 11, pp. 2937–2942, 1987. [DOI:10.1016/S0031-9422\(00\)84566-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84566-5).
- [74] A. Adamczak, O. Marcin, and T. M. Karpinski, “Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants,” *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 1, 2020. [DOI:10.3390/jcm9010109](https://doi.org/10.3390/jcm9010109).
- [75] P. Panichayupakaranant, S. Tewtrakul, and S. Yuenyongsawad, “Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract,” *Food Chem.*, vol. 123, no. 2, pp. 400–403, 2010. [DOI:10.1016/j.foodchem.2010.04.054](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.054).
- [76] H. Utsunomiya, M. Ichinose, k. Ikeda et al., “Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication in vitro,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 34, no. 4, pp. 1020–1024, 2014. [DOI:10.3892/ijmm.2014.1859](https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1859).
- [77] A. Goc, W. Sumera, M. Rath, and A. Niedzwiecki, “Phenolic compounds disrupt spike-mediated receptor-binding and entry of SARS-CoV-2 pseudo-virions,” *PLoS One*, vol. 16, no. 6, 2021, 2021. [DOI:10.1371/journal.pone.0253489](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489).
- [78] K. Chojnacka, A. Witek-Krowiak, D. Skrzypczak, K. Mikula, and P. Młynarz, “Phytochemicals containing biologically active polyphenols as an effective agent against Covid-19-inducing coronavirus,” *J. Funct. Foods*, vol. 73, 2020. [DOI:10.1016/j.jff.2020.104146](https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104146).
- [79] A. Prasansuklab, A. Theerasri, P. Rangsinth, C. Sillapachaiyaporn, S. Chuchawankul, and T. Tencomnao, “Anti-COVID-19 drug candidates: A review on potential biological activities of natural products in the management of new coronavirus infection,” *J. Tradit. Complement. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 144–157, 2021. [DOI:10.1016/j.jtcme.2020.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.12.001).

Conclusion générale et Perspectives

L'objectif de notre étude était l'identification des métabolites secondaires des deux plantes Aurèsienne : *Marrubium alysson* et *Cistus clusii* par le biais d'usage des différentes techniques spectrométriques et chromatographiques. Pour aboutir aux objectifs de ce travail, une étude bibliographique sur le thème ainsi qu'une méthodologie de travail ont été effectuées. La bibliographie des deux plantes a été réalisée pour examiner l'engouement scientifique que suscitent leurs études. Ainsi, ces deux plantes sont largement étudiées de point de vue phytochimiques. Malgré ces études antérieures, on a choisi les deux espèces pour les étudier par des techniques d'analyses plus avancées.

Deux principaux volets sont visés par cette étude. Le premier est le volet phytochimique qui consiste à étudier quantitativement et qualitativement les extraits et les fractions biologiquement actives : l'extrait aqueux, l'exsudat, la fraction F3 et l'extrait butanolique par la technique UHPLC-MSn. Des phényléthanoïdes ont été identifiés pratiquement dans tous les extraits de la plante *Marrubium alysson* avec des différentes concentrations. Des acides phénoliques et des flavonoïdes sont aussi détectés dans les extraits exsudat et aqueux de la plante *C. clusii*. Ces composés sont responsables des activités biologiques. D'autre part, l'analyse du profil chimique de l'huile essentielle de *C. clusii* a permis d'identifier 31 composés représentant 78.34 % de la totalité de l'huile essentielle. Les résultats de l'analyse de l'huile par CPG/FID et GC/MS ont montré que cette huile est constituée essentiellement de mono terpènes (78.34 %), monoterpènes oxygénés (18.78%) et sesquiterpènes (1.9%).

L'application des différentes techniques combinées, UHPLC-DAD-ESI-MSn et GC/MS, nous a aidé à l'identification du profil chimique de chaque extrait (empreinte moléculaire). Sachant que la spectrométrie de masse de haute résolution (MSn) permis l'interprétation des spectres en donnant une relation entre l'ion précurseur et le composé.

En outre, la spectroscopie RMN monodimensionnelle (^1H , ^{13}C) et bidimensionnelle (HSQC, HMBC, COSY), a permis l'identification structurale de chaque molécule isolée.

L'étude phytochimique (déreplication) de l'extrait exsudat de la plante *C. clusii*, nous a conduit à isoler trois acides phénoliques, qui sont identifiés pour la première fois dans l'exsudat de cette espèce.

L'investigation phytochimique réalisée par UHPLC-DAD-ESI-MSn de l'extrait aqueux, nous a permis d'identifier 14 composés dont la majorité des molécules identifiées appartiennent aux familles des flavonoïdes et des acides phénoliques. D'autre part, l'analyse de l'extrait butanolique de l'espèce *M. alysson* par la même technique a mené à identifier 08 composés appartenant à la classe des phényléthanoïdes (Echinacoside, Forsythoside B, Acteoside, Alyssonoside, Cistanoside B, Cistanoside G, Leucosceptoside B).

Conclusion générale et Perspectives

Le deuxième volet de cette étude s'est concentré sur la détermination des activités biologiques afin de choisir les extraits les plus actifs. Différents tests biologiques, in vitro et in silico, ont été réalisés à savoir : l'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-covid 19.

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été réalisé dans le but de déterminer les extraits riches en ces composés. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux de la plante *C.clusii* contient une teneur élevée en polyphénols totaux ($173,59 \pm 1,83$ μg EAG/ml) et une valeur de $30,44 \pm 1,27$ $\mu\text{gQE/ml}$ en flavonoïdes. Ces résultats sont en concordance avec l'étude de l'extrait aqueux par UHPLC-MSn. Cette dernière a confirmé l'existence des composés phénoliques et flavonoïdes avec des concentrations élevées.

L'extrait exsudat de la même plante a présenté aussi une teneur élevée en composés phénoliques ($120,78 \pm 0,58$ EAG/ml) et en flavonoïdes ($9,28 \pm 0,91$ $\mu\text{gQE/ml}$). La déréplication par GC/MS a confirmé ces résultats.

Le pouvoir antimicrobien des extraits a été mis en évidence par la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques), en présence de différentes souches bactériennes et fongiques pathogènes. Les extraits Eaqqc, n-BuOH et la fraction F3 ont présenté une meilleure activité antibactérienne contre la majorité des souches testées à l'exception de la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui était résistante aux différents extraits des deux plantes *C.clusii* et *M.alysson*.

L'étude du pouvoir antioxydant des extraits de *M.alysson* et *C.clusii* a été effectuée selon trois techniques complémentaires (Chélation de CUPRAC, DPPH et β -carotène). Les résultats ont montré que les extraits aqueux, F3 de *C.clusii* et n-BOH de *M.alysson* ont des propriétés antioxydantes puissantes par rapport aux autres extraits. Ce pouvoir antioxydant est dû à la richesse de ces extraits en composés phénoliques, flavonoïdes et phényléthanoids.

De plus, l'activité anti covid-19 (in silico) a été testée, l'amarrage moléculaire a été effectué sur une série de 05 composés pour évaluer l'affinité de chacun avec la cible 2AJF. Les composés étudiés ont présenté des affinités différentes avec les récepteurs des protéines. Les meilleures énergies d'interaction, avec la protéase SRAS-CoV-19, ont été observées avec la rutine et l'acide trans cinnamique. Ces dernières peuvent être proposés comme nouveaux antiviraux vue leur potentiel d'inhibition contre le virus sars cov-19.

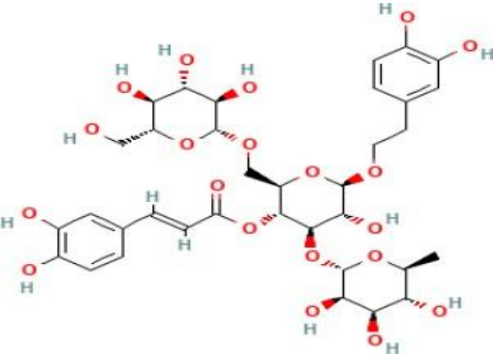
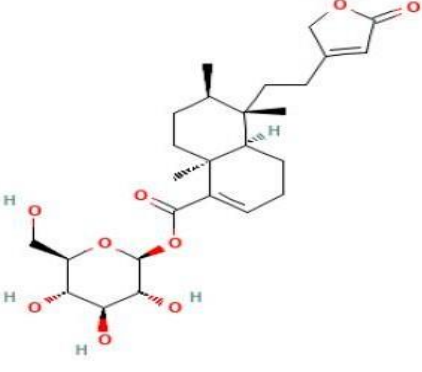
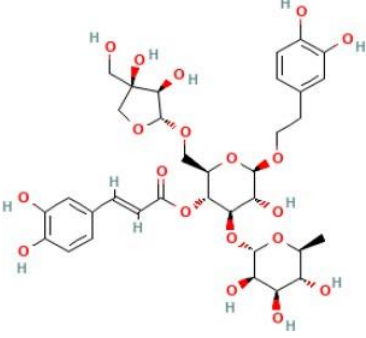
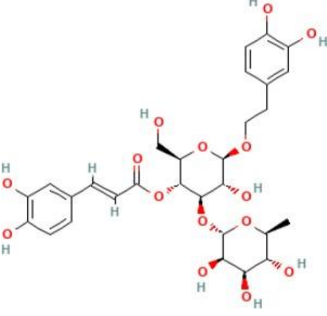
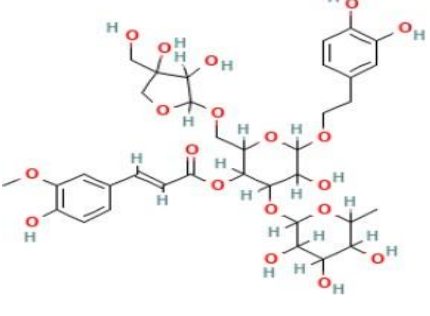
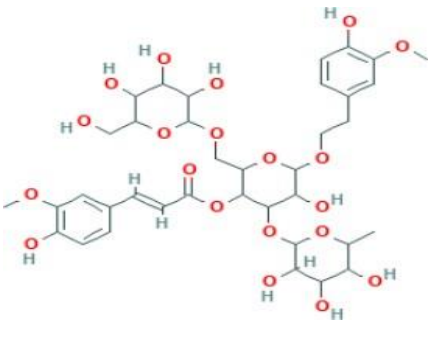
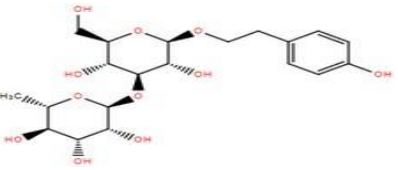
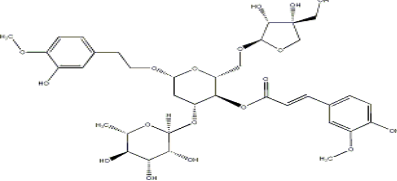
Finalement, on peut conclure que les résultats obtenus au cours de cette étude phytochimique des deux plantes de la région des Aurès étaient satisfaisants, ce qui nous encourage à achever :

- La purification et l'identification structurale de toutes les molécules originales, existantes dans les différents extraits des deux espèces, en utilisant des nouvelles techniques de séparations et d'identification tel que la chromatographie de partage centrifuge et RMN 600.

