

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire.

THESE de DOCTORAT de 3ème cycle

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité Valorisation des substances naturelles

Intitulée

Evaluation *in vitro* et *in vivo* des activités antioxydants et anti-inflammatoire des polyphénols et des huiles essentielles extraits de plantes sélectionnées de la région de Mascara: formulation et application

Présentée par : DJELLOULI Soumia

Le : 25/04/2024

Devant le jury :

Président	CHOUTAH Ourida	Professeur	Université de Mascara
Examineur	ABBOUNI Bouziane	Professeur	Université de Sidi Belabes
Examineur	KAHLOULA khaled	Professeur	Université de Saida
Examineur	BELMIMOUN Asmaa	MCA	Université de Mascara
Encadreur	MEDDAH Boumediene	Professeur	Université de Mascara

Année Universitaire : 2023-2024

Remerciement

Ce travail de thèse a été réalisé principalement au Laboratoire de Bioconversion, Ingénierie Microbiologique et Sécurité Sanitaire, Faculté des Sciences Naturelles et de la Vie de l'Université de Mascara, Département de Biologie, sous la direction du Professeur Meddah Boumediene.

J'exprime avant tout ma profonde gratitude aux Professeurs Monsieur **Meddah Boumediene** qui m'ont apporté tout au long de la réalisation de cette thèse.

Je tiens ici à exprimer ma respectueuse gratitude à Mme **Chouitah Ourida**, Professeur à l'Université de Mascara, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider ce jury.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur **Abbouni Bouziane**, Professeur à l'Université de Sidi Bel-Abbas pour sa participation au jury et lui demande d'accepter tout ma gratitude et qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

Je tiens également à remercier le Professeur **Kahloula Khaled**, pour l'intérêt qu'il a voulu porter à ce travail en acceptant de participer à ce jury. .

Je suis très reconnaissant à Dr **Belmimoun Asmaa** d'avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Je remercie le Professeur **Bouhedda Youcef** de l'Université de Mascara de m'avoir accueilli dans leur laboratoire pour réaliser des analyses chromatographiques GC-MS

Je tiens à remercier le Professeur **Rebiai Abdelkarim** de l'Université de Biskra pour m'avoir aidé avec les analyses chromatographiques HPLC

Je tiens particulièrement à remercier le Professeurs **Elouissi Abdelkader** de l'Université de Mascara pour sa disponibilité et pour avoir mené les analyses statistiques.

Je remercie également le **Dr Boudechiche** et son équipe pour avoir réalisé les analyses biochimiques.

J'exprime également mes sincères remerciements aux **Dr Slimani Khaled** pour m'avoir aidé dans l'interprétation des analyses radiologiques.

Je tiens à remercier **Dr Oualid Ahmed Tewfik** leur encouragement et disponibilité

Je remercie **Mr Bekhtiar Djamel** pour m'avoir faire la carte géographiques des sites de récoltes

Je remercie particulièrement le personnel de l'animalerie pour leur disponibilité particulièrement **Mr Bouslah Azize**

Je remercie tous les personnes travaillant dans les laboratoires SNV de l'Université de Mascara, pour leur disponibilité et du toute personne ayant contribué directement ou indirectement à la réalisation de ces travaux

Dédicace

JE DEDIE CETTE THESE

A mes très chers parents,

Je ne savais pas comment exprimer mes sentiments pour leur sacrifice,
patience, encouragement, l'expression de mon profond respect

A mon cher frère, que Dieu lui fasse miséricorde

A mon mari pour sa solidarité et sa patience

A mes chers frères Boubaker, Ismail, Hamid, Zakaria

A mes adorables sœurs Sabria, Faiza et Imène

A mes chères filles Nour el houda, Malek, Meriem et fatima.

A mes amies : Kenza, Amina, Zahira, Insaf, Fatima.

TABLE DE MATIERE

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

Résumé

Abstarac

الملخص

Introduction générale 1

PARTIE I: Rappel bibliographique

Chapitre I : Métabolites secondaires

I.1. Définition 3

I.2. Métabolites secondaire contenant de l'azote 4

I.3. Polyphénols 4

I.3.1. Définition 4

I.3.2. Classification et structure chimique 4

I.3.3. Biosynthèse des polyphénols 5

I.3.4. Polyphénols et santé humaine 6

I.4. Terpènes 7

I.5. Huiles essentielles 7

I.5. 1. Biosynthèse des huiles essentielles 8

I.5.2. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles 11

I.5.2.1. Méthodes d'extraction conventionnelles 12

I.5.2.2. Innovation dans les méthodes d'extraction 13

I.5.3. Huiles essentielles et santé humaine 14

Chapitre II: Activité biologique des métabolites secondaire

II.1. Activité antioxydante 15

II.1.1. Le stress oxydant 15

II.1.2. Espèces réactives oxygénées (ERO)	15
II.1.3. Différents types de radicaux libres	15
II.1.4. Dommages oxydatifs des radicaux libres	18
II.1.4.1. Oxydation de l'ADN	18
II.1.4.2. Peroxydation lipidique	18
II.1.4.3. Oxydation des protéines et des acides aminés.....	20
II.1.5. Les antioxydants	20
II.1.5.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes	22
II. 2. Activité anti-inflammatoire	25
II.2.1. L'inflammation	25
II.2.2.1. Inflammation aigue.....	26
II.2.2.2. Inflammation chronique	26
II.2.3. Les médiateurs de l'inflammation	28
II.2.4. Anti-inflammatoires	29
II.2.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	29
II.2.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes (AIS)	30
II.2.4.3. Les anti-inflammatoires naturels	30
Chapitre III: Monographie des plantes étudiées	
III.1. <i>Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus</i>	32
III.1.1. Classement taxonomique	32
III.1.2. Noms communs	32
III.1.3. Distribution	32
III.1.4. Description	33
III.1.5. Activités biologiques et usages traditionnels	34
III.1.5.1. Activité antioxydante	34
III.1.5.2. Activité antibactérienne	35
III.1.5.3. Activité anti-inflammatoire et analgésique	35
III.1.5.4. Hypoglycemic effect	36
III.1.5.5. Effet hypotenseur	36
III.1.5.6. Effet sur la motilité des muscles lisses	36
III.1.5.7. Utilisations traditionnelles	36
III.2. <i>Myrtuss communis</i> L.....	37
III.2.1. Classification phylogénétique	37
III.2.2. Description	38
III.2.3. Habita	39
III.2.4. Usages médicaux et autres	40
III.3. <i>Smyrniium olusatrum</i> L.	41

III.3.1. Taxonomie et noms commun	41
III.3.2. Description	41
III.3.3. Répartition géographique et habitat	42
III.3.4. Usages	43
III.3.5. Activités biologique	44

PARTIE II: Etude expérimentale

Chapitre 1: Matériels et méthodes

1. Objectifs	46
2. Matériels	47
2.1. Matériel végétal	47
2.2. Modèle animal	49
3. Méthodes	49
3.1. Extraction et caractérisation des composés phénoliques	49
3.1.1 Extraction des composés phénoliques	49
3.1.2 Screening phytochimique.....	50
3.1.3. Dosage des composés phénoliques	51
3.1.4. Analyse Chromatographie liquide à haute performance HPLC	53
3.2. Extraction et identification des huiles essentielles	54
3.2.1. Extraction des huiles essentielles	54
3.2.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles par CG-SM.....	55
3.3. Evaluation de l'activité antioxydante	56
3.3.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	57
3.3.2. Activité antioxydante totale (TAC)	58
3.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	59
3.5. Préparation et contrôle de la formulation galénique.....	61
3.5.1. Préparation de la formulation galénique	61
3.5.2. Vérification de la qualité de la pommade	62
3.6. Etude <i>in vivo</i> de la toxicité orale aiguë	60
3.7. Test d'Irritation cutanée primaire	64
3.8. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	66
3.8.1. Répartition des groupes.....	66
3.8.2. Induction et traitement de l'inflammation	67
3.8.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire	68
3.8.4. Sacrifice des animaux et prise de poids des organes	69
3.8.5. Analyse des marqueurs biologiques.....	69
3.8.6. Analyse radiologique	70

4. Analyse statistique.....	71
Chapitre 2: Résultats et discussion	
1. Extraction et caractérisation des composés phénoliques.....	72
1.1. Rendements d'extraction	72
1.2. Screening phytochimique	73
1.3. Dosage des composés phénoliques.....	75
2. Huiles essentielles.....	81
2.1. Rendements et caractéristiques organoleptiques	81
2.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles par CPG/ SM.....	83
3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	97
3.1. Piégeage du radical libre DPPH	97
3.2. Activité antioxydante totale (TAC)	100
4. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	102
5. Toxicité orale aiguë.....	103
6. Préparation et contrôle de la formulation galénique	104
6.1. Vérification de la qualité des formulations galénique	104
6.2. Test d'Irritation cutanée primaire	106
7. Etude de l'activité anti-inflammatoire des formulations galénique <i>in vivo</i>	107
7.1. Evolution du poids corporel et de la température rectale	107
7.2. Evolution de l'œdème.....	109
7.3. Indice de thymus et poids relatif des organes.....	111
7.4. Evaluation des paramètres biochimique	113
7.4.1. La vitesse de sédimentation et taux de la CRP	113
7.4.2. La numération-formule sanguine (NFS)	115
7.5. Analyse radiologique.....	117
Conclusion générale et perspectives.....	120
Références bibliographique.....	122
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	Les principaux types de métabolites secondaires	03
02	Principales classes de polyphénols	05
03	biosynthèse des polyphénols	06
04	Les étapes de la biosynthèse de l'acide mévalonique vers la synthèse des terpènes	08
05	La voie de biosynthèse des MEP générant les terpènes	09
06	Voie de biosynthèse de l'acide shikimique produisant des phénylpropanoïdes	10
07	Voies de biosynthèse des glucosinolates	11
08	Les différentes formes des ERO	16
09	Réactions en chaîne conduisant à la peroxydation lipidique	19
10	Mode de régénération entre alpha-tocophérol et acide ascorbique	24
11	Stade de l'arthrite rhumatoïde	28
12	Mécanismes d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens	30
13	Aire de répartition naturelle de <i>Juniperus oxycedrus subsp. Oxycedrus</i>	33
14	Caractéristiques morphologiques de <i>Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus</i>	34
15	Caractéristiques morphologiques de <i>Myrtus communis</i> L.	38
16	Aire de distribution de <i>Myrtus communis</i>	39
17	Caractéristiques morphologiques de <i>Smyrniium olusatrum</i> L.	42
18	La répartition de <i>Smyrniium olusatrum</i> L.	43
19	Les parties aériennes de <i>Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus</i> <i>Smyrniium olusatrum</i> L. et de <i>Myrtus communis</i> L.	48
20	La carte géographique représentant le site de récolte	48
21	Courbe d'étalonnage d'Acide gallique	51
22	Courbe d'étalonnage de la catéchine	52
23	Courbe d'étalonnage de la catéchine	53
24	Dispositif d'extraction des huiles essentielles	54
25	Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse de type Shimadzu QP2010	56
26	Mécanisme réactionnel de DPPH	57
27	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	59
28	Toxicité aigüe par voie orale	60
29	Formulation de la pommade hydrophobe 1%	62
30	Induction d'œdème.	67
31	Mesure de diamètre d'œdème	68
32	Chromatogramme d'HPLC d'extrait méthanolique de la partie aérienne de <i>Myrtus communis</i> L.	79
33	Chromatogramme d'HPLC d'extrait méthanolique de la partie aérienne de <i>Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus</i> .	80
34	Chromatogramme d'HPLC d'extrait méthanolique de la partie	80

	aérienne de <i>Smyrniolum olusatrum L</i>	
35	Pourcentage d'inhibition de DPPH par les extraits végétaux	98
36	IC50 des différents extraits et huiles essentielles et de l'acide ascorbique	99
37	Capacité antioxydante totale des différents extraits et des huiles essentielles	101
38	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'albumine d'œuf par les extraits végétaux	103
39	Evolution du poids corporel des rats témoins et traités par les huiles essentielles de <i>M.communis L.</i> , <i>J.oxycedrus ssp oxycedrus</i> et <i>S.olasatrum L.</i> 5000mg/kg de poids corporelle.	104
40	Evolution du poids corporel des rats pendant la période d'expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5)	108
41	Evolution de la température rectale des rats pendant la période d'expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5).	108
42	Evolution de l'œdème des rats induits non traités et traités pendant l'expérimentation	109
43	Pourcentage d'inhibition de l'œdème pendant le traitement. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5).	110
44	Poids relatif des organes. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n=5)	112
45	Indices de la rate et du thymus de rats traités par FHM, FHJ, FHS, diclofénac, placebo et des rat témoins sains (contrôle négatif) et rats induits non traités (contrôle positif) Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)	113
46	Valeurs de la CRP. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)	114
47	Valeurs de la vitesse de sédimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)	114
48	Valeurs de leucocytes et érythrocytes . Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)	115
49	Valeur des plaquettes. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)	116
50	Radiographie des de pattes des rats non traités et traités par FHM, FHJ, FHS, PLC , CTR+ et CTR-	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Les caractéristiques géographiques des régions de récolte.	47
2	Composition de la formulation galénique	61
3	Système de scores de Draize	65
4	Rendements et caractéristiques organoleptiques des extraits bruts	72
5	Criblage phytochimique des extraits végétaux	74
6	Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins totaux	75
7	Le contenu phénolique de <i>M.commnis</i> L., <i>J.oxycedrus</i> ssp <i>oxycedrus</i> et <i>S.olusatrum</i> L. analysé par HPLC-UV	78
8	Rendements et caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraits de partie aérienne des plantes.	82
9	Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extrait à partir de la partie aérienne de <i>Myrtus communis</i> L.	84
10	Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extrait à partir de la partie aérienne de <i>Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus</i> .	88
11	Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extrait à partir de la partie aérienne de <i>Smyrniium olusatrum</i> L	93
12	Les caractéristiques macroscopiques, organoleptiques pH et des formes galéniques FHM, FHJ et FHS (1%).	105
13	Résultats de l'indice d'irritation primaire de la pommade de l'huile essentielle de <i>M. communis</i> L. 1% suivant l'échelle de Draize	106
14	Résultats de l'indice d'irritation primaire de la pommade de l'huile essentielle de <i>J.oxycedrus ssp oxycedrus</i> 1% suivant l'échelle de Draize.	106
15	Résultats de l'indice d'irritation primaire de la pommade de l'huile essentielle de <i>S.olusatrum</i> L. 1% suivant l'échelle de Draize.	107

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR	Association Française de Normalisation
HE	Huile (s) Essentielle (s)
EOA	Espèces oxygénées antioxydants
ERO	Espèces réactives oxygénées
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
CAT	Catalase
Atoh	α -tocophérol transfer protein
SOD	Superoxyde dismutase
TRx	Thiorédoxine
GPx	Glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
PR	Polyarthrite rhumatoïde
COX	Cyclooxygénase
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdiens
AINS	Anti-inflammatoire stéroïdiens
TSB	Milieu liquide aux peptones de caséine et du soja (Tryptic Soy Broth)
TSE	Solution tampon peptonée au Chlorure de sodium
UFC/g	Unité Formant Colonies par gramme de produit
TR	Temps de rétention
ANE	Antioxydant non enzymatique
CRP	Protéine réactive C

Résumé

Les plantes sont utilisées comme médicaments par l'être humain depuis des milliers d'années. Elles forment une source précieuse d'un large éventail de métabolites secondaires, qui sont utilisés produits pharmaceutiques, agrochimiques, aromatisants, parfums, colorants, biopesticides et aliments additifs.

Le présent travail vise à valoriser les substances bioactives : huiles essentielles et extraits phénolique obtenus des trois plantes sélectionnées de la région de Mascara : *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*, *Smyrniium olusatrum L.* et *Myrtus communis L.* Le criblage phytochimique a révélé la richesse de ces plantes en composés bioactifs y compris les polyphénols, les tanins, les saponosides et flavonoïdes. Le dosage colorimétrique des différents composés phénolique a montré que les extraits méthanolique sont riches en composés phénoliques par rapport aux extraits aqueux avec des teneurs maximale en polyphénols et flavonoïdes totaux enregistré par le myrte (201.61 ± 9.4 mg EQ/g et 242.25 ± 0.74 mg EC/g respectivement) suivi par le *S. olusatrum*. En revanche, l'extrait méthanolique de *J. oxycedrus* est dominé par tanins (110.21 ± 2.38 mg EC/g). Cette quantification est confirmée par l'analyse chromatographiques HPLC ou nous avons décelé la prédominance de rutine dans les extraits de myrtes, et de l'acide chlorogénique dans les extraits aqueux et méthanolique de *juniperus* et de *smyrniium*. Le rendement en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation est égal à 0.8% pour les HE de *M. communis* et de *S. olusatrum* et 0.48% pour les HE de *J. oxycedrus*. L'identification chromatographique par CPG-SM a montré que les monoterpènes constituent la quasi-totalité des composés volatils avec la dominance de 1,8 cinéole dans les HE de myrte et l'alpha-pinène dans les HE de *juniperus*, alors que 7-Hydroxynorlumiflavine (2.59%) limonène (1.22%), 1,8-Cineole (0.99 %) sont les constituant majeur des HE de *Smyrniium*. L'activité antioxydante des plantes a été déterminée par deux méthodes: le piégeage du radical libre DPPH et la méthode au phosphomolybdène. Le test de DPPH indique que les huiles essentielles des trois plantes et les EMM et les EMJ ont montré une meilleure activité antioxydant avec des valeurs d'IC50 inférieure à celles enregistré par l'acide ascorbique ($10.34 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$) et le myrte a enregistré un grand pouvoir antiradicalaire.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* indiquent que les huiles essentielles ont un grand pouvoir inhibiteur contre la dénaturation thermique d'albumine d'œuf par rapport aux extraits phénoliques.

L'étude de la toxicité aiguë orale chez les rats Wistar traités par les huiles essentielles n'indique aucune mortalité à la dose de 5 g/kg.

Le pouvoir anti-inflammatoire des pommades formulé à base des huiles essentielle a été étudié *in vivo* chez un modèle d'arthrite induit chez le rat Wistar par injection sous plantaire de formol. Les résultats ont montré une efficacité antiarthritique des formulations géléniques exprimée par la diminution du volume de l'œdème et le rétablissement des valeurs des marqueurs biochimiques (FNS, CRP, VS) avec une certaine différence dans le degré d'influence. L'examen radiologique a révélé l'effet inflammatoire chronique du formol, qui s'étend au-delà du pied vers les genoux chez le rat. Ce phénomène d'arthrose (maladie de l'articulation du genou) a été significativement réduit après un traitement avec des pommades aux huiles essentielles par rapport aux groupes traités avec du diclofénac et un placebo, et la formulation FHS semblait être le meilleur traitement.

Mots-clés : *Myrtus communis L.*, *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*, *Smyrniium olusatrum L.*, polyphénols, huiles essentielles, activité antioxydante, HPLC, GCMS, anti-inflammatoire, formulation galénique.

Abstract

Plants have been used as medicine by humans for thousands of years. They form a valuable source of a wide range of secondary metabolites, which are used in pharmaceuticals, agrochemicals, flavors, fragrances, dyes, biopesticides and food additives.

The present work aims to valorize bioactive substances: essential oils and phenolic extracts obtained from three plants selected from the Mascara region: *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*, *Smyrniium olusatrum L.* and *Myrtus communis L.* Phytochemical screening revealed the richness of these plants in bioactive compounds including polyphenols, tannins, saponosides and flavonoids. The colorimetric dosage of the different phenolic compounds showed that the methanolic extracts are rich in phenolic compounds compared to the aqueous extracts with maximum contents of polyphenols and total flavonoids recorded by myrtle

(201.61 ± 9.4 mg EQ/g and 242.25 ± 0.74 mg EC /g respectively) followed by *S. olusatrum*. On the other hand, the methanolic extract of *J. oxycedrus* is dominated by tannins (110.21 ± 2.38 mg EC/g). This quantification is confirmed by HPLC chromatographic analysis where we detected the predominance of rutin in the myrtle extracts, and chlorogenic acid in the aqueous and methanolic extracts of juniperus and smyrnium. The yield of essential oils obtained by hydrodistillation is equal to 0.8% for the EOs of *M. communis* and *S. olusatrum* and 0.48% for the EOs of *J. oxycedrus*. Chromatographic identification by GC-MS showed that monoterpenes constitute almost all of the volatile compounds with the dominance of 1,8 cineole in myrtle EOs and alpha-pinene in *juniperus* EOs, while 7-Hydroxynorlumiflavin (2.59%), limonene (1.22%), 1,8-Cineole (0.99%) are the major constituents of Smyrnum EOs. The antioxidant activity of plants was determined by two methods: DPPH free radical scavenging and the phosphomolybdenum method. The DPPH test indicates that the essential oils of the three plants and EMM and EMJ showed better antioxidant activity with IC50 values lower than those recorded by ascorbic acid (10.34 ± 0.008 μ g/mL) and myrtle. recorded a great anti-radical power.

The results of *in vitro* anti-inflammatory activity indicate that essential oils have a great inhibitory power against the thermal denaturation of egg albumin compared to phenolic extracts.

The study of acute oral toxicity in Wistar rats treated with essential oils indicates no mortality at a dose of 5 g/kg.

The anti-inflammatory power of ointments formulated with essential oils was studied *in vivo* in an arthritis model induced in Wistar rats by subplantar injection of formalin. The results showed antiarthritic effectiveness of the galenic formulations expressed by the reduction in the volume of edema and the restoration of the values of biochemical markers (FNS, CRP, ESR) with a certain difference in the degree of influence. Radiological examination revealed the chronic inflammatory effect of formalin, which extends beyond the foot towards the knees in rats. This phenomenon of osteoarthritis (knee joint disease) was significantly reduced after treatment with essential oil ointments compared to the groups treated with diclofenac and placebo, and the FHS formulation seemed to be the best treatment.

Keywords: *Myrtus communis* L., *Juniperus oxycedrus* ssp *oxycedrus*, *Smyrnum olusatrum* L., polyphenols, essential oils, antioxidant activity, HPLC, GCMS, anti-inflammatory, galenic formulation.

ملخص

تم استخدام النباتات كدواء من قبل البشر منذ آلاف السنين. أنها تشكل مصدرا قيما لمجموعة واسعة من المستقلبات الثانوية، والتي تستخدم في المستحضرات الصيدلانية، والكيماويات الزراعية، والنكهات، والطور، والأصباغ، والمبيدات الحيوية والمضافات الغذائية.

يهدف العمل الحالي إلى تثمين المواد النشطة بيولوجيًا: الزيوت الأساسية والمستخلصات الفينولية التي تم الحصول عليها من ثلاثة نباتات مختارة من منطقة معسكر: *Smyrniun Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus* و *Myrtus communis L.* و *olusatrum L.* كشف الفحص الكيميائي النباتي عن ثراء هذه النباتات بالمركبات النشطة بيولوجيًا بما في ذلك بما في ذلك البوليفينول، التانات السابونين والفلافونويدات. أظهرت القياسات اللونية للمركبات الفينولية المختلفة أن المستخلصات الميثانولية غنية بالمركبات الفينولية مقارنة بالمستخلصات المائية ذات المحتوى الأقصى من البوليفينول والفلافونويدات الكلية المسجلة بواسطة *M.commmunis* (201.61 ± 9.4 ملجم مكافئ / جرام و 242.25 ± 0.74 ملجم / EC جم على التوالي) تليها *S.olusatrum* من ناحية أخرى، فإن المستخلص الميثانولي لـ *J.oxycedrus* يهيمن عليه التانات (110.21 ± 2.38 ملجم / EC جم). تم تأكيد هذا القياس الكمي من خلال التحليل الكروماتوجرافي HPLC حيث اكتشفنا غلبة الروتين في مستخلصات الريحان، وحمض الكلوروجينيك في المستخلصات المائية والميثانولية من العرعر والسميرنيوم. إن إنتاجية الزيوت العطرية التي يتم الحصول عليها عن طريق التقطير المائي تساوي 0.8% بالنسبة للزيوت الأساسية المستخلصة من *M.communis* و *S.olusatrum* و 0.48% بالنسبة للزيوت الأساسية لنبات *J.oxycedrus*. أظهر التحديد الكروماتوجرافي بواسطة CPG-SM أن التربينويدات الأحادية تشكل تقريبًا جميع المركبات المتطايرة مع هيمنة 1.8 سينول في الزيوت الساسية لنبات الأس وألفا بينين في نبات العرعر ، بينما 7- هيدروكسينورلوميلافين (2.59%)، ليمونين (1.22%)، Cineole -1،8 (0.99%) هي المكونات الرئيسية للزيوت الأساسية لنبات السميرنيوم. تم تحديد نشاط مضادات الأكسدة للنباتات بطريقتين: مسح الجذور الحرة DPPH وطريقة الفوسفومولبدنيوم. يشير اختبار DPPH إلى أن الزيوت الأساسية للنباتات الثلاثة و EMM و EMJ أظهرت نشاطًا أفضل كمضاد للأكسدة مع قيم IC50 أقل من تلك المسجلة بواسطة حمض الأسكوربيك (10.34 ± 0.008 ميكروجرام/مل) وسجل الأس قوة كبيرة ضد الجذور.

تشير نتائج النشاط المضاد للالتهابات في المختبر إلى أن الزيوت العطرية لها قوة مثبطة كبيرة ضد التمسح الحراري لألبومين البيض مقارنة بالمستخلصات الفينولية.

تشير دراسة السمية الحادة عن طريق الفم في فئران ويستار المعالجة بالزيوت العطرية إلى عدم حدوث وفيات عند تناول جرعة قدرها 5 جم/كجم.

تمت دراسة القوة المضادة للالتهابات للمراهم المصنوعة من الزيوت العطرية في الجسم الحي في نموذج التهاب المفاصل المستحث في فئران ويستار عن طريق الحقن تحت الأحمصي للفورمالين. أظهرت النتائج فعالية مضادة لالتهاب المفاصل للتركيبات الجيلينية معبر عنها بتقليل حجم الوذمة واستعادة قيم العلامات البيوكيميائية (FNS, CRP, VS) مع اختلاف معين في درجة التأثير. كشف الفحص الشعاعي عن التأثير الالتهابي المزمن

للفورمالين والذي يمتد إلى ما بعد القدم نحو الركبتين في الجردان، وقد انخفضت هذه الظاهرة العظمية المفصلية (داء مفصل الركبة) بشكل كبير بعد العلاج بالمرامح بالزيوت العطرية مقارنة بالمجموعة المعالجة بالديكلوفيناك والدواء الوهمي كما ان التركيبة FHS بدت كأفضل علاج.

الكلمات المفتاحية: *Smyrnum Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus Myrtus communis L. olusatrum L.* بوليفينول، زيوت عطرية، نشاط مضاد للأكسدة، HPLC، GCMS، مضاد للالتهابات، تركيبة جالينيك.