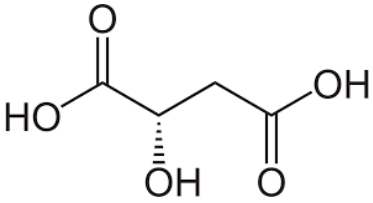
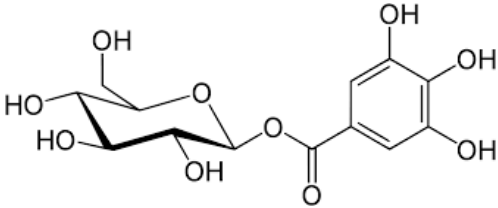
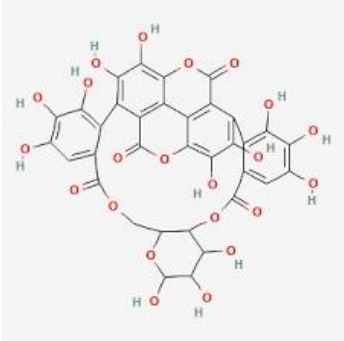
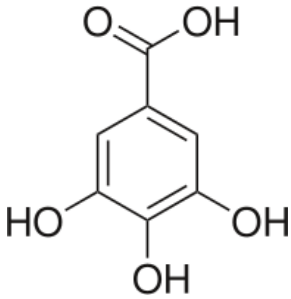
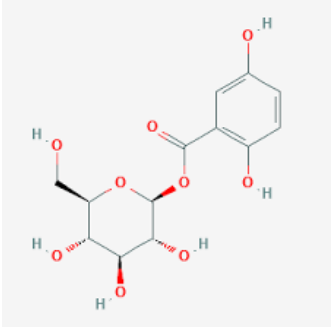
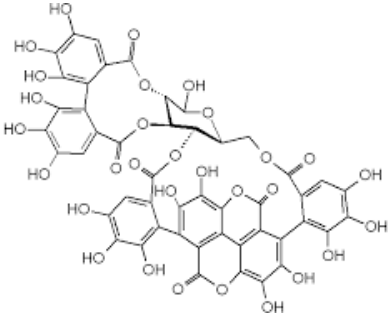
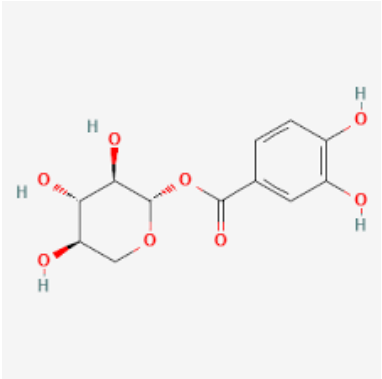
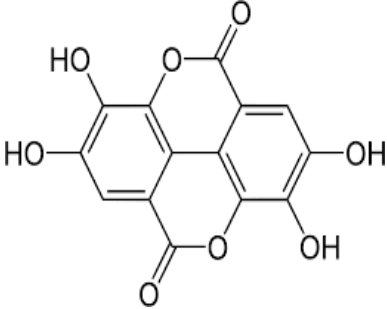
Conclusion générale et Perspectives

- Effectuer des activités in vivo afin de confirmer les activités in vitro étudiées lors de ce travail dans le but de procurer des alternatives naturelles thérapeutiques moins toxique et moins coûteuses.

Annex 1 : Structures des composés identifiés dans l'extrait n-butanol de *M. alysson*.

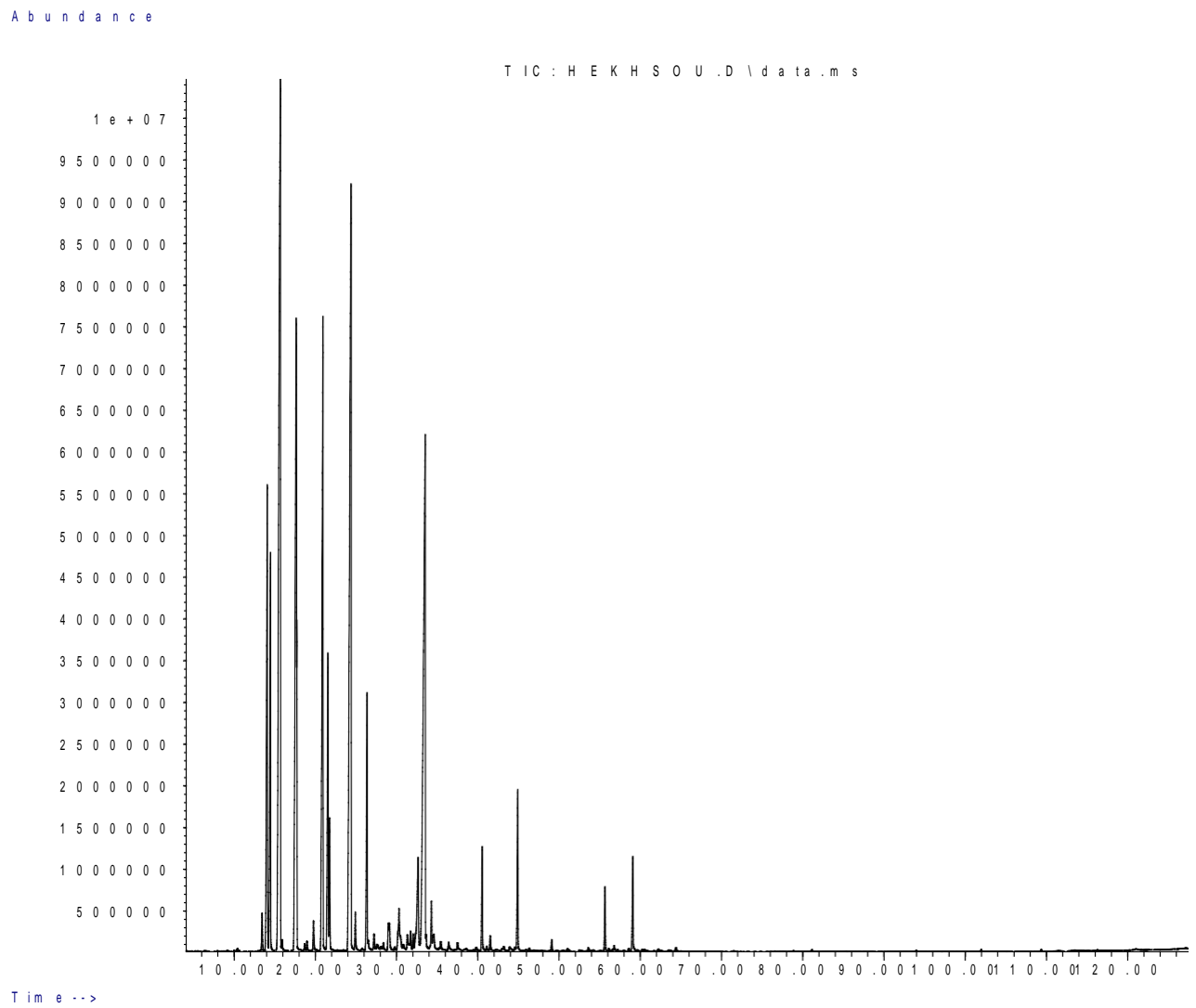
 <p>The structure of Echinacoside is a complex polyphenolic glycoside. It features a central core with multiple hydroxyl groups and is substituted with a p-coumaroyl group and a p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside moiety.</p>	 <p>Marrubiaside is a bicyclic iridoid glycoside. It consists of a bicyclic iridoid core with a p-coumaroyl group attached to the C-1 position and a glucose moiety at the C-3 position.</p>
 <p>Forsythoside B is a polyphenolic glycoside similar to Echinacoside, but with a different substitution pattern on the glucose moiety, specifically a p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside unit.</p>	 <p>Acteoside is a p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside, consisting of a glucose molecule with a p-coumaroyl group attached to the C-1 position.</p>
 <p>Alyssonoside is a polyphenolic glycoside with a p-coumaroyl group and a glucose moiety, and it is substituted with a p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside unit.</p>	 <p>Cistanoside B is a polyphenolic glycoside with a p-coumaroyl group and a glucose moiety, and it is substituted with a p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside unit.</p>
 <p>Cistanoside G is a polyphenolic glycoside with a p-coumaroyl group and a glucose moiety, and it is substituted with a p-coumaroyl-β-D-glucopyranoside unit.</p>	 <p>Leucosceptoside B is a complex polyphenolic glycoside with multiple p-coumaroyl groups and glucose moieties.</p>