Introduction générale

Introduction générale

Les développements liés à la santé humaine et à ses traitements se multiplient de jour en jour. La recherche de médicaments sans effets secondaires sur la santé humaine est devenue un sujet d'intérêt croissant parmi les scientifiques, c'est pourquoi le recours aux traitements naturels et la réévaluation des traitements utilisés dans la médecine traditionnelle sont devenus un refuge pour l'humanité. La médecine traditionnelle est largement utilisée à travers le monde, y compris par la population algérienne. Il s'agit d'un système basé sur un large éventail de pratiques.

Récemment, il y a eu un intérêt croissant pour le potentiel thérapeutique des plantes, en tant qu'antioxydants en interagissant avec les radicaux libres, en chélatant et en stimulant les minéraux, et en agissant comme des piègeurs d'oxygène, afin de réduire les dommages oxydatifs produits par les radicaux libres (Shahidi *et al.*, 1992 ; Buyukokuroglu *et al.*, 2001) . Les modifications génomiques, métaboliques et fonctionnelles induites par un stress oxydant ont été impliquées dans le développement de différentes pathologies chroniques, notamment le diabète, le cancer, l'athérosclérose, l'arthrite et les troubles neurologiques (Patel *et al.*, 2010). , fréquemment associé à une inflammation et contribue au vieillissement (Ghosh *et al.*, 2015).

L'inflammation est une réponse protectrice normale à une lésion tissulaire et implique une combinaison complexe d'activation enzymatique, de libération de médiateurs, d'extravasation de liquide, de migration cellulaire et de dégradation et de réparation des tissus (Vane et Botting, 1995). L'inflammation est un processus défensif qui se produit lorsque le corps réagit à divers stimuli, notamment des infections, des irritants ou diverses lésions cellulaires et tissulaires (Oyedapo *et al.*, 2010). En outre, l'inflammation est associée à la douleur et implique, entre autres, une dénaturation accrue des protéines, une perméabilité vasculaire accrue et une altération des membranes (Ferrero-Millani *et al.*, 2007). De nombreux produits anti-inflammatoires et antioxydants de synthèse (anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens, gallate de propyle, butylhydroxytoluène) sont largement disponibles. Cependant, leur utilisation excessive peut entraîner des complications gastro-intestinales, rénales ou cardiovasculaires, des ulcères et de l'ostéoporose (Wallace et Vong, 2008 ; Whitehouse, 2011).

Dans ce contexte, les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de diverses plantes médicinales sont étudiées à travers le monde pour découvrir de nouveaux médicaments efficaces et sûrs, afin d'être utilisés dans les aliments et les produits pharmaceutiques pour remplacer les médicaments de synthèse (De Angelis et Braintumors, 2001).

Les plantes contiennent un grand nombre de métabolites secondaires tels que des alcaloïdes, des terpénoïdes et des composés phénoliques tels que des acides phénoliques, des flavonoïdes, des tanins, de la lignine, des quinones, des coumarines et autres. Ces composants sont responsables de propriétés biologiques antimicrobiens, anticancéreux, anti-inflammatoires ainsi que autres effets thérapeutiques (Živić et al., 2019).

La présente étude visait à la valorisation thérapeutique des quelques espèces de plantes de la région de Mascara. Il s'agit de l'espèce : *Myrtus communis* L., *Smyrniium olusatrm* L. et *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*. Elle a été conçue pour évaluer *in vitro* et *in vivo* des activités biologiques des extraits et des huiles essentielle extraits des plantes.

Notre thèse est organisée en trois parties principales :

- ❖ La première partie c'est la synthèse bibliographique, qui comporte un rappel sur les métabolites secondaire (chapitre I), Activités biologiques des métabolites secondaires (chapitre II) et la présentation des plantes étudiées (chapitre III).
- ❖ La deuxième partie illustre les protocoles expérimentaux menés pour la l'identification qualitative et quantitative par HPLC et GC-MS des biomolécules. L'étude *in vitro* de son pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire. Ainsi que préparation des formules galénique et l'étude de leur effet thérapeutique sur le modèle expérimental rat Wistar induits d'une polyarthrite rhumatoïde.
- ❖ La troisième partie de ce manuscrit est consacrée aux résultats obtenus ainsi que leurs interprétations à la lumière de la littérature.
- ❖ Enfin, une conclusion et perspectives qui clôturent le travail.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Métabolites secondaire

I.1. Définition

Les plantes produisent naturellement une variété de produits de nature chimique différente, qui sont utilisés pour la croissance et le développement des plantes. Les métabolites primaires fournissent les éléments nécessaires aux processus tels que la photosynthèse, la translocation et la respiration. Les produits dérivés des métabolites primaires, qui ne participent pas directement à la croissance et au développement, sont considérés comme des métabolites secondaires. En général, les métabolites secondaires sont le produit des métabolites primaires et sont issus de modifications de la biosynthèse, y compris la méthylation, la glycosylation et l'hydroxylation. Les métabolites secondaires sont certainement plus complexes dans leur composition structurale et leurs chaînes latérales que les métabolites primaires.

On distingue trois grandes classes de métabolites végétaux (figure 1) en fonction de la voie de biosynthèse : les groupes phénoliques (composés de sucres simples et de cycles benzéniques), les terpènes et les stéroïdes (composés principalement de carbone et d'hydrogène) et les composés azotés (Nawrot-Chorabik *et al.*, 2022).

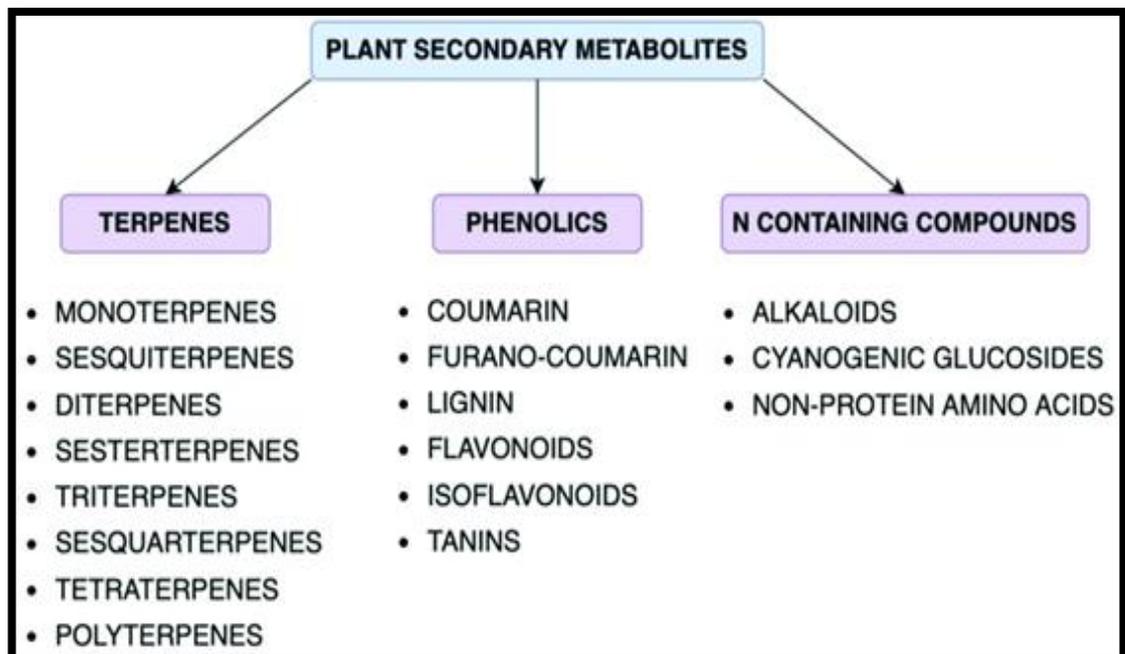


Figure 1 : Les principaux types de métabolites secondaires (Nawrot-Chorabik *et al.*, 2022).

I.2. Métabolites secondaire contenant de l'azote

De nombreux métabolites secondaires végétaux contiennent de l'azote dans leur squelette. Les MS contenant de l'azote sont synthétisés à partir d'acides aminés communs et peuvent être divisés en quatre catégories principales : les alcaloïdes, les glycosides cyanogéniques et les acides aminés non protéiques.

I.3. Polyphénols

I.3.1. Définition

Les polyphénols sont des produits naturels non nutritifs ou des métabolites secondaires des végétaux que l'on trouve dans les fruits, les légumes et les graines que nous consommons tous les jours. Les polyphénols constituent une grande famille de composés issus du métabolisme secondaire et répandus dans le règne végétal. Le terme "polyphénol" devrait être utilisé pour définir les composés exclusivement dérivés de la voie shikimate/phénylpropanoïde et/ou de la voie polykétide, comportant plus d'une unité phénolique et dépourvus de fonctions azote (Hano et Tungmunnithum, 2020).

I.3.2. Classification et structure chimique

Les polyphénols constituent un vaste groupe de composés végétaux bioactifs présentant une grande variété de structures diverses qui appartiennent à deux classes principales : les non-flavonoïdes (en particulier les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes) et les flavonoïdes qui sont caractérisés par le squelette de base C6-C3-C6. Les deux anneaux aromatiques de la structure flavonoïde sont liés par un anneau hétérocyclique, qui diffère par son degré d'oxydation et conduit à la sous-classification suivante : flavones, flavonols, isoflavones, flavanones, anthocyanines et les flavanols, généralement appelés catéchines (figure 2) (Serra *et al.*, 2021).

Par ailleurs, les polyphénols se présentent également sous la forme d'oligomères et de polymères, généralement appelés tanins. Ceux-ci se divisent en tanins hydrolysables (dérivés des acides gallique et ellagique) et en tanins condensés (dérivés de la catéchine et généralement appelés procyanidines) (figure 2) (Amiot *et al.*, 2016).

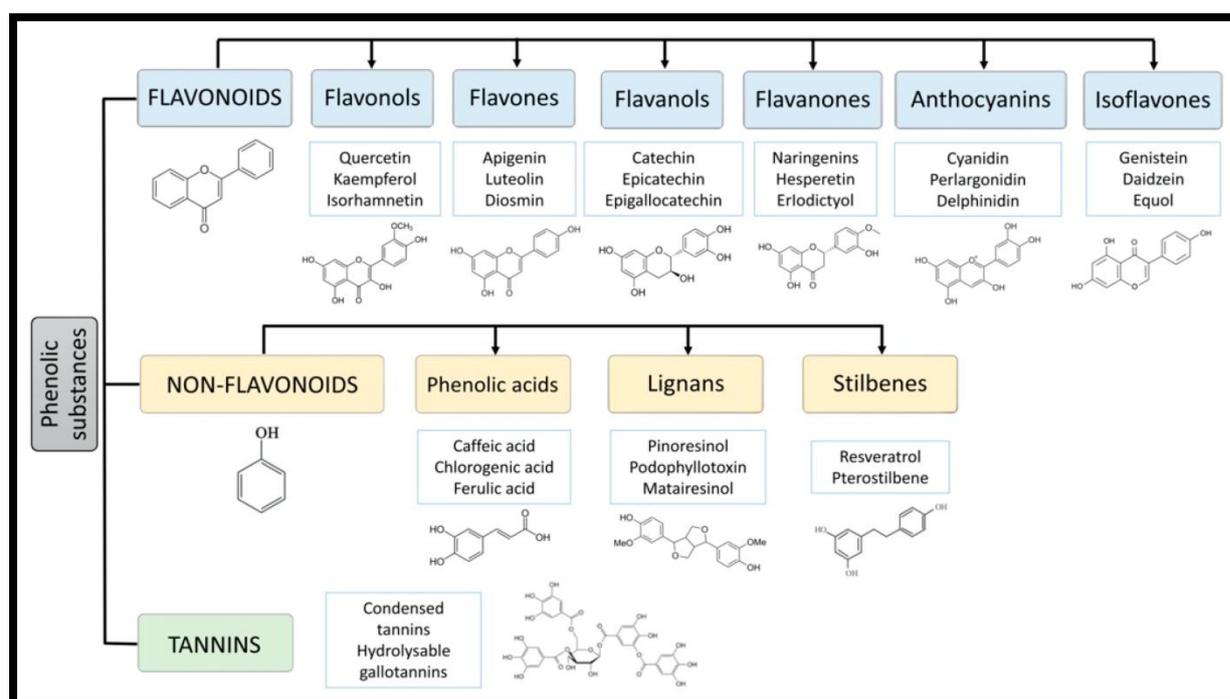


Figure 2 : Principales classes de polyphénols (Serra *et al.*, 2021)

I.3.3. Biosynthèse des polyphénols

Dans les plantes, les voies métaboliques du shikimate et du phénylpropanoïdes représentent les principales voies de biosynthèse des polyphénols. La voie du shikimate est la voie la plus courante, conduisant à la production de chorismate, qui est un précurseur des voies postchorismate responsables de la biosynthèse du tryptophane et de la phénylalanine/tyrosine. La voie du shikimate comprend sept étapes métaboliques commençant par la condensation de l'érythrose-4-phosphate avec le phosphoenolpyruvate et se terminant par la synthèse du chorismate (Ofosu *et al.*, 2020) (figure 3).