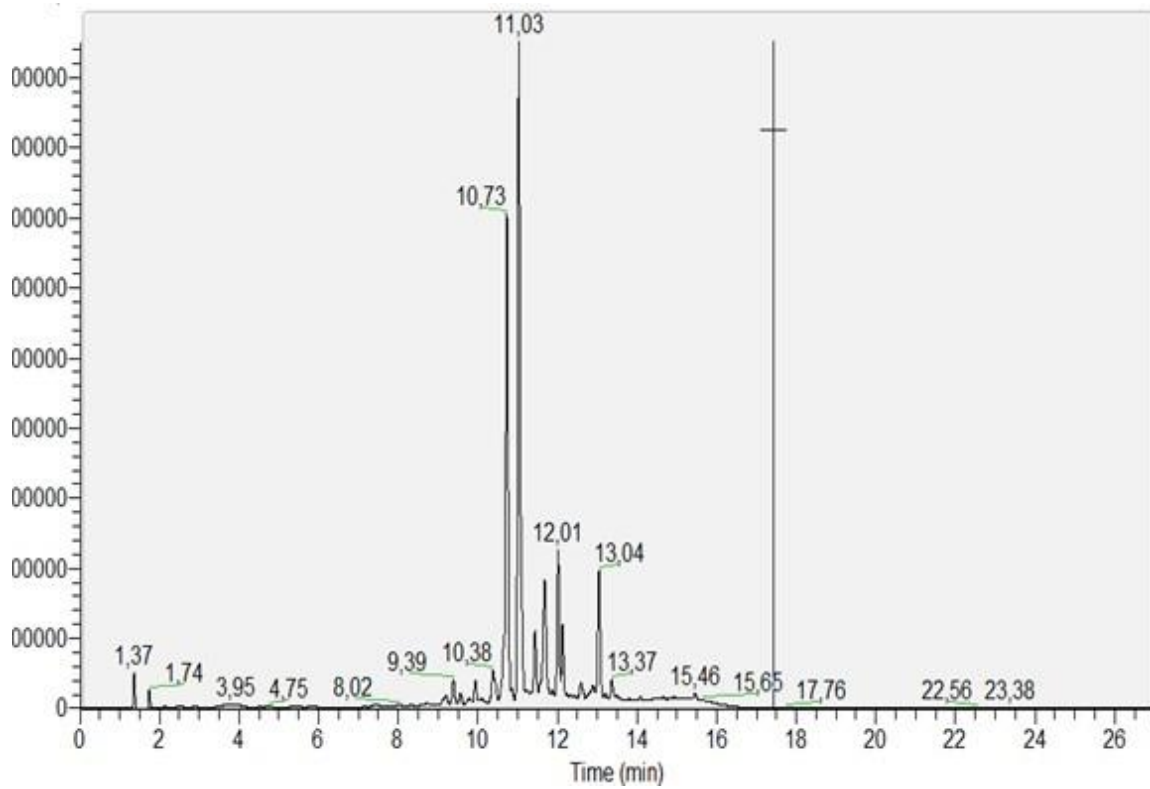
Annex 2 : Structures des composés identifiés dans l'extrait aqueux de *C.clusii*

 <p>Acide malique</p>	 <p>Glucogalline</p>
 <p>Punicaline</p>	 <p>Acide gallique</p>
 <p>Gentisoyl glucoside</p>	 <p>Punicalagine</p>
 <p>Uralennoiside</p>	 <p>Acide ellagique</p>

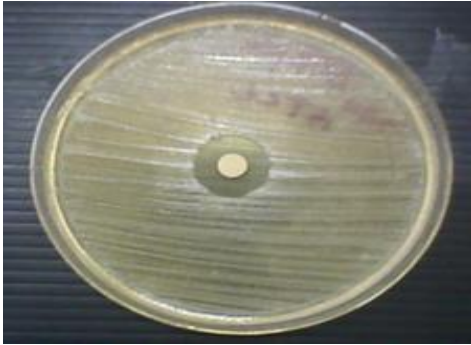
ANNEXE

Annex 3 : Chromatogramme du profil chimique de l'HE de *C. clusii*



Annexe 4 : Chromatogramme de l'extrait n-butanol de l'espèce *M.alysson*

Annexe 5 : Activité antimicrobienne de l'HE de *C. clusii*.



Escherichia coli
(ATCC 25922)



Klebsiella pneumoniae



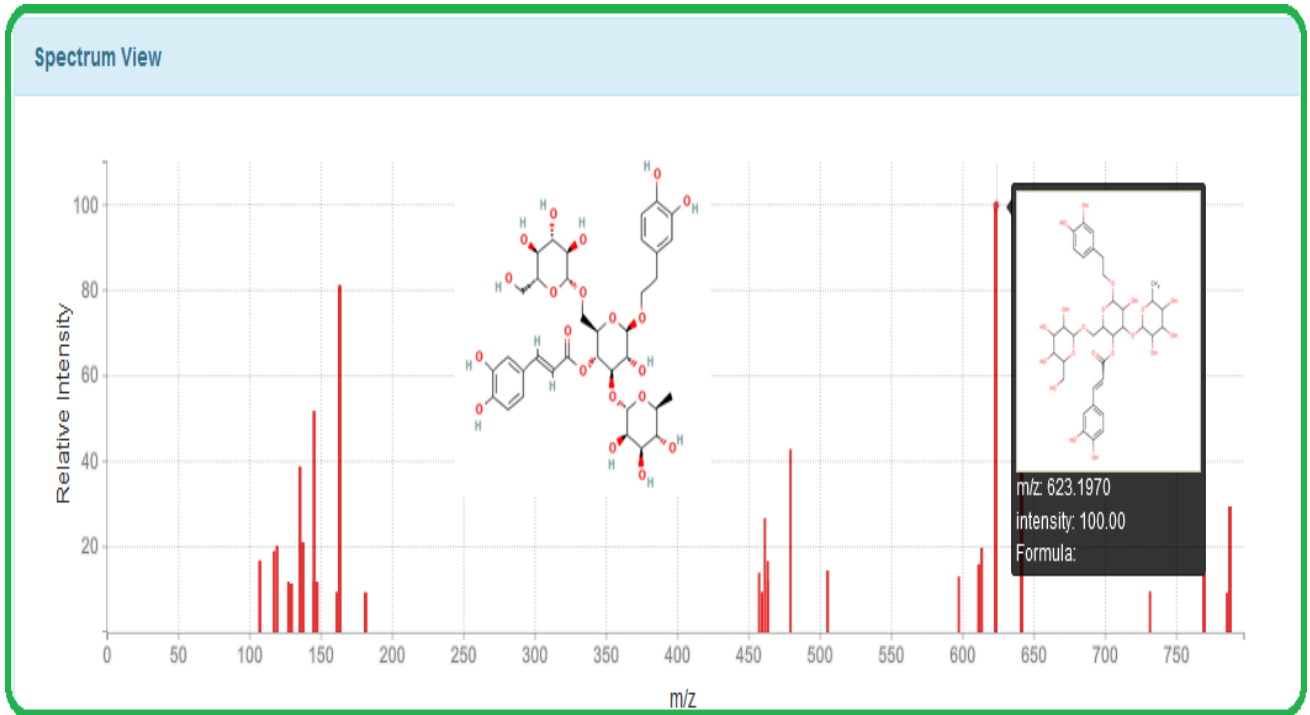
Candida albicans



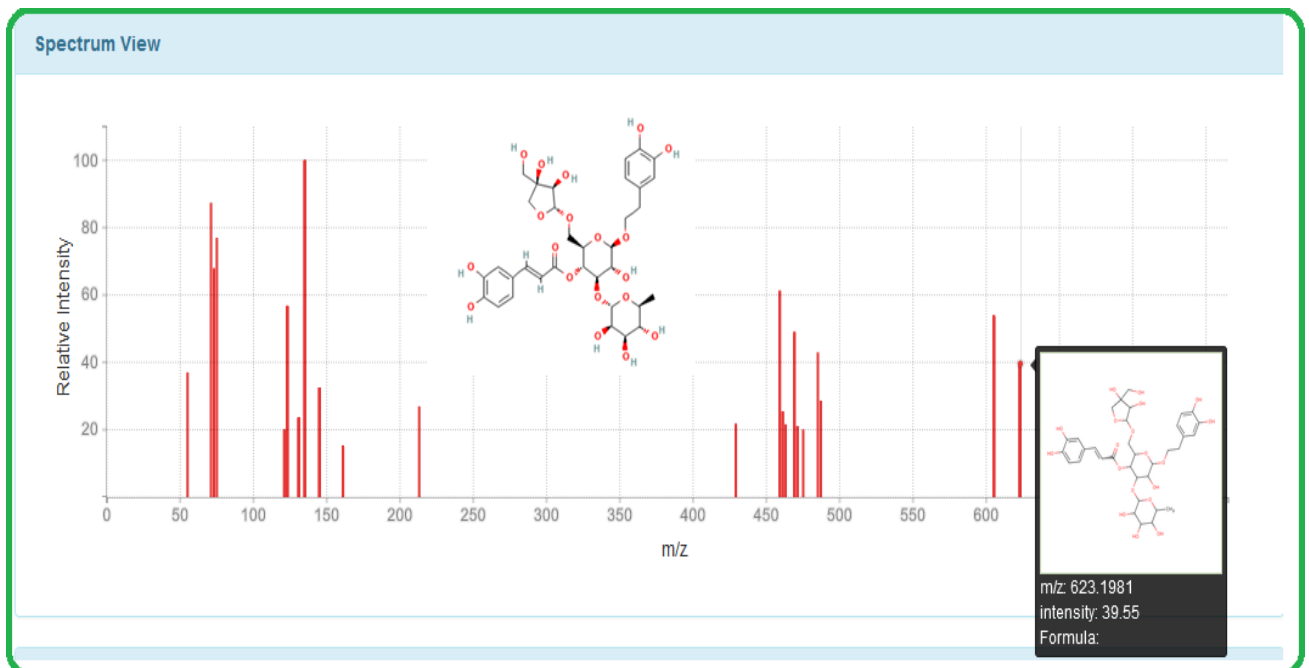
Pseudomonas aeruginosa
(ATCC 27865)

Annexe 6 : Spectres de masse des molécules identifiées.

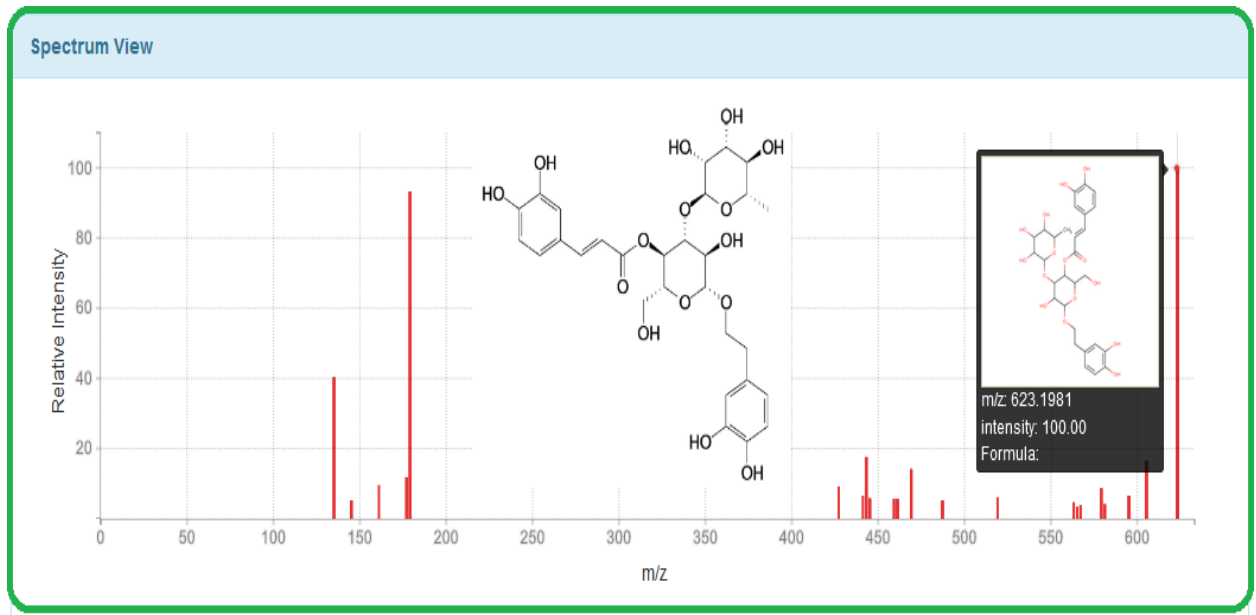
A. Spectre de masse de la molécule echinacoside / base de données HMDB.



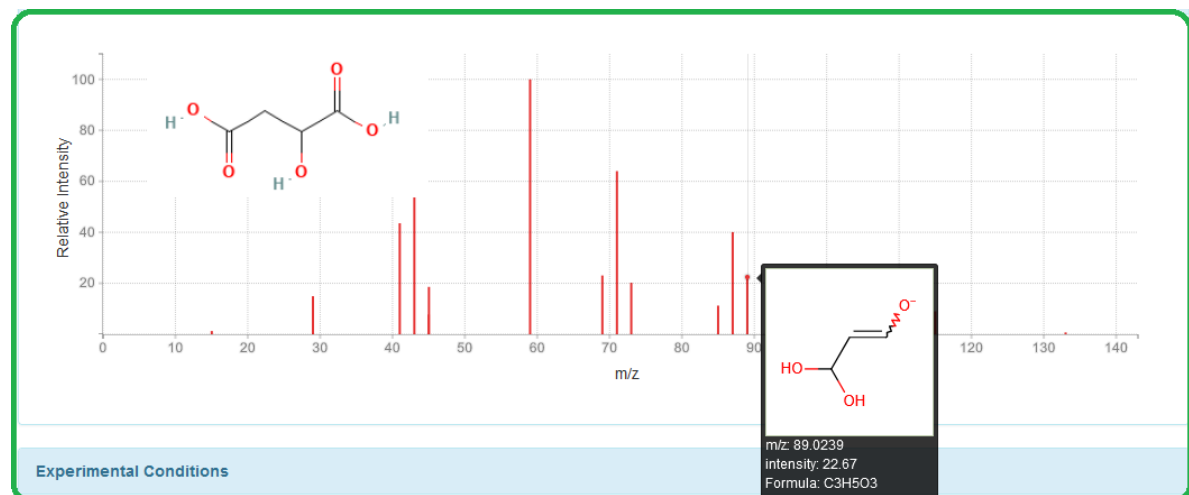
B. Spectre de masse de la molécule forsythoside B / base de données HMDB.



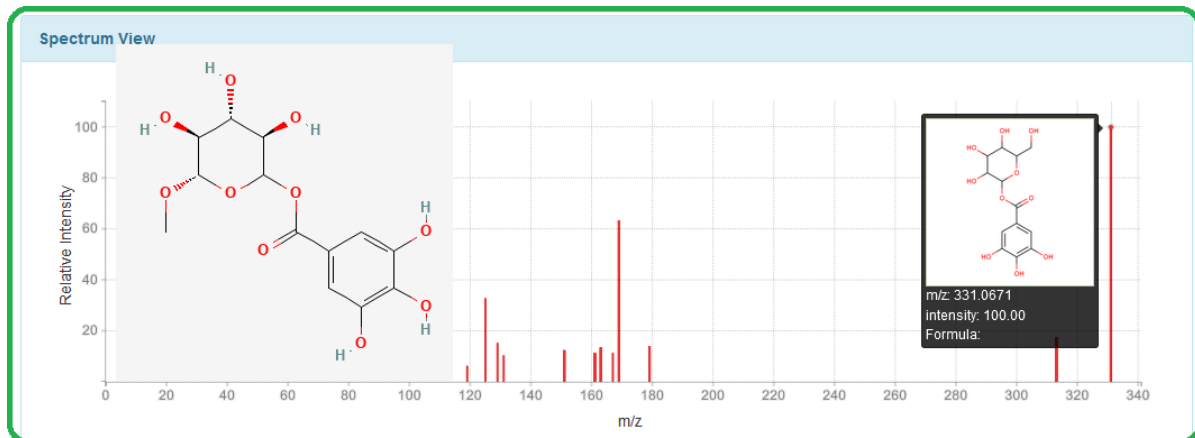
C. Spectre de masse de la molécule acteoside / base de données HMDB.



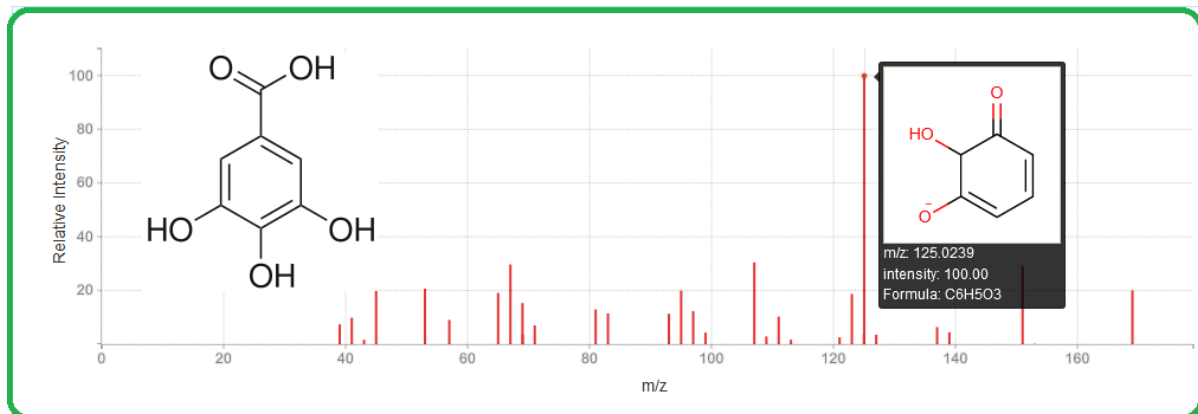
D. Spectre de masse de la molécule acide malique / base de données HMDB.



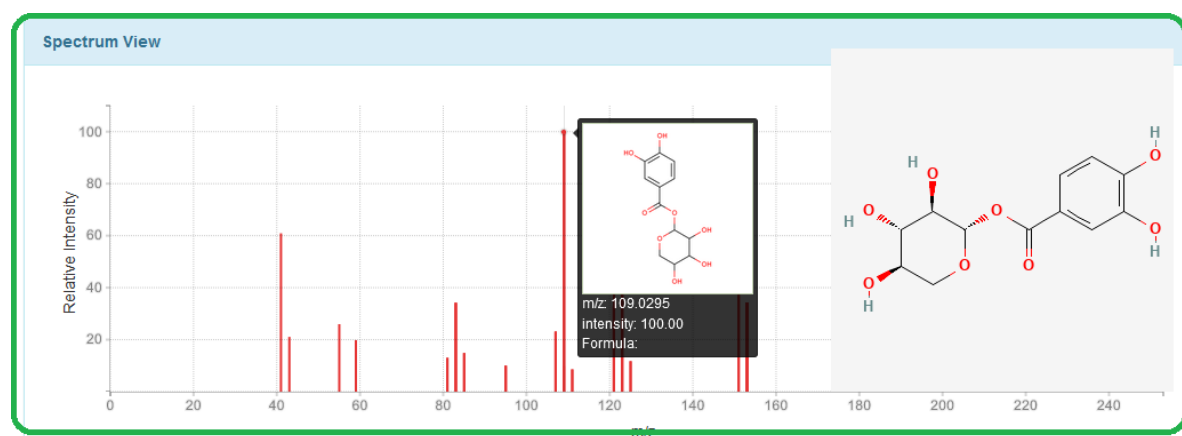
E. Spectre de masse de la molécule glucogalline / base de données HMDB.