La voie des phénylpropanoïdes est une source majeure de métabolites secondaires chez les plantes. Elle commence par trois réactions conduisant à la conversion de la phénylalanine en 4-coumaroyl CoA. Ces étapes, connues sous le nom de "voie générale des phénylpropanoïdes", dirigent le flux de carbone dans les cellules végétales depuis la voie du shikimate (phénylalanine) vers diverses branches du métabolisme des phénylpropanoïdes y compris les flavonoïdes, phénols volatils, tanins hydrolysables, coumarines et lignanes (figure 3) (Lyu *et al.*, 2019)

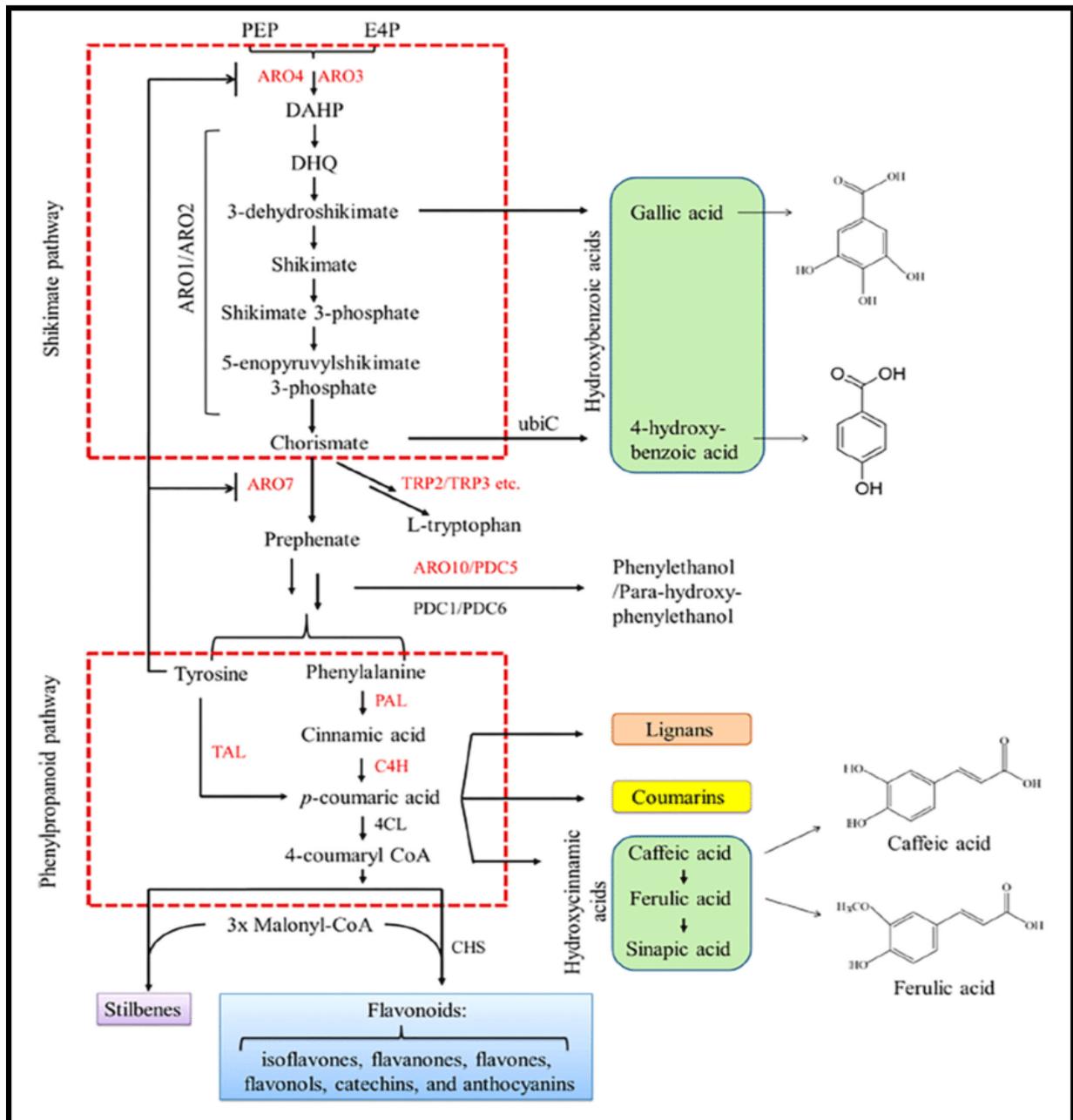


Figure 3 : biosynthèse des polyphénols (Ofosu *et al.*, 2020)

I.3.4. Polyphénols et santé humaine

On pensait à l'origine que le principal mécanisme d'action des polyphénols résidait dans leurs effets antioxydants directs. Toutefois, ces effets ne sont plus considérés comme pertinents *in vivo*, car ces composés n'atteignent pas, dans la plupart des tissus à des concentrations suffisamment élevées pour avoir un effet significatif en termes de piégeage des radicaux libres (Fraga *et al.*, 2019). Un certain nombre d'essais cliniques et d'études ont

suggéré un rôle des polyphénols alimentaires dans la prévention des principales maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives et l'ostéoporose. Dans beaucoup de ces études, seul un nombre limité de polyphénols a été pris en compte, ce qui n'est pas représentatif de la grande diversité des composés observés dans l'alimentation. La fonction physiologique des polyphénols chez l'homme et l'animal continue de faire l'objet d'intenses recherches (Ananga *et al.*, 2013).

I.4. Terpènes

Les terpènes sont classés aussi parmi les substances secondaires les plus importantes. Naturellement produit par les plantes. Les terpènes peuvent être considérés comme étant des dérivés de l'isoprène d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel ils sont parfois désignés. Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : Les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes (C30), les tétraterpènes (C40), les polyterpènes (C4000) Les composés terpénoïdes sont caractérisés par une nature volatile et une forte odeur ce qui donnent aux plantes les parfums qui les caractérisent. De plus, ils constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structural que fonctionnel, avec près de 15000 structures moléculaires connues (Merghem, 2009).

I.5. Huiles essentielles

Le terme d'huile essentielle remonte au XVI^e siècle et dérive du médicament *Quinta essentia*, nommée par le Suisse Paracelse von Hohenheim (Guenther, 1948). Les huiles essentielles ou "essences" doivent leur nom du fait de leur inflammabilité. De nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. L'Agence française de normalisation (AFNOR) donne la définition suivante: L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation "sèche".

Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles fixes, mais insolubles dans l'eau. Ces huiles volatiles sont généralement liquides et incolores à température ambiante. Elles ont une densité inférieure à l'unité, Elles ont un indice de réfraction et une activité optique très élevée. Ces huiles volatiles contenues dans les herbes sont responsables des différents parfums que dégagent les plantes. Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir des huiles essentielles (Dhifi *et al.*, 2016).

I.5. 1. Biosynthèse des huiles essentielles

Il existe quatre grandes voies de biosynthèse qui produisent trois groupes biosynthétiques de composants d'huile essentielle, soit des terpènes, des phénylpropanoïdes ou des isothiocyanates. Ils dérivent respectivement des voies de biosynthèse du mévalonate et du phosphate de méthylérythritol, du shikimate et du glucosinolate (Sadgrove *et al.*, 2022).

❖ La voie de l'acide mévalonique (MVA)

La voie MVA commence par la condensation de petits groupes acétyles (43 Da) clivés de l'acétyl coenzyme A. Cependant, dans la synthèse des terpènes, la condensation s'arrête à six carbones. Ensuite, l'élimination enzymatique du groupe acide ionisé supprime un carbone, réduisant l'intermédiaire à une unité 2-méthyl à cinq carbones, qui est l'unité fondamentale de tous les terpènes (figure 4) (Bergman *et al.*, 2019).

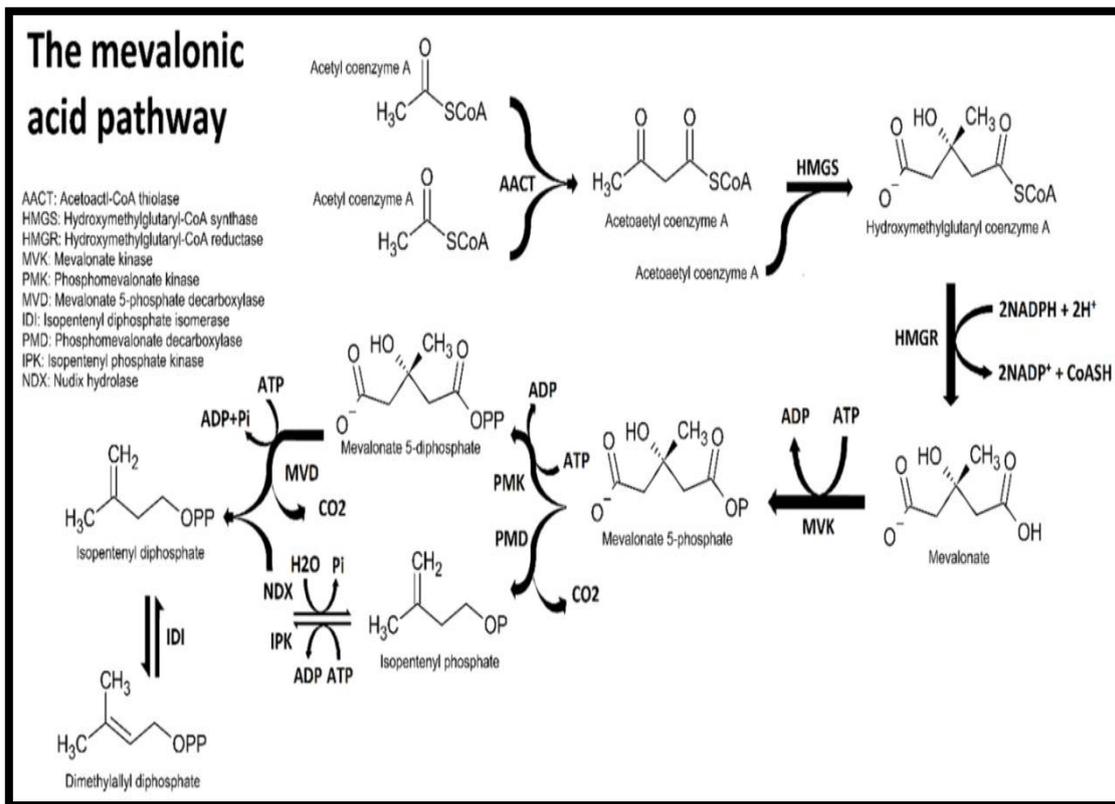


Figure 4 : Les étapes de la biosynthèse de l'acide mévalonique vers la synthèse des terpènes (Bergman *et al.*, 2019).

❖ La voie du 2C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP)

La voie MEP commence par la condensation du pyruvate et des dérivés du glycéraldéhyde pour produire une chaîne polyhydroxylée à cinq carbones. Ensuite, une enzyme convertit la chaîne à cinq carbones en une chaîne méthylée à quatre carbones, ce qui représente une étape importante dans la formation de l'isoprène utilisé pour construire les terpènes (figure 5) (Sadgrove *et al.*, 2022).

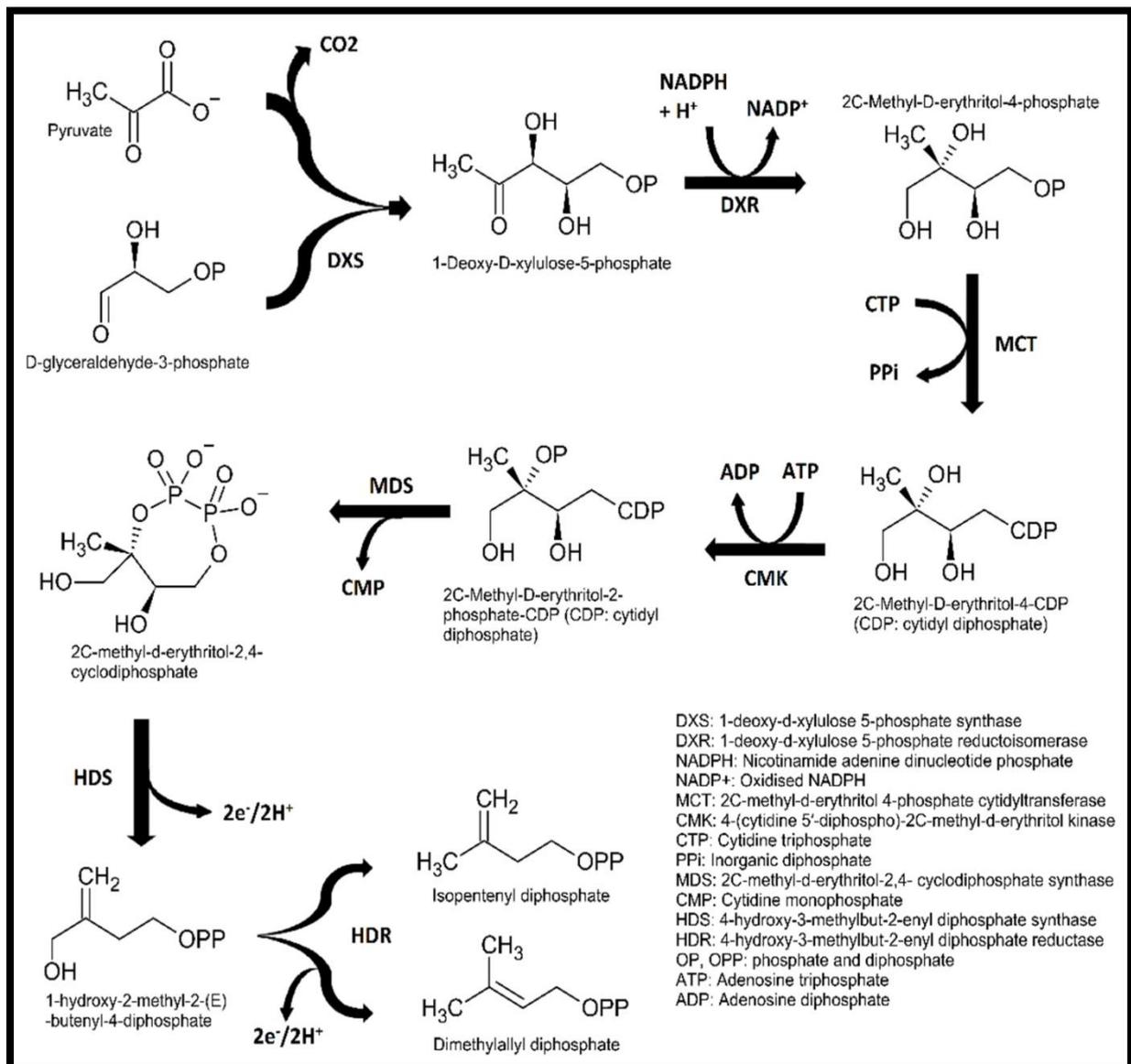


Figure 5 : La voie de biosynthèse des MEP générant les terpènes

(Bergman *et al.*, 2019).