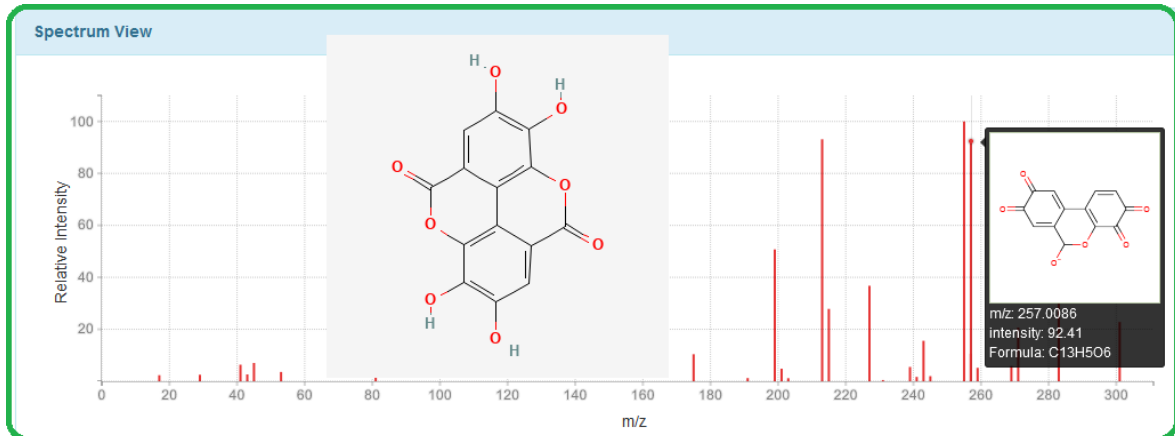
F. Spectre de masse de la molécule acide gallique / base de données HMDB.



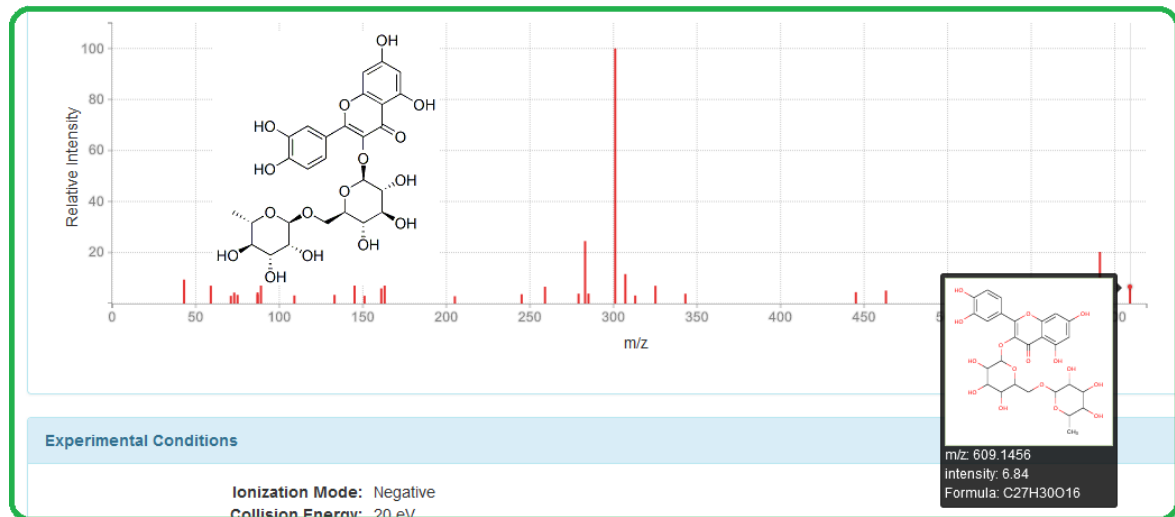
G. Spectre de masse de la molécule urallénoside / base de données HMDB.



H. Spectre de masse de la molécule acide ellagique / base de données HMDB.



I. Spectre de masse de la rutine / base de données HMDB.



ملخص

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو الدراسة الكيمائية النباتية والبيولوجية لمستخلصات مختلفة من الأجزاء الهوائية لنبتين من منطقة باتنة الجزائر *C.clusii* و *M.alysson*

سمح لنا التحليل الكيمائي للزيت العطري لنبات *C.clusii* بواسطة GC / MS بتحديد تركيبة غنية بالتريبينات الأحادية Monoterpenes (78.34%) مع غلبة التريبينات الأوكسجينية Monoterpenes oxygénés (18.78%) ؛ بينما Sesquiterpenes موجودة أيضاً ولكن بنسب أقل (1.9%). المركبات الرئيسية لزيت الأساسي لنبات *C.clusii* هي: Camphène (20.6%) ، Sabinène (12.8%) ، ألفا-تريبينول (13.4%).

وبالمثل ، تم تحديد 06 مركبات (أحماض فينولية ، فلافونويد) في الجزء الأكثر نشاطاً من مستخلص الرتنجي لنبات *C. clusii*. تم التعرف عن هذه المركبات لأول مرة، ولا سيما مستخلص الرتنجي. تم تحديد التركيب الكيمائي بشكل خاص باستخدام تقنية GC / MS لثلاث أحماض فينولية ، تم عزلها من الجزء النشط بيولوجياً من مستخلص الرتنجي لنبات *C.clusii*. تم إجراء تحديد التركيب الكيمائي لهذه الجزينات المعزولة بالإعتماد على مختلف تقنيات التحليل الطيفي و الكروماتوغرافي (GC / MS ، NMR 1H ، C13)

سمح لنا الفحص الكيمائي للمستخلص المائي لنبات *C.clusii* بواسطة UHPLC-MSn بتحديد 14 مركباً ، معظم هذه المركبات هي مركبات الفلافونويد والأحماض الفينولية. تمت دراسة مستخلص البوتانول لنبات *M.alysson* أيضاً بنفس التقنية (UHPLC-MSn) ، وقد أدت هذه الدراسة إلى تحديد 08 مركبات من نوع Phenylethanoid. هذه المركبات هي: Echinacoside ، Forsythoside B ، Acteoside ، Alyssonoside ، Cistanoside B ، Cistanoside G ، Leucosceptoside B.

خصص الجزء الثاني من هذا العمل لتقييم الأنشطة البيولوجية ، وهي: النشاط المضاد للميكروبات ومضادات الأكسدة ، و النشاط insilico المضاد لفيروس كوفيد 19. وقد أظهرت الاختبارات المختلفة التي أجريت أثناء عملنا نتائج مثيرة للاهتمام خاصة بالنسبة لـ:

- مستخلص الرتنجي لنبات *C.clusii* اظهر نشاط مثبط للسلاطات:
- *Staphylococcus aureus* ($22 \pm 1.0\text{mm}$) و *Candida albicans* (0.50 ± 24.0)
- أظهر مستخلص البوتانول لنبات *M.alysson* نشاطاً مثيراً للاهتمام كمضاد للأكسدة من خلال الاختبارات الثلاثة (DPPH ، CUPRAC ، بيتا كاروتين).
- أظهرت الأحماض الفينولية المعزولة من مستخلص الرتنجي من الأجزاء الهوائية من *C. clusii* (حمض ترانس سيناميك وحمض الكافيين وحمض بنزويك P-hydroxy) نشاطاً مثيراً للاهتمام ضد فيروس SARS-CoV-2

الكلمات المفتاحية

احماض فينولية ، مستخلص راتنج ، زيوت أساسية ، مضاد للأكسدة ، ضد ميكروبية *M.alysson*, *phénylethanoids* ، *C. clusii*، UHPLC-MSn، GC/MS، RMN ، النشاط المضاد SAR-COV-19

Résumé

L'objectif essentiel de ce travail est l'étude phytochimique et biologique des différents extraits des parties aériennes de deux plantes algériennes de la région de Batna : *C.clusii* et *M.alysson*. L'analyse par GC/MS du profil chimique de l'huile essentielle de *C.clusii* nous a permis d'identifier une composition riche en mono terpènes (78.34 %) avec une prédominance des Monoterpènes oxygénés (18.78%), tandis que les Sesquiterpènes sont aussi présents mais en plus faibles proportions (1.9 %). Les composés majoritaires de l'huile essentielle de *C.clusii* sont : le Camphène (20.6%), Sabinène (12.8%), et α -Terpinéol (13.4%). De même, 06 composés (acides phénoliques et flavonoïdes) ont été détectés dans la fraction la plus active de l'exsudat de *C. clusii* (F3). De cette dernière on a pu isoler trois acides phénoliques (acide trans-cinnamique, acide p-hydroxy benzoïque et l'acide caféique). La détermination structurale de ces molécules isolées a été réalisée par combinaison des méthodes chromatographiques et spectroscopiques (GC/MS, RMN ^1H , ^{13}C). L'investigation phytochimique de l'extrait aqueux de l'espèce *C.clusii* par UHPLC-MSn, nous a permis d'identifier 14 composés. La majorité de ces composés sont des flavonoïdes et des acides phénoliques. L'extrait butanolique de l'espèce *M.alysson* a été aussi étudié par la même technique (UHPLC-MSn) qui nous a conduit à identifier 08 composés de type Phénylétanols, il s'agit de : Echinacoside, Forsythoside B, Acteoside, Alyssonoside, Cistanoside B, Cistanoside G et Leucosceptoside B.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation, in vitro et in silico, des activités biologiques à savoir : l'activité antimicrobienne, antioxydante et l'activité anti covid 19. Les différents tests réalisés ont montré des résultats intéressants notamment pour :

- Les extraits aqueux et la fraction de l'exsudat de la plante *C.clusii* (F3) qui ont présenté des diamètres d'inhibitions remarquables des souches : *Staphylococcus aureus* ($22\pm 1,0\text{mm}$), et *Candida albicans* ($24,0\pm 0,50$).
- L'extrait butanolique issu de l'espèce *M.alysson* a manifesté une activité antioxydante intéressante avec les trois tests (DPPH, CUPRAC et β -carotène).
- Les acides phénoliques isolés de l'exsudat des parties aériennes de *C.clusii*, (l'acide trans-cinnamique, l'acide caféique et l'acide P-hydroxy benzoïque) ont montré une activité intéressante contre le virus SARS-CoV-2.

Mots clés : *M.alysson*, *C. clusii*, UHPLC-MSn, GC/MS, RMN, Exsudat, acides phénoliques, phénylétanols, Huiles essentielles, antimicrobienne, antioxydante, in-silico, anti-covid 19.

Abstract

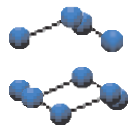
The aim of this study is to determine the phytochemical profiles and biological activities of different extracts of the aerial parts of two Algerian plants from the Batna region: *C.clusii* and *M.alysson*. The GC/MS analysis of the chemical profile of the essential oil of *C.clusii* led us to identify a composition which is rich in monoterpenes (78.34%) with a predominance of oxygenated Monoterpenes (18.78%), while the Sesquiterpenes are also present but in lower proportions (1.9%). The major compounds of *C.clusii* essential oil are: Camphene (20.6%), Sabinene (12.8%), and α -Terpineol (13.4%). likewise, 06 compounds (phenolic acids and flavonoids) were detected in the most active fraction of the exudate of *C.clusii* (F3). From this last, we were able to isolate three phenolic acids (trans-cinnamic acid, p-hydroxy benzoic acid and caffeic acid). The structure elucidation of the isolated molecules was carried out by combining of different chromatographic and spectroscopic methods (GC/MS, NMR ^1H , ^{13}C). The phytochemical investigation of the aqueous extract of the *C.clusii* plant by UHPLC-MSn, permitted us to identify 14 compounds. The majority of these compounds are flavonoids and phenolic acids. The butanol extract of the *M.alysson* plant was also studied by the same technique (UHPLC-MSn) which led us to identify 08 compounds of the Phenylethanoid, which are: Echinacoside, Forsythoside B, Acteoside, Alyssonoside, Cistanoside B, Cistanoside G and Leucosceptoside B. The second part of this work concern the evaluation of biological activities (in vitro and in silico) namely: antimicrobial, antioxidant and anti-covid 19 activities.

The various tests carried out have shown interesting results in particular for:

- The aqueous extracts and the fraction (F3) of the *C.clusii* exudate which presented remarkable diameters of inhibition for the strains: *Staphylococcus aureus* ($22 \pm 1.0\text{mm}$), and *Candida albicans* (24.0 ± 0.50).
- The butanol extract of the *M.alysson* plant showed an interesting antioxidant activity with the three tests (DPPH, CUPRAC and β -carotene).
- The phenolic acids isolated from the exudate of the aerial parts of *C.clusii* (trans-cinnamic acid, caffeic acid and P-hydroxy benzoic acid) have demonstrated a powerful antiviral activity against the SARS-CoV-virus 19.

Keywords: *M.alysson*, *C.clusii*, UHPLC-MSn, GC/MS, NMR, Exudate, phenolic acids, phenylethanoids, essential oils, antimicrobial, antioxidant, in-silico, anti-covid 19.

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

Phytochemical Profile, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Cistus clusii* Essential oil From Algeria

Souad Khebri^{1,2}, Naima Benkiki¹, Mouloud Yahia¹ and Hamada Haba^{3,*}

¹Biotechnology's Laboratory of the Bioactive Molecules and the Cellular Physiopathology, Faculty of the Sciences of Nature and Life, University of Batna-2, Batna, Algeria; ²Centre of Research in Physical and Chemical Analysis (CRAPC), PO BOX 384 Algiers, 42004 Tipaza, Algeria; ³Laboratory of Chemistry and Environmental Chemistry (L.C.C.E), Department of Chemistry, Faculty of Matter Sciences, Batna-1 University, Batna, Algeria

Abstract: Objective: In this work, we investigated the chemical composition and the antioxidant and antimicrobial activities of the Algerian *Cistus clusii* Dunal essential oil.

Methods: *Cistus clusii* essential oil has been extracted using hydrodistillation method and characterized by GC/MS. The antioxidant activity was evaluated by two different methods DPPH free radical scavenging, and β -carotene bleaching test. The antimicrobial activity was carried out using disc diffusion method against reference strains; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27865), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), clinical bacterial (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*) and fungal (*Candida albicans*) isolates.

Results: The chemical profile of the oil showed 31 compounds. This profile was dominated by the presence of monoterpene hydrocarbons (78.4%), oxygenated derivatives (18.8%) and sesquiterpene hydrocarbons as minor constituents of this essential oil (1.9%). The major constituents were Camphene (20.6%), γ -Terpinene (16.5%), Sabinene (12.8%), and Terpineol-4 (13.5%). Other compounds were found in moderately good amounts like α -Terpinene (8.9%), α -Thujene (5.9%), α -Pinene (4.2%), and α -Terpinolene (3.1%). The results of the antimicrobial activity showed that the highest activity was observed against *C. albicans* and it was higher than positive control Fluconazole. The essential oil exhibited a strong antioxidant activity, especially in the β -carotene system.

Conclusion: This study indicates that *Cistus clusii* essential oil showed potent antioxidant and moderate antimicrobial activities which could be used to explain the use of this species in traditional medicine.

Keywords: *Cistus clusii*, GC/MS, *Candida albicans*, clinical strains, essential oil, antibacterial agents.

1. INTRODUCTION

Cistaceae family comprises eight genera and the genus of *Cistus* includes 180 species [1]. This family is represented by various species such as *C. albidus*, *C. monspeliensis* and *C. clusii*. Some of these species are distributed over the Mediterranean area. The plants of Cistaceae family have gained high biological interest, and numerous species are widely utilized in traditional folk medicine for their diverse biological activities [2] such as anti-inflammatory, anti-ulcerogenic and antimicrobial, and also they are used for the treatment of diarrhea, as general remedies for several skin diseases and as an anti-infection agent [3, 4].

Aromatic and medicinal plants generate a large mixture of volatile terpene hydrocarbons and their oxygenated derivatives known as essential oils. These have been widely

used for their biological properties; such as antibacterial agents, antifungal and insecticidal activities [5].

Previous studies performed on *Cistus* plants have been paying attention to the essential oil composition, due to the importance of its volatile fraction in the perfumery industry [6].

Numerous studies have reported the chemical composition of *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus ladaniferus*, and *Cistus munbyi* essential oils [7-9]. However, no studies have analyzed the composition of Algerian *Cistus clusii* essential oil.

The present study investigates the chemical composition and evaluates the antimicrobial and antioxidant activities of Algerian *Cistus clusii* Dunal essential oil for the first time.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

Cistus clusii Dunal plant was collected during the flowering stage in June 2012 on Djerma Mountain (East Algeria).

*Address correspondence to this author at Batna-1 University; Faculty of Matter Sciences; Department of Chemistry. (L.C.C.E) Batna, Algeria; Tel/Fax: +213 33 31 90 09; E-mail: haba.hamada@yahoo.fr

The plant was identified by Professor Oudjih Bachir. A voucher specimen was deposited in the Agronomic Institute of University of Batna-1 Algeria, under the number 210/ISVSA/DA/UHLB1/17.

After drying, the aerial parts (leaves and flowers) were subjected to steam distillation according to the standard method described in the European pharmacopoeia [10]. The yield was 1.0%. The obtained oil was dried by anhydrous sodium sulfate and stored at 4°C until analysis.

2.2. Essential Oil Analyses

GC/MS analyses were performed using an equipment Hewlett-Packard 6890 series GC system) with HP5-MS capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm film thicknesses). The column temperature was firstly kept at 45°C for 8 min, then increased to 250°C at 2°C/min and finally held isothermally for 20 min. GC-MS detection, electron ionization with ionization energy of 70 eV with a scan range of 35-550 atomic mass units. The transporter gas used is the helium at a flow rate of 1.2 ml/min in split mode 1:50 with 0.2 μl volume of injection. Detector and injector temperatures were set at 280 and 250°C, respectively. The temperature of the ion source was 230°C. The compounds were identified by comparison of their mass spectra with those of the data bank mass Spectra (Wiley 7N and NIST 2002 libraries) and also by comparing their retention indices to a series of n-hydrocarbons (C7-C28) with literature standards [11].

2.3. Antimicrobial Activity

Antimicrobial activity tests were carried out against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27865), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), clinical strains; *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* bacteria and *Candida albicans* yeast. Two methods were used to test the antimicrobial activity using agar disc diffusion method, and agar dilution method.

Antimicrobial activity of *Cistus clusii* essential oil was performed using disk agar diffusion method [12]. A suspension of tested microorganism sample was diluted in 0.85% NaCl sterile solution, and adjusted to 0.5 McFarland. Then each suspension of test microorganisms was swabbed on a solid agar medium in Petri dishes (Mueller-Hinton agar). Filter paper discs (6 mm in diameter) were absorbed with 10 μl of sterile essential oil and placed on the medium of the inoculated plates, after that, the plates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria, and at 30°C for yeasts. The antimicrobial activity was assessed by measuring the diameter (mm) of the growth inhibition zones. All tests were measured in triplicate. Gentamicin 30, and Fluconazole were used as positive controls.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values were evaluated using the agar dilution method [13]. Briefly, dilution of the essential oils, Tween-20, were prepared and incorporated into the agar after autoclaving, tween-20 was used to increase the solubility of the oil in the medium. After that Petri plate containing different concentrations of essential oil was inoculated with various tested microorganisms, containing approximately 10⁵ CFU of each organism. Then the plates test and control were incubated for 24 h for bacteria at 37°C, 48 h for yeasts at 30°C. MIC was determined as

the lowest concentration of the essential oil inhibiting visible organism growth.

2.4. Antioxidant Activity

2.4.1. Chemicals

DPPH, linoleic acid, and β-carotene were purchased from Fluka, Butylated Hydroxytoluene (BHT) was obtained from Sigma. The chemical solvents used in this investigation were of analytical grade.