❖ La voie du shikimate

La voie du shikimate est responsable de la biosynthèse de tous les phénylpropanoïdes. Plusieurs étapes importantes dirigent la synthèse vers les phénylpropènes (figure 6). Un exemple de cette étape est la conversion de la phénylalanine ou de la tyrosine, modulée par les acides aminés aromatiques lyases. Le cinnamate qui en résulte est ensuite converti en p-coumaroyl par l'enzyme "cinnamate 4-hydroxylase", puis le coenzyme A est estérifié au groupe acide par la 4-coumaroyl CoA ligase (Vogt, 2010).

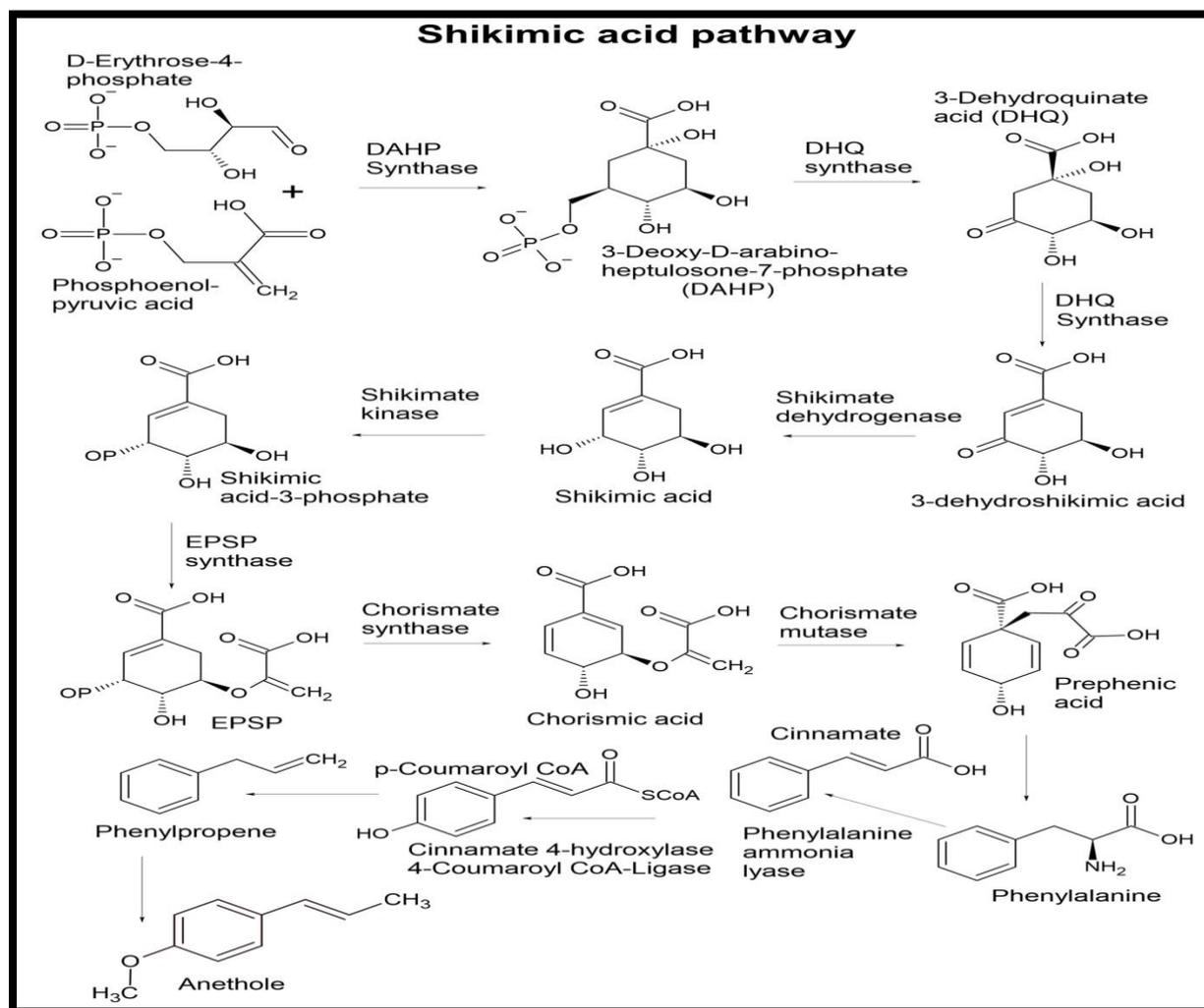


Figure 6 : Voie de biosynthèse de l'acide shikimique produisant des phénylpropanoïdes (Vogt, 2010).

❖ Voies de biosynthèse des glucosinolates

Les glucosinolates sont des substances chimiques physiologiquement inactives, mais une fois hydrolysées par l'enzyme myrosinase, elles sont converties en composés biologiquement actifs tels que les isothiocyanates et les thiocyanates (Figure 7). Les différences entre les chaînes latérales des glucosinolates ont donné lieu à une grande variété d'isothiocyanates par hydrolyse enzymatique. Par exemple, la glucoraphanine produit du sulforaphane, la sinigrine produit de l'isothiocyanate d'allyle, la gluconasturtiine produit de l'isothiocyanate de phényle, glucoerucine en erucine tandis que la glucotropéoline produit de l'isothiocyanate de benzyle (Kamal *et al.*, 2022).

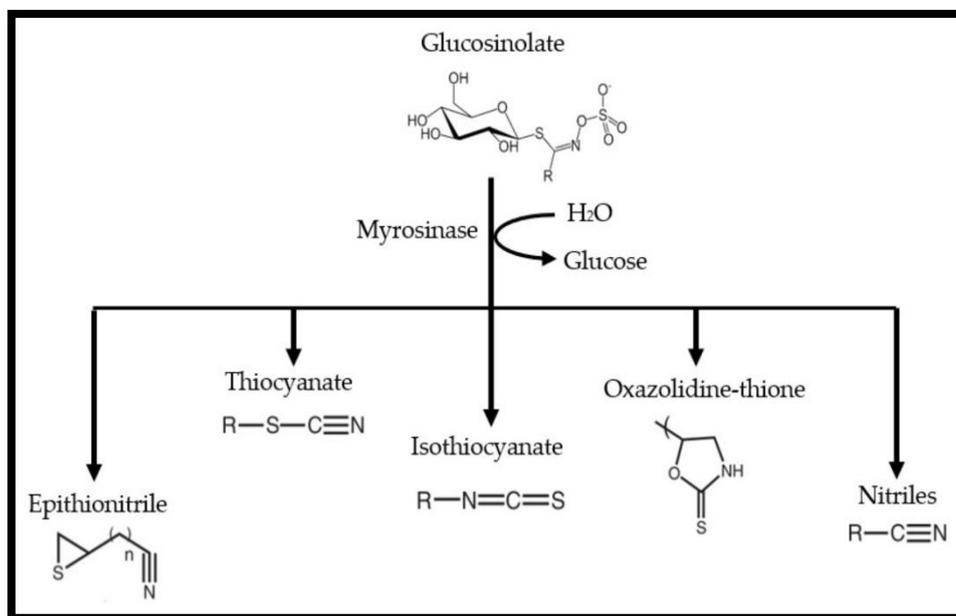


Figure 7: Voies de biosynthèse des glucosinolates (Kamal *et al.*, 2022)

I.5.2. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles

Ces techniques d'extraction peuvent être classées en deux catégories : les méthodes classiques et les méthodes innovantes. L'application de techniques innovantes, telles que les procédés à ultrasons et à micro-ondes, a permis d'améliorer l'efficacité du processus d'extraction en termes de temps nécessaire à l'isolement de l'huile essentielle et de dissipation d'énergie, ainsi que l'amélioration du rendement de production et la haute qualité des huiles essentielles (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

I.5.2.1. Méthodes d'extraction conventionnelles

Les techniques conventionnelles appliquées pour extraire les huiles végétales essentielles sont basées sur la distillation de l'eau par le processus de chauffage.

➤ Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode d'extraction des huiles la plus ancienne et la plus simple. Le procédé commence par l'immersion directement du matériel végétal dans l'eau à l'intérieur de l'alambic (récipient), le tout est ensuite porté à ébullition (figure). Comme les huiles sont entourées d'eau, cette méthode permet de protéger les huiles essentielles à extraire dans une certaine limite sans être surchauffées. Le principal avantage de cette technique d'extraction est sa capacité à isoler les matières végétales à une température inférieure à 100°C (El Asbahani *et al.*, 2009).

➤ Distillation à la vapeur

La distillation à la vapeur d'eau est la technique la plus répandue. Le pourcentage d'huiles essentielles extraites par cette technique est de 93 %. Fondamentalement, le processus commence par le chauffage du matériel végétal à l'aide de la vapeur fournie par un générateur de vapeur. La chaleur est le principal facteur déterminant l'efficacité avec laquelle les structures de la matière végétale se décomposent et éclatent et libèrent les composants aromatiques ou les huiles essentielles (Tongnuanchan and Benjakul, 2014).

➤ Hydrodiffusion

Cette technique ne s'applique qu'aux échantillons de plantes séchées qui peuvent être endommagés à la température d'ébullition. Dans le processus de distillation à la vapeur, la vapeur est amenée par le bas du générateur de vapeur, alors que dans la méthode d'hydrodiffusion, la vapeur est fournie par le haut du générateur. Ce processus a été réalisé à basse pression ou sous vide et la température de la vapeur peut être réduite à moins de 100°C (Vian *et al.*, 2008).

➤ **Extraction par solvant**

En général, les échantillons de plantes sont mélangés aux solvants à extraire en chauffant légèrement le mélange, et le processus est suivi d'une filtration et d'une évaporation des solvants. Par rapport à d'autres méthodes, cette méthode est plus compliquée pour l'extraction des huiles essentielles, et par conséquent, prend du temps et est plus coûteuse (Li *et al.*, 2009).

I.5.2.2. Innovation dans les méthodes d'extraction

Les paramètres à prendre en compte dans les nouvelles techniques d'extraction sont la réduction de la durée d'extraction, la consommation d'énergie, les solvants utilisés et les émissions de dioxyde de carbone (Abdul Aziz *et al.*, 2018).

➤ **Extraction par fluide supercritique**

En général, le principe du processus d'extraction par fluide supercritique implique l'utilisation et le recyclage du fluide dans des étapes répétées de compression/ décompression. L'état supercritique du CO₂ peut être atteint en comprimant et en chauffant fortement ce fluide. Ensuite, il passe à travers la matière végétale brute pour charger les matières volatiles et les extraits végétaux (Tongnuanchan and Benjakul, 2014).

➤ **Extraction sous-critique liquide**

La définition de l'état sous-critique d'un liquide est le moment où le liquide atteint une pression supérieure à la pression critique et inférieure à la température critique, ou vice-versa. Les fluides utilisés pour extraire les huiles essentielles par cette méthode sont l'eau et le CO₂. Cette technique d'extraction est considérée comme la meilleure approche alternative car elle permet un processus d'isolation rapide de l'huile essentielle, à une température de travail basse. En outre, il s'agit d'un processus d'extraction rentable, simple et respectueux de l'environnement (Abdul Aziz *et al.*, 2018).

➤ **Extraction par micro-ondes sans solvant**

Cette technique combine deux techniques, à savoir le chauffage d'échantillons végétaux par micro-ondes suivi d'une distillation sèche à pression atmosphérique en l'absence de tout solvant (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

I.5.3. Huiles essentielles et santé humaine

Les huiles essentielles possèdent des propriétés antimicrobiennes, antivirales, antibiotiques, anti-inflammatoires et antioxydantes, ainsi que des effets psychogènes supposés tels que le soulagement du stress, le traitement de la dépression et l'aide à l'insomnie. Les huiles essentielles présentent également des risques associés à leur utilisation, tels que leurs propriétés de perturbation endocrinienne conduisant à l'induction d'une croissance mammaire prématurée chez les jeunes adolescentes. Dans l'ensemble, les HE présentent de nombreux risques positifs et potentiellement négatifs pour la santé humaine, d'où l'importance de sensibiliser le public à tous leurs effets connus sur le corps humain (Tongnuanchan et Benjakul, 2014).