2.4.2. DPPH Assay

The antioxidant activity was assessed by DPPH radical scavenging test. The free, stable radical DPPH (purple color) able to react with antioxidant molecules to give yellow color, the absorbance was measured at 517 nm to determine the percentage of antiradical activity [14]. Essential oil, standard antioxidant (BHT), and DPPH (0.004%) solution were dissolved in methanol, after that 1 ml of the DPPH solution was mixed with 1 ml of various concentrations of the essential oil. The mixture was agitated and incubated in the dark for 30 min. Then, the absorbance was measured at 517 nm against a blank. The antioxidant activity was calculated as percent DPPH radical scavenging, with the following formula:

$$AA = [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100, \text{ where}$$

Abs_{control} represents the absorbance of the control reaction mixture without EO, Abs_{sample} is the absorbance of the sample. After the incubation; all the samples were measured in three replicates.

2.4.3. β-carotene Assay

Antioxidant activity of the essential oil *Cistus clusii* was also carried out by β-carotene/linoleic acid system according to the method reported by Oke *et al.*, [15]. Briefly, a stock solution was prepared by dissolving 0.5 mg of β-carotene in 1 ml of chloroform, 25 μl of linoleic acid and 200 mg Tween 40 were added. Then, the mixture was evaporated to eliminate the chloroform using a vacuum evaporator. The mixture was emulsified in 100 ml of water saturated with oxygen with vigorous shaking. 2.5 ml of this reaction solution was mixed with 350 μl of various concentrations of the essential oil (1-0.4 mg/ml) or reference molecule BHT. The absorbance was measured (t=0) at 490 nm against a blank. Afterward, the samples were incubated for 48h at room temperature, and the absorbance was recorded at different time intervals. All tests were assessed in triplicate. The relative antioxidant capacity was calculated using the following equation:

The (RAC) was calculated using the following equation:

$RAC \% = (Abs_{sample} / Abs_{BHT}) \times 100$, where Abs_{BHT} represents the absorbance of the positive control BHT and Abs_{sample} signifies the absorbance of the essential oil at 48 h.

3. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was assessed using Graph-pad prism 5 software. Data obtained *in vitro* were expressed as mean ± Standard Variation (SD). One way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Dunnet's/Tukey's test was carried out to verify significant differences between the means. P < 0.05 was considered statistically significant.

4. RESULTS AND DISCUSSIONS

4.1. Chemical Composition

The essential oil of *C. clusii* obtained by hydro-distillation was characterized using gas Chromatography- Mass Spectroscopy (GC-MS). Thirty one compounds, representing 99.03% of the total oil, were identified (Table 1).

Table 1. Chemical composition of *C. clusii* essential oil.

RI	Compounds	%
865	Cis-salvene	0.2
926	Tricyclene	0.4
930	α -Thujene	5.9
939	α -Pinene	4.2
953	Camphene	20.6
967	Verbenene	0.1
976	Sabinene	12.8
990	β -Myrcene	0.1
1005	α -phellandrene	0.3
1017	α -Terpinene	8.9
1026	p-Cimene	3.3
1030	β -Phellandrene	1.2
1050	β -Ocimene	0.5
1059	γ -Terpinene	16.5
1088	α -Terpinolene	3.1
1097	Trans-Sabinene hydrate	0.2
1098	Linalool	0.1
1114	β -Thujone	0.1
1139	Trans-Pinocarveol	0.2
1143	Camphor	0.9
1144	Trans-Verbeneol	0.1
1156	Isoborneol	1.9
1189	Terpineol-4	13.5
1193	Myrtenol	0.3
1194	Piperitol isomer	0.1
1239	Cuminic aldehyde	0.1
1285	Isobornyl acetate	1.1
1418	Cis-Caryophyllene	0.1
1521	1S,Cis-Calamene	0.7
1563	β -Calacorrene	0.1
1581	Caryophyllene Oxide	1.0
Monoterpene hydrocarbons	78.3%	
Oxygenated monoterpenes	18.8%	
Sesquiterpenes	1.9%	
Total%	97.3	

RI: Retention indices given in literature (NIST on non-polar HP5MS™ or DB5 capillary column).

The main class compounds were monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes, which were in the ratios of 78.4%, 18.8% and 1.9% respectively. The major compounds (Table 1) in the chemical profile of the oil were Camphene (20.6%), γ -Terpinene (16.5%), Terpineol-4 (13.5%), Sabinene (12.8%), and α -Thujene (5.9%) (Fig. 1). This is the first report of the essential oil profile from Algerian *Cistus clusii*, on the other hand, *Cistus libanotis*, *Cistus meneby*, and *Cistus monspeliensis* were documented in previous studies [7-9].

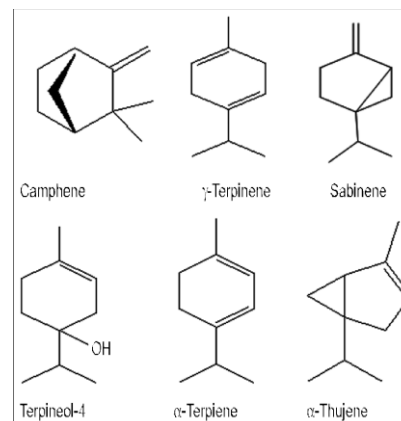


Fig. (1). Major components of *Cistus clusii* essential oil.

The predominance of Camphene, γ -Terpinene, Sabinene, and 4-Terpineol in the essential oil is similar to the other sample species, from which the same components were reported as main constituents with high proportions in *Cistus libanotis* from Morocco and Tunisia [16]. Further components such as Cis-Salvene, Verbenene, Linalool, and Cuminic aldehyde that are specific for our oil were not detected in the other species from Cistaceae family. So, the essential oil of Algerian *C. clusii* offered peculiar qualitative and quantitative profile, compared to the other oils isolated from Cistaceae plants in different countries [17-19].

4.2. Antioxidant Activity

Antioxidant activity of *C. clusii* essential oil was carried out using two techniques DPPH, and β -carotene-linoleic acid. Free radical scavenging properties of the essential oil are presented in Fig. (2). High strongest radical scavenging activity of the oil was shown at 1 mg/ml concentration with (62 \pm 2.1) %, this activity is lower than the standard antioxidant BHT (99.83 \pm 2.8) %. The IC₅₀ values of the essential oil and BHT were 157.3 \pm 8.5 and 6.1 \pm 0.4 μ g/ml respectively. It is very important to indicate that IC₅₀ value of *Cistus clusii* essential oil was higher than BHT, and less than *Cistus libanotis* essential oil which exhibited an IC₅₀ value of 499.9 and 272.5 μ g/ml in DPPH and ABTS assays, respectively [17].

In the system of linoleic acid β -carotene the essential oil possessed a good antioxidant effect (84 \pm 2.1) % at the same concentration (1 mg/ml) Fig. (3). The antioxidant activity of the essential oil was noticeably significant with increased dose dependence in two studied test systems, but the activity was lesser than the positive control BHT.

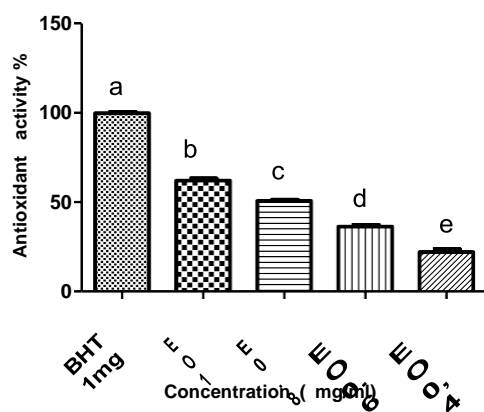


Fig. (2). Antioxidant activity of *C. clusii* EO and BHT in DPPH Test (values are means of three triplicate \pm SD), bars with different letters indicate activities significantly different ($p < 0.05$).EO: Essential oil.

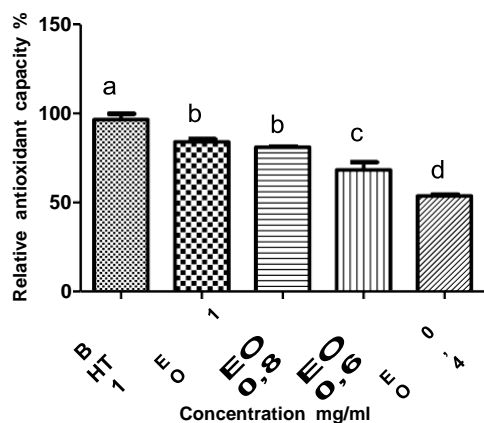


Fig. (3). Relative antioxidant Capacity of *C. clusii* EO and BHT in β carotene /linoleic acid system (values are means of three triplicate \pm SD), bars with different letters indicate activities significantly different ($p < 0.05$). EO: Essential oil.

Several studies have revealed that the bioactivity of essential oils is dependent on the total compounds including minor and major components [20]. Choi *et al.* (2000) reported that γ -Terpinene, Terpinolene, and Geraniol have much higher antioxidant effect than that of Trolox (84.7%, 227.9 mg of Trolox equiv/mL) [21]. Another study reported by Quintans-Júnior *et al.* revealed that Camphene component demonstrated a powerful scavenging activity against different free radicals (TBARS and TRAP/TAR assays) [22]. Therefore, the combination of Camphene, γ -Terpinene and other antioxidant terpenoids present in the essential oil of *Cistus clusii* could justify its effect as a good antioxidant agent in DPPH and β -carotene assays.

Based on these results, we can suggest that the antioxidant potency of *Cistus clusii* essential oil is due to the Camphene, α -Terpinene, Terpeneol-4, and other monoterpenes present in our oil with high percentage. However, the other minor component could interfere with synergistic effect on the antioxidant activity of the essential oil of *C. clusii*.

4.3. Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of the essential oil of *C. clusii* against microorganisms was estimated in this study and its potency was evaluated by the measurement of the inhibition zones diameter, and MIC values of microorganisms, including three reference bacteria, three clinical isolated bacteria, and one yeast called *Candida albicans*. According to the results shown in (Table 2), the essential oil of *Cistus clusii* displayed a good potential antimicrobial effect against *Candida albicans*. The largest inhibition zones and MIC values for bacterial strains, which were sensitive to the essential oil, were in the range of 20.6 ± 1.2 - 11 ± 0.5 mm and 125-250 μ g/ml, respectively. We detected a resistance of the *Pseudomonas aeruginosa* strain tested against *Cistus clusii* oil. This resistance can be explained by the nature of the membrane surface which is composed of lipopolysaccharides forming

Table 2. The *in vitro* antimicrobial activity of *Cistus clusii* EO.