Chapitre II

Activités biologiques

des métabolites secondaires

II.1. Activité antioxydante

II.1.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre de la balance redox entre la génération des espèces réactives oxygénées pro-oxydants (EOA) et les défenses antioxydants de l'organisme, que ce soit par un déficit en antioxydants ou suite d'une surproduction énorme des radicaux, ce qui conduit à des dégâts cellulaires (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence à dose raisonnable par divers mécanismes physiologiques ; comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, ce qui conduit à un excès de ces radicaux (Favier, 2003) ce qui entraîne des dommages cellulaires irréversibles observés dans les maladies inflammatoires, le vieillissement, le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et cardiovasculaires (Cillard, 2006).

II.1.2. Espèces réactives oxygénées (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques. En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde O_2^- qui est un radical modérément réactif. En effet, toute réaction impliquant de l' O_2 et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO. La chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que les activités enzymatiques notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxification des xénobiotiques provoquent une libération importante d'ERO (Barouki, 2006).

II.1.3. Différents types de radicaux libres

Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (figure 8) (Favier, 2003).

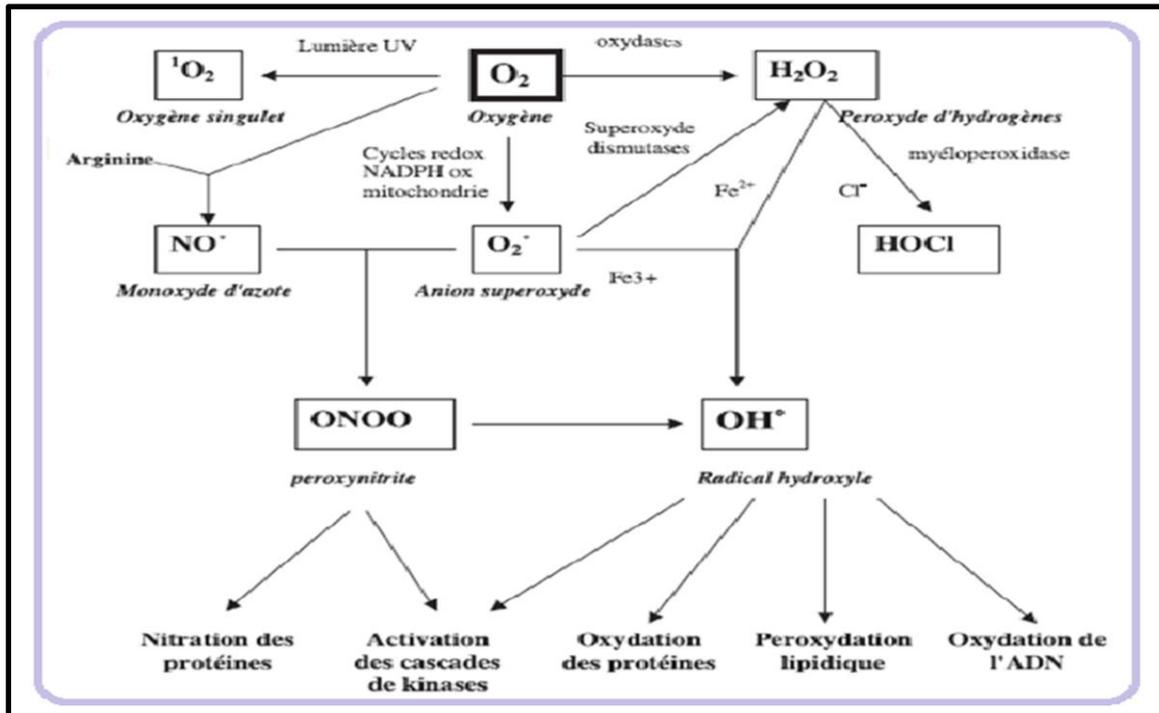
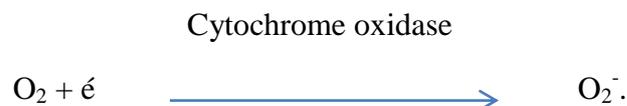


Figure 8 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

Le radical superoxyde

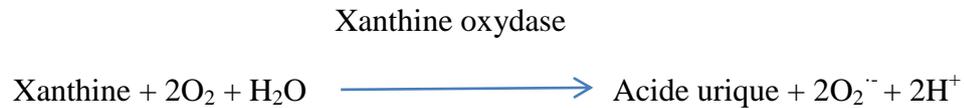
L'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial:



Le radical superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :



Une autre source possible est la xanthine oxydase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique.



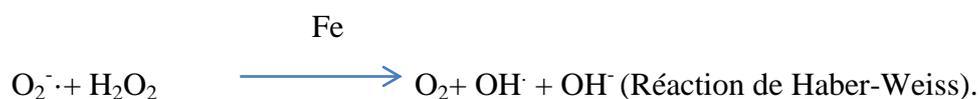
Le radical superoxyde est peu réactif, mais il entre comme agent oxydant dans la majorité des réactions (Marfak, 2003).

Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est une espèce radicalaire hautement réactive. Il est principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton:



Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite Haber-Weiss. Cette réaction est relativement lente et moins courante que la précédente dans les tissus vivants (Gardès-Albert, 2006).



Le peroxyde d'hydrogène

Il se forme par une réaction de dismutation du radical superoxyde, catalysée par le superoxyde dismutase(SOD).



Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante (Gardès-Albert, 2006).

II.1.4. Dommages oxydatifs des radicaux libres

Les ERO sont des espèces chimiques à très forte réactivité vis-à-vis des composants cellulaires. Ils peuvent mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, protéines cellulaires et les acides nucléiques, ce qui conduit la mort cellulaire.

II.1.4.1. Oxydation de l'ADN

Les ERO sont également responsables de l'altération et des modifications permanentes du matériel génétique de l'ADN (Ghosh *et al.*, 2015). Ils peuvent induire des mutations ou l'arrêt de la réplication de l'ADN en perturbant la transcription et la traduction, ce qui conduit à des altérations du message génétique et donc la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations vont impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Fonc, 2007).

Ils agissent en provoquant la mutation des paires de base, leur réarrangement, la délétion ou l'insertion de quelques bases, ou encore l'amplification de certaines régions ce qui donne naissance à un grand nombre de bases modifiées et des aldéhydes mutagènes (Raja, 2011). Parmi les oxydations des bases, la guanine peut être oxydée par le radical hydroxyle en 8-hydroxy-Guanosine (8-OH-G) aboutissant à la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) qui peut être ensuite mesuré comme marqueur de stress oxydant (Poisson, 2013).

Les modifications permanentes du matériel génétique vont ainsi perturber la transcription et la traduction aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations résultant des dommages oxydatifs représentent la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement. (Favier, 2006).

II.1.4.2. Peroxydation lipidique

Les lipides et leurs acides gras polyinsaturés présents dans les membranes cellulaires (membranes plasmique, mitochondriale lysosomale), et subcellulaires sont les cibles privilégiées des ERO. le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène qui laisse un électron non apparié au niveau d'un carbone situé entre deux doubles liaisons, pour former

un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde très réactifs, cette réaction appelée peroxydation lipidique (figure 9). Elle se déroule en trois étapes ; initiation, propagation et terminaison (Cillard, 2006). La lipoperoxydation touche toutes les structures de la cellule et particulièrement les membranes (membranes plasmique, mitochondriale lysosomale) une diminution de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes ceci peut conduire à l'apoptose si les dégâts sont importants (Hong et al., 2004). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4 hydroxynonenal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Toutes les structures de la cellule seront ainsi touchées et particulièrement les membranes (membranes plasmique, mitochondriale lysosomale), ce qui déclenche de l'apoptose des cellules (Sachdev et Davies, 2008).

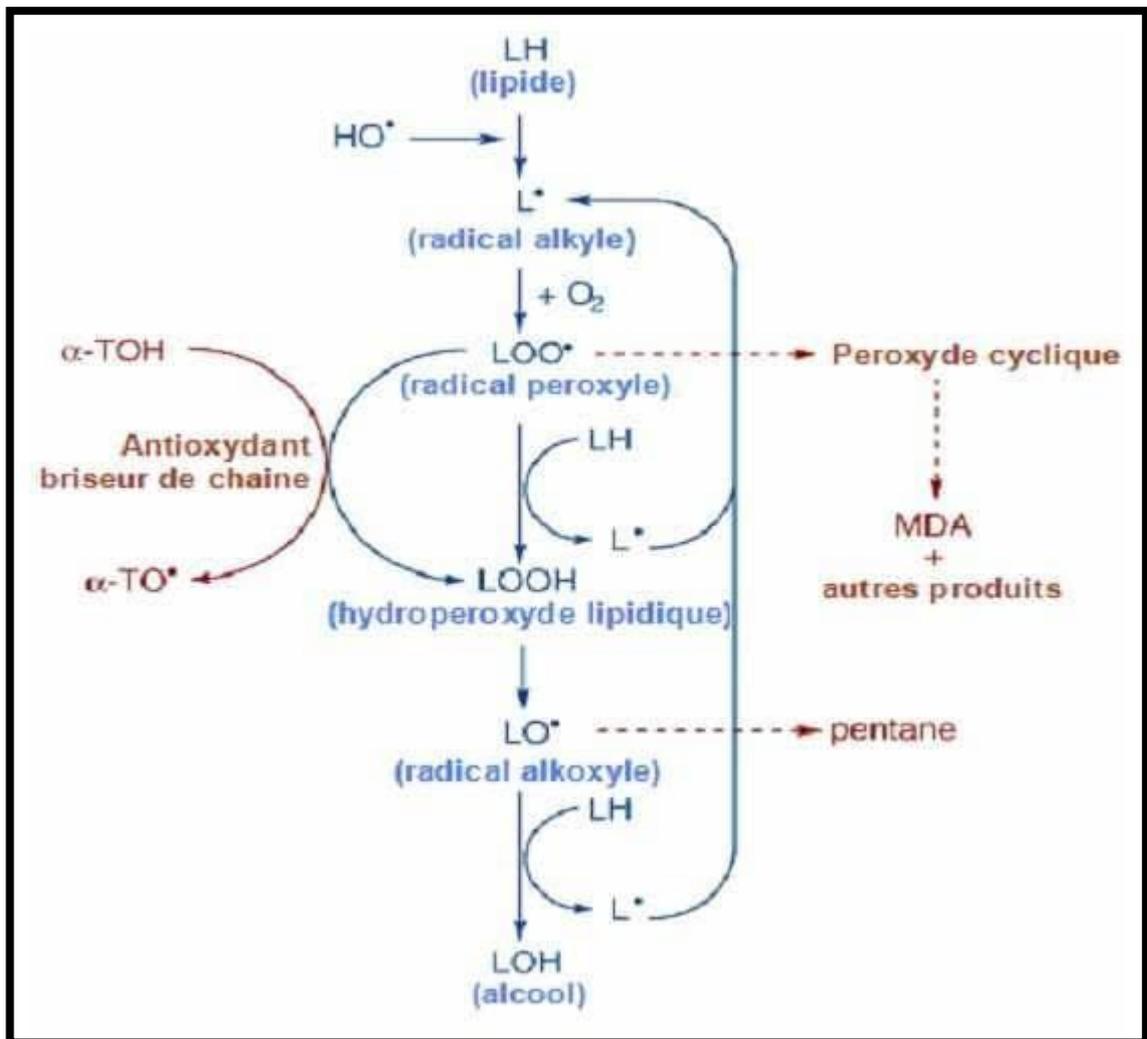


Figure 9: Réactions en chaîne conduisant à la peroxydation lipidique

(Sachdev et Davies, 2008).

II.1.4.3. Oxydation des protéines et des acides aminés

les protéines et les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) basiques (arginine, lysine) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) sont une cible importante des ERO.

En présence des métaux, l'action des radicaux libres a lieu sur les chaînes latérales des acides aminés basiques au niveau de fonction amine (NH ou NH₂) provoquant une désamination oxydative et en effet production des acides aminés anormaux. Les radicaux libres sont également responsables de la formation de ponts disulfures qui modifient la conformation des protéines et nuisent à leurs propriétés enzymatiques, fonction de transduction d'un signal ou système de transport et leur sensibilité à l'action des protéases. Les acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane subissent des réactions d'hydroxylation au niveau de leurs noyaux aromatiques et s'oxydent en L dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) et L-trihydroxyphénylalanine (L-TOPA) hydroxytryptophane ; qui présentent une activité mutagénique élevée (Durand et al., 2012).

II.1.5. Les antioxydants

Les cellules sont capables de synthétiser en réponse aux agressions oxydantes des entités antioxydantes. Un anti-oxydant est toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, prévient ou retarde significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell *et al.* 1990). Ils sont capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres. Les antioxydants ont le pouvoir de diminuer ou d'arrêter l'action d'espèces réactives oxygénées, soit directement en inhibant leur production, ou bien en limitant leur propagation par piégeage des radicaux libres avant que les molécules vitales ne soient endommagées pour donner finalement des composés stables. On distingue deux sources d'antioxydants : exogènes et proviennent de la présence dans notre alimentation de fruits et légumes (e.g., polyphénols, alpha-tocophérol, acide ascorbique, caroténoïdes), l'autre est endogène présents dans notre organisme regroupe des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase.....) (Bothorel, 2011). Quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng *et al.*, 2007).