Microorganisms	EO (10 μ l)		GENT	FLC
	DD (mm)	MIC μ g/ml	DD (mm)	DD (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	20.6 ± 1.2	125	25.3 ± 0.5	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	9.6 ± 0.5	250	20.3 ± 0.5	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27865)	8.3 ± 0.5	ND	16.3 ± 0.5	-
<i>Clinical strains</i>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 ± 0.5	250	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	11 ± 0.5	250	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	19 ± 0.5	125	20.3 ± 1.2	-
<i>Candida albicans</i>	20 ± 00	125	-	18 ± 00

Values are means \pm SD of three duplicates. DD: Diameter of inhibition zone including disc diameter of 6 mm, Positive controls used: Gentamicin 30, FLC: Fluconazole . ND: not determined.

particularly an impervious barrier to hydrophobic compounds and can probably inactivate the essential oil or some antimicrobial agents [23].

We can also note that the most sensitive microorganisms are the Gram positive bacteria. The obtained results are in agreement with previous studies reported in the literature, which confirmed that the essential oils are most active against Gram-positive bacteria than Gram-negative ones [23, 24].

The correlation between the antimicrobial activity of *Cistus clusii* EO and their chemical profile can be attributed to the main compounds found in the oil such as Camphene, Terpineol-4, Sabinene and γ -Terpinene. On the other hand, Isobornyl acetate, Caryophyllene oxide and β -Caryophyllene detected in a small proportion compared to the percentage of the main compounds which can also affect the antimicrobial activity. Moreover, it is known that many studies suggested that the compounds present in the highest proportions in the essential oil are not usually responsible for most of the total antimicrobial activity. Furthermore, the influence of the less plentiful compounds should affect the antimicrobial activity. So, the activity could be due to the presence of minor compounds or at a synergistic effect between minor and main components [25-27]. Thakre *et al.* (2010) reported that Camphene demonstrated powerful antifungal activity against *Candida albicans*, by affecting the membrane integrity as terpenoids are known to cause cell wall and membrane damage. This result could justify the reason why the oil of *Cistus clusii* rich on camphene component (20.6%) demonstrated a stronger antifungal activity [28].

CONCLUSION

The obtained findings from this study showed that the essential oil of *Cistus clusii* growing in Algeria comprises a high percentage of monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes, which explain its radical scavenging potency, and especially the antioxidant effects in the system of β -carotene. The most predominant compounds in *C. clusii* are Camphene, γ -Terpinene and 4-Terpineol. Furthermore, the essential oil possesses significant antimicrobial activity, particularly against *Candida albicans* yeast. These biological activities are due to its chemicals profile such as Camphene, γ -Terpinene and Sabinene. Therefore, this plant may be useful for the treatment of oxidative stress diseases.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their deepest gratitude to the general Directorate for Scientific Research and Technological Development (DGRSDT) of the Algerian Minister of Higher Education and Scientific Research and also the authors wish to express thanks to the Centre of Research in Physical and Chemical Analysis (CRAPC) for providing a research contribution.

REFERENCES

- [1] Papaefthimiou, D.; Papanikolaou, A.; Falara, V.; Givanoudi, S.; Kostas, S.; Kanellis, A.K. Genus *Cistus*: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem.*, **2014**, *2*, 35.
<http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2014.00035> PMID: 24967222
- [2] Frazão, D.F.; Raimundo, J.R.; Domingues, J.L.; Quintela-Sabaris, C.; Gonçalves, J.C.; Delgado, F. *Cistus ladanifer* (Cistaceae): A natural resource in Mediterranean-type ecosystems. *Planta*, **2017**, *247* (2), 289-300.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-017-2825-2> PMID: 29218421
- [3] Bedoya, L.M.; Bermejo, P.; Abad, M.J. Anti-infectious activity in the *Cistaceae* family in the *Iberian Peninsula*. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2009**, *9*(5), 519-525.
<http://dx.doi.org/10.2174/138955709788167600> PMID: 19456283
- [4] Barrajón-Catalán, E.; Fernández-Arroyo, S.; Saura, D.; Guillén, E.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A.; Micol, V. *Cistaceae aqueous* extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48*(8-9), 2273-2282.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060> PMID: 20510328
- [5] Arjouni, M.Y.; Romane, A.; El Fels, M.A.; Boukir, A. El gabr, M. Antioxidant activity and chemical composition of essential oil of *Cupressus atlantica* Gaussen. *Curr. Bioact. Compd.*, **2015**, *11*, 56-60.
<http://dx.doi.org/10.2174/157340721101150804151917>
- [6] Robles, C.; Garzino, S. Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry*, **1998**, *48*, 1341-1345.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01124-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01124-2)
- [7] Bazdi, B.; Dahdouh, A.; Lamarti, A.; Mansour, A.I. Composition of the essential oils of *Cistus ladaniferusand*, *C. monspeliensis* from Morocco. *J. Essent. Oil Res.*, **2005**, *17*, 553-555.
<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2005.9698992>
- [8] Benbelaïd, F.; Khadir, A.; Bendahou, M.; Abdoune, M.A. Muselli.; Costa, J. Composition and antimicrobial activity of *Cistus munbyi* essential oil: An endemic plant from Algeria. *J. For. Res.*, **2017**, *28*(6), 1129-1134.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11676-017-0387-6>
- [9] Robles, C.; Garzino, S. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry*, **2000**, *53*(1), 71-75.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00460-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00460-4) PMID: 10656410
- [10] Council of Europe (COE) - European directorate for the quality of medicines. *European Pharmacopoeia*, 6th ed.; Strasbourg, 2007.
- [11] Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. Allured Publ. Corp.: Carol Stream, IL, **2007**.
- [12] Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.*, **2016**, *6*(2), 71-79.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005> PMID: 29403965

- [13] Bansod, S.; Rai, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World J. Med. Sci.*, **2008**, 3(2), 81-88.
- [14] Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.
<http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
- [15] Oke, F.; Aslim, B.; Ozturk, S.; Altundag, S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem.*, **2009**, 112(4), 874-879.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.061>
- [16] Zidane, H.; Fauconnier, M.L.; Sindic, M.; El Bachiri, A. Comparative study of volatile secondary metabolite of *Cistus libanotis* during different process. *J. Chem. Pharm. Res.*, **2014**, 6, 281-28.
- [17] Loizzo, M.R.; Ben Jemia, M.; Senatore, F.; Bruno, M.; Menichini, F.; Tundis, R. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 59, 586-594.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.040> PMID: 23831310
- [18] Zidan, H.; Elmiz, M.; Aouinti, F.; Tahani, A.; Wathélet, J.; Sindic, M.; Elbachiri, A. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco. *Afr. J. Biotechnol.*, **2013**, 12(34), 5314-5320.
<http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.12868>
- [19] Angelopoulou, D.; Demetzos, C.; Perdetzoglou, D. An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.*, **2001**, 29(4), 405-415.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00071-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00071-5) PMID: 11182488
- [20] Rudbäck, J.; Bergström, M.A.; Börje, A.; Nilsson, U.; Karlberg, A.T. α -Terpinene, an antioxidant in tea tree oil, autoxidizes rapidly to skin allergens on air exposure. *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, 25(3), 713-721.
<http://dx.doi.org/10.1021/tx200486f> PMID: 22250748
- [21] Choi, H.S.; Song, H.S.; Ukedo, H.; Sawamura, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48(9), 4156-4161.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf000227d> PMID: 10995330
- [22] Quintans-Júnio, L.; Moreira, F.C-J.; Pasquali, M.A.B.; Rabie, M.S.; Pires, S.A.; Schröder, R.; Rabelo, K.T.; Santos, J-P.A.; Lima, S.S.; Cavalcanti, S-C.H.; Araújo, S.A.; Quintans, S.S-J.; Gelain, P.D. Antinociceptive activity and redox profile of (+)-Camphene, P-Cymene, and Geranyl acetate in experimental models. *ISRN Toxicol.*, **2013**, ID459530, 11.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/459530>
- [23] Cox, S.D.; Markham, J.L. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *J. Appl. Microbiol.*, **2007**, 103(4), 930-936.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03353.x> PMID: 17897196
- [24] Erkmen, O.; Özcan, M. Antimicrobial effects of essential oils on growth of bacteria, yeasts and molds. *J. Essent. Oil Bear. Plants.*, **2004**, 7(3), 279-287.
<http://dx.doi.org/10.1080/0972-060X.2004.10643408>
- [25] Stappen, I.; Alib, A.; Tabancab, N.; Khanb, A.I.; Wannerc, J.; Gochev, V.K.; Singh, V.; Lal, B.; Jaitak, V.; Kaul, V.K.; Schmidt, E.; Jirovetz, L. Antimicrobial and repellent activity of the essential oils of two *Lamiaceae* cultivated in Western Himalaya. *Curr. Bioact. Compd.*, **2015**, 11, 23-30.
<http://dx.doi.org/10.2174/157340721101150804143954>
- [26] Saïdana, D.; Mahjoub, M.A.; Boussaada, O.; Chriaa, J.; Chéraif, I.; Daami, M.; Mighri, Z.; Helal, A.N. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (*Tamaricaceae*). *Microbiol. Res.*, **2008**, 163(4), 445-455.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.07.009> PMID: 17223327
- [27] Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *Int. J. Food Microbiol.*, **2004**, 94(3), 223-253.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022> PMID: 15246235
- [28] Thakre, D.A.; Mulange, V.S.; Kodgire, S.S.; Zore, B.G.; Karuppayil, M.S. Effects of cinnamaldehyde, ocimene, camphene, curcumin and farnesene on *Candida albicans*. *Adv. Microbiol.*, **2016**, 6, 627-643.
<http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.69062>