III.1.5.1. Les antioxydants enzymatiques

Ce sont des systèmes de défense enzymatiques naturels ; d'origine endogène. Ces enzymes sont élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux dont l'activité peut être régulée par différents événements (Mika et al., 2004).. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme ; leur taux peut croître par up-régulation à mesure que le stress oxydant se fait ressentir dans une cellule. Ils peuvent de cette façon pallier immédiatement à une agression oxydative ponctuelle sans être subordonnés à un apport exogène. Cette caractéristique les différencie des antioxydants non enzymatiques qui sont nécessairement soumis à l'alimentation ou aux stocks cellulaires. Les enzymes anti-oxydantes regroupant la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SoD), la thiorédoxine (TRx), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR). Elles peuvent toutes transformer les espèces radicalaires en composé moins réactifs (Poisson, 2013).

a/ Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme hémique, c'est-à-dire qu'elle possède un atome de fer sous forme Fe^{3+} qui participe à la fabrication de l'hème, elle est majoritairement retrouvée dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales (Valko, 2006). Cette enzyme permet de convertir le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Poisson, 2013).

b/ Glutathion peroxydase (GPx) et glutathion réductase (GR)

La glutathion peroxydase est une enzyme avec une ou quatre atomes de sélénium sous forme de sélénocystéine, elle présente dans le cytoplasme, son rôle principal est de protéger l'hémoglobine des dommages oxydatifs dans les érythrocytes. L'oxydation de la GPx sous l'action de la glutathion peroxydase, permet de réduire peroxyde d'hydrogène ou des peroxydes lipidiques formés suite à l'effet du stress oxydant. La GPx catalyse la dismutation d' H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire, et sera transformé sous forme oxydé. Le glutathion oxydé sera réduit par la suite grâce à l'action de la glutathion réductase en utilisant un électron provenant du NADPH. En effet, l'objectif final est de se débarrasser totalement de ces radicaux libres, ce qui est obtenu moyennant une consommation d'énergie (Poisson, 2013).

c/ Superoxydes Dismutases

Les Superoxydes Dismutases sont les plus importantes enzymes dans toutes les cellules vasculaires. C'est l'enzyme antioxydante « anti- $O_2^{\cdot -}$ », elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde première espèce toxique en deux produits moins réactif : l'oxygène moléculaire et le peroxyde d'hydrogène. Elles sont présentes dans la majorité des organismes vivants et chez l'homme. Il existe plusieurs isoformes compartimentées de l'enzyme superoxydes dismutases (SOD) qui diffèrent par leur cofacteur (Manganèse, Cuivre ou Zinc), leur structure et leur localisation cellulaire (Poisson, 2013): la SOD1 cytosolique et la SOD3 extracellulaire, utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD), alors que la SOD2 mitochondriale utilise le manganèse (Mn-SOD) (Afonso et al., 2007).

d/ Thiorédoxine (TRx)

Le système des thioredoxines de défense vis à vis du stress oxydant, il possède trois isoformes chez l'homme : Trx1, Trx2 et Trx3 qui sont respectivement localisées dans le cytosol, la mitochondrie et les spermatozoïdes. Le rôle du système Trx est de réguler la transcription de nombreux gènes anti-oxydants tels que le facteur Nrf2, ainsi que de réduire les protéines cytosoliques riches en ponts disulfures grâce à son activité oxydo-reductase afin d'éviter la formation de liaisons disulfures au niveau intra- ou inter- moléculaire (Poisson, 2013).

II.1.5.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont naturellement présents dans les végétaux et apportées par l'alimentation, telle que la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E, les caroténoïdes et les flavonoïdes.

a/ La Vitamine C ou Acide ascorbique

la vitamine C est un nutriment essentiel qui doit être apporté par l'alimentation, elle n'est pas synthétisée par l'organisme humain du fait de l'absence de l'enzyme qui catalyse la dernière étape de sa synthèse : la gulonolactone oxydase (Mandl et al., 2009). Elle tient son nom "acide ascorbique" de la maladie scorbut qui touche les personnes privées de fruits et légumes pendant une longue période. C'est l'antioxydant majeur du plasma humain, elle est caractérisée par son puissant potentiel réducteur (Klimczak et al., 2007). Il possède une action antioxydante indirecte, La vitamine C permet de régénérer de la vitamine E ou l'alpha-

tocophérol puis, à son tour se transforme en forme radicalaire (VTC[•]), en outre la réduction de la vitamine E par la capture des électrons permet d'éviter l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques en hydroperoxydes de lipides. Cette synergie assure la protection des membranes cellulaires (figure 10) (Nordberg et Arner, 2001). La vit C agit d'une manière direct sur l'oxydation en captant les radicaux superoxydes $O_2^{\cdot -}$, l'oxygène singulet, les espèces réactives d'azote (peroxynitrite, nitrogène dioxyde, le radicale nitroxyde) et les radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) pour donner un radical ascorbyl relativement stable. Il est doté également d'une grande capacité de régénération par des réducteurs intracellulaires (glutathion, NAD⁺ et NADP⁺) (Northrop-Clewes et Thurnham, 2007).

b/La Vitamine E ou α -tocophérol

Le terme de vitamine E est le nom commun regroupe toutes molécules dont l'alpha-tocophérol et ces isomères (α , B, γ et δ), la forme la plus présente dans l'organisme. C'est un ANE apporté par l'alimentation, elle est présente dans les huiles végétales, principalement dans l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive, et en faible quantité dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, la margarine et les poissons gras (Lopez et al., 2005). L'acide ascorbique est l'antioxydant lipophile le plus important des membranes cellulaires. Il minimise les dommages lipidiques consécutifs aux attaques radicalaires des acides gras polyinsaturés situés dans les membranes cellulaires et dans les lipoprotéines plasmatiques. Sa fonction est de limiter la propagation de réactions en chaînes consécutives à la peroxydation lipidique par neutralisation des radicaux peroxydes. La vitamine E est le principal antioxydant contenu dans les LDL (low density lipoprotein). Dans chaque particule LDL 5 à 10 molécules d'alpha-tocophérol sont incorporé grâce à une protéine appelée protéine de transfert de l' α TOH (ou α -tocophérol transfer protein). Au cours de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -TOH inhibe la propagation radicalaire en cédant son hydrogène situé dans le noyau phénolique, et réduisant ainsi le radical RO_2^{\cdot} (Lopez et al., 2005), se transforme à son tour en produit radicalaire mais de faible réactivité, qui régénéré par la vitamine C (figure10) (Defraigne et al., 2007).

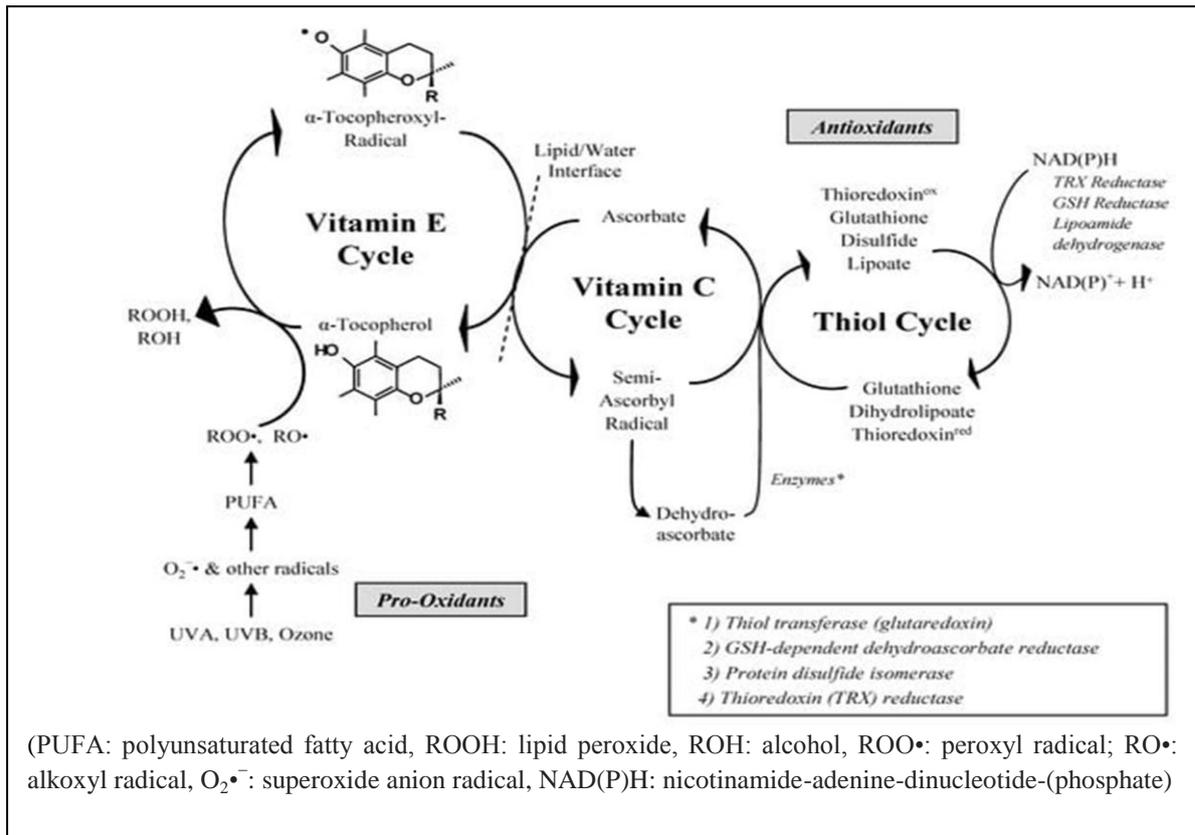


Figure 10 : Mode de régénération entre alpha-tocophérol et acide ascorbique (Rimbach et al., 2010).

L' α -TOH peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical $\cdot OH$, inhibant ainsi la formation du radical RO_2^{\bullet} . La réaction de la vitamine E avec l'anion $O_2^{\bullet-}$ est très lente et par conséquent peu probable. L' α -TOH peut aussi réguler les enzymes antioxydantes telles que la GPx, la CAT du foie et la NADPH réductase (Marwa & Benoudina, 2019).

d/ La vitamine A

Ce terme regroupe les rétinoïdes et les provitamines A aussi appelés caroténoïdes. Ces derniers sont majoritairement connus comme étant des précurseurs de la vitamine A tels que le β -carotène. Les caroténoïdes sont de puissants agents anti-radicalaires qui neutralisent tant des espèces électroniquement que chimiquement actives. Ils ont également un rôle de protection vis-à-vis des réactions de photosensibilisation. En fonction de la concentration en caroténoïdes, leurs effets sont différents : à faible concentration, ils ont une action antioxydante alors qu'à plus forte concentration, ils se comportent comme des agents prooxydants (Valko et al. 2006). Dans l'alimentation, les caroténoïdes sont présents entre autres

dans les carottes (β carotène) et le melon (lycopène) alors que les rétinoïdes sont retrouvés dans les aliments d'origine animale (lait, jaunes d'œuf) (Poisson, 2013).

d/ Les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules constituées d'au moins un noyau benzénique portant une fonction alcool, éther ou ester . Ils compte plus de 8000 composés dont les acides phénoliques (acide caféique, curcuma par exemple), les stilbènes (resvératrol) ou les lignanes et les flavonoïdes (les anthocyanes, catéchines ou isoflavones) qui constituent le groupe le plus large des polyphénols (Valko,2006). Ils peuvent capturer les ERO, inhiber les enzymes impliquées dans la génération du stress oxydatif, inhiber la production de radical hydroxyle par les réactions de Fenton en chélatant les métaux de transition, et même régénérer certains antioxydants tels que la vitamine E . En effet, leurs propriétés antioxydantes leur procurent un intérêt thérapeutique potentiel dans diverses pathologies. Les maladies liées au vieillissement cellulaire, les maladies neurodégénératives ou cardiovasculaires, ou encore les cancers pourraient bien être des cibles privilégiées de ces thérapies (Favier, 2006).

II. 2.Activité anti-inflammatoire

II.2.1. L'inflammation

L'inflammation est la réponse des tissus vivants vascularisés à une agression par un agent pathogène physiques (brûlure, piqure, coupure, traumatisme, radiations), chimiques (acides, bases et gaz) ou biologiques tel que des agents microbiens, virus, allergènes et maladies auto-immunes. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est de neutraliser et réparer les lésions tissulaires en mobilisant le système immunitaire, elle permet donc de maintenir l'intégrité du «soi» (Ashley *et al.*, 2012). Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. Ce processus comprend des phénomènes généraux, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement par de la fièvre et une altération de l'état général du tissu (Das, 2011).

II.2.2. Les type d'inflammations

La réaction inflammatoire est classée en deux catégories : l'inflammation aiguë et chronique.

II.2.2.1. Inflammation aigue

L'inflammation aiguë est une étape initiale de l'inflammation (de l'immunité innée), médiée par l'activation du système immunitaire. Elle se caractérise par sa durée limitée, quelques minutes à quelques jours L'inflammation aiguë peut être divisée en trois phases principales (Mayouf, 2019):

Phase initiale

C'est une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale ; vasoconstriction et vasodilatation des vaisseaux à calibres fins. L'activation des cellules inflammatoires (macrophages et mastocytes) permet la libération des cytokines et les chimiokines proinflammatoires qui vont agir sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins en augmentant ainsi l'afflux local du sang, responsable de la rougeur et de la chaleur (Noack et kolopp-Sarda, 2018).

Phase cellulaire

Elle est caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires ainsi que les lymphocytes qui portent des récepteurs antigéniques, ce qui vont permettre la captation et l'élimination de l'agent pathogène (Mayouf, 2019).

Phase de résolution et de cicatrisation

Au cours de laquelle, les tissus sont restaurés, l'agent agresseur rend fin à la réaction inflammatoire. L'opération de phagocytose va permettre la restauration des tissus en quelques jours et le nettoyage des débris cellulaires. La sécrétion et l'action des médiateurs inflammatoires vont être inhibés et remplacés par des cytokines anti-inflammatoires (Weill *et al.*, 2003).

II.2.2.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé. Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années (Rankin, 2004).

L'infiltrat cellulaire persiste dans le site inflammatoire contribuant à l'hyperplasie et a des destructions tissulaires plus graves (hypertrophie des cellules endothéliales et des fibres musculaires des vaisseaux) ayant des conséquences fonctionnelles sur certains organes ce qui peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde, et la goutte (Calvino ,2023) .

La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques, c'est une maladie auto-immune qui touche principalement les articulations. Elle aboutit progressivement à une destruction de l'os et du cartilage. Le siège inflammatoire de la PR est la membrane synoviale. Une surproduction de liquide synovial au niveau de l'articulation est observée, générant un gonflement et une douleur, ayant pour origine une multiplication anormale des cellules entraînant un épaississement de la membrane synoviale (le pannus synovial) (figure 11). La persistance de l'inflammation se répercute sur tous les éléments d de l'articulation : cartilage, os, ligaments, tendons.

La PR est lié à des anomalies de l'immunité à médiation cellulaire, avec activation des lymphocytes T. L'évolution de la synovite rhumatoïde se passe en plusieurs phases (figure 11) : l'initiation, le recrutement cellulaire et l'inflammation et la prolifération synoviale, la destruction de l'articulation et la réparation. Ces différentes phases peuvent être individualisées de manière schématique, mais sont en réalité très intriquée (Pillon, et Michiels, 2013)

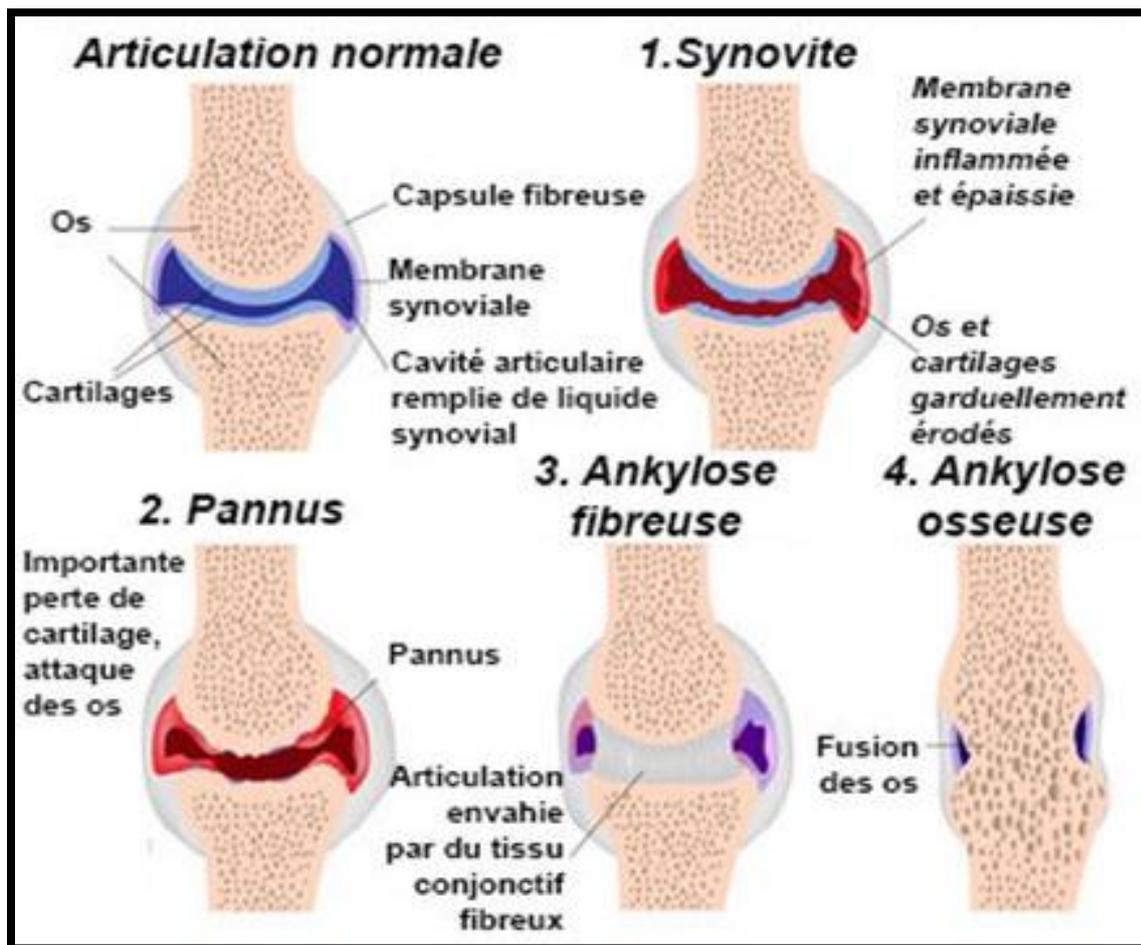


Figure 11 : Stades de l'arthrite rhumatoïde (Anonyme)

II.2.3. Les médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. Ils ont différents origines cellulaires représentées par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes, les éosinophiles, les mastocytes, les fibrinoblastes et les plaquettes (Larsen et Henson, 1983). Les médiateurs de l'inflammation sont résumés par l'histamine et la sérotonine, cytokines et les facteurs activateurs des plaquettes. Ils augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes sur le lieu de l'inflammation, favorisent l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimulent la broncho constriction, l'agrégation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment ce qui induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages (Rankin, 2004). Les prostaglandines, leucotriènes sont des médiateurs qui favorisent l'œdème et l'afflux

leucocytaire. Les cytokines et chimiokines jouent un rôle dans les communications intercellulaires lors du processus inflammatoire (Weil et Batteux, 2003).

II.2.4. Anti-inflammatoires

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèse du type anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) ou stéroïdien ; les glucocorticoïdes (Muster, 2005). Les anti-inflammatoires sont nombreux et appartiennent à différentes familles de médicaments, dont les analgésiques, les corticoïdes et les antihistaminiques (Tréchet et Jouzeau, 2014).

II.2.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition de deux iso-enzymes cyclooxygénase (COX): COX-1 et COX-2 (figure12).

COX-1 est une forme constitutionnelle exprimée dans la plupart des tissus sous l'influence de stimuli physiologiques qui permet la synthèse de différentes prostaglandines exerçant un rôle physiologique important, en particulier la protection gastrique. L'inhibition de cette enzyme induit une diminution de la production des prostaglandines. Alors que COX-2 est essentiellement inductible sous l'influence de stimuli comme les cytokines pro-inflammatoires ou les facteurs de croissance (Tréchet et Jouzeau, 2014).

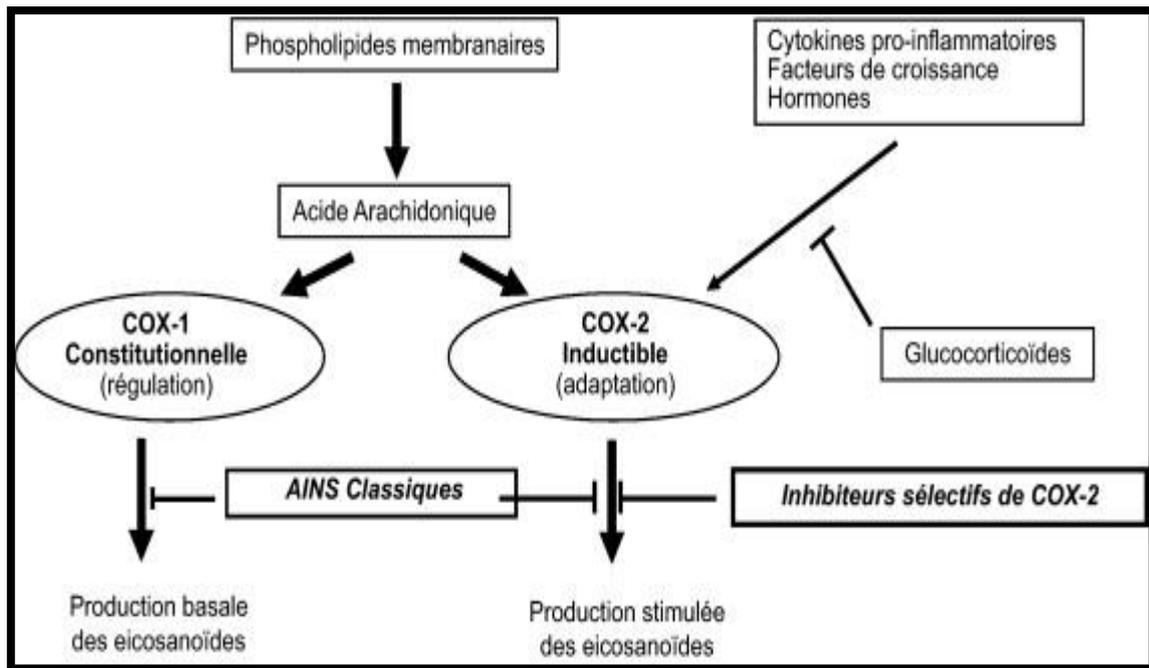


Figure 12 : Mécanismes d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens

(Tréchet et Jouzeau, 2014).

II.2.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou corticoïdes, dérivés synthétiques de la cortisone secrétés par les glandes surrénales, les AIS sont des puissants anti-inflammatoires doués également de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques utilisés en particulier en cas d'inflammation chronique tel que la polyarthrite rhumatoïde et aussi pour son effet immunosuppresseur en cas de maladies auto-immunes. Bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (hypersensibilité). Les mastocytes sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et les cytokines pro-inflammatoires. (Benavente et al., 2008; Conforti *et al.*, 2008).

II.2.4.3. Les anti-inflammatoires naturels

Les AINS et les AIS ont néanmoins l'inconvénient de réduire la défense de l'organisme et de provoquer des troubles qui peuvent être aigus (hypertension artérielle,

dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, ulcère gastroduodéal...) ou chroniques tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003 ; Strehl *et al.*, 2011). De ce fait, la recherche de produits naturels à action anti-inflammatoire est en croissance permanente. En médecine traditionnelle, depuis longtemps les produits naturels ayant des activités anti-inflammatoires ont été utilisés pour traiter la douleur, la fièvre et les maladies articulaires (Yuan *et al.*, 2006).

L'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des allergies en régulant les mastocytes. De nombreuses études ont indiqué que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, ils sont capables de inhiber les enzymes régulatrices ou les facteurs de transcription importants pour contrôler les médiateurs impliqués dans l'inflammation (Maleki *et al.*, 2019).

Par ailleurs, Les actions anti-inflammatoires des flavonoïdes *in vitro* ou dans des modèles cellulaires impliquent l'inhibition de la synthèse et des activités de différents médiateurs pro-inflammatoires tels que les eicosanoïdes, les cytokines, les molécules d'adhésion et la protéine C-réactive (Serafini *et al.*, 2010). Une étude récente a également montré que certains flavonoïdes, en particulier les dérivés de flavones, expriment leur activité anti-inflammatoire par la modulation de l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que la cyclooxygénase-2, l'oxyde nitrique synthase inductible et plusieurs cytokines essentielles (Kim *et al.*, 2004).

De plus, les saponines ont des actions analgésiques et anti-inflammatoires. *Alaoui et al.* (1998) ont démontré leur pouvoir anti-inflammatoire *in vivo* sur des œdèmes provoqués par la carraghénine chez le rat, révélant une réduction du volume des pattes similaire à celle de l'indométacine. *In vitro*, ils s'opposent à la dégradation du liquide synovial bovin par Les radicaux OH libres.

Chapitre III

Monographie des plantes étudiées

III.1. *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*

III.1.1. Classement taxonomique

Royaume : Plantae

Sous-royaume : Viridiplantae

Infraroyaume : Streptophyta

Superdivision : Embryophyta

Division : trachéophytes

Subdivision: Spermatophytine

Classe : Pinopsida

Sous-classe : Pinidés

Ordre : Pinales

Famille : Cupressacées

Genre : *Juniperus*

Espèce : *Juniperus oxycedrus*

Sous espèce : *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus* (Preston et al., 2002).

III.1.2. Noms communs

Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus, également connu sous le nom algérien : Taga (Dob et al., 2008) ; Anglais : genévrier cade, genévrier épineux, genévrier à fruits rouges ; Français : genévrier cade, genévrier épineux, oxycèdre ; Allemand : Kade, rotbeeriger Wacholder, Stech-Wacholder ; Espagnol : enebro de bayas rojas ; Suédois : stick-en.

III.1.3. Distribution

Le genévrier est originaire de la région méditerranéenne et est répandu du Maroc et du Portugal au Liban et en Syrie, atteignant le Kurdistan d'Iran, d'Irak et les montagnes du Caucase. *J. oxycedrus* a la plus grande aire de répartition située à l'intérieur des terres ainsi que sur les côtes. Il a été distribué dans le nord-ouest de l'Afrique, du Maroc à l'est de la Tunisie et en Libye, dans le sud-est de l'Europe (Albanie, Bosnie-Herzégovine, Bulgarie, Croatie, Grèce, Macédoine, Monténégro, Serbie, Slovénie), au Portugal et à l'est de l'Espagne, dans l'est et le sud de la France, dans le nord-ouest de l'Italie, Ukraine, en Asie (Arménie,

Géorgie, Fédération de Russie, Iran, Irak, Jordanie, Palestine, Liban, Syrie, Turquie) et largement cultivé (figure 14) (Vilar *et al.*, 2016 ; Al-Snafi, 2018).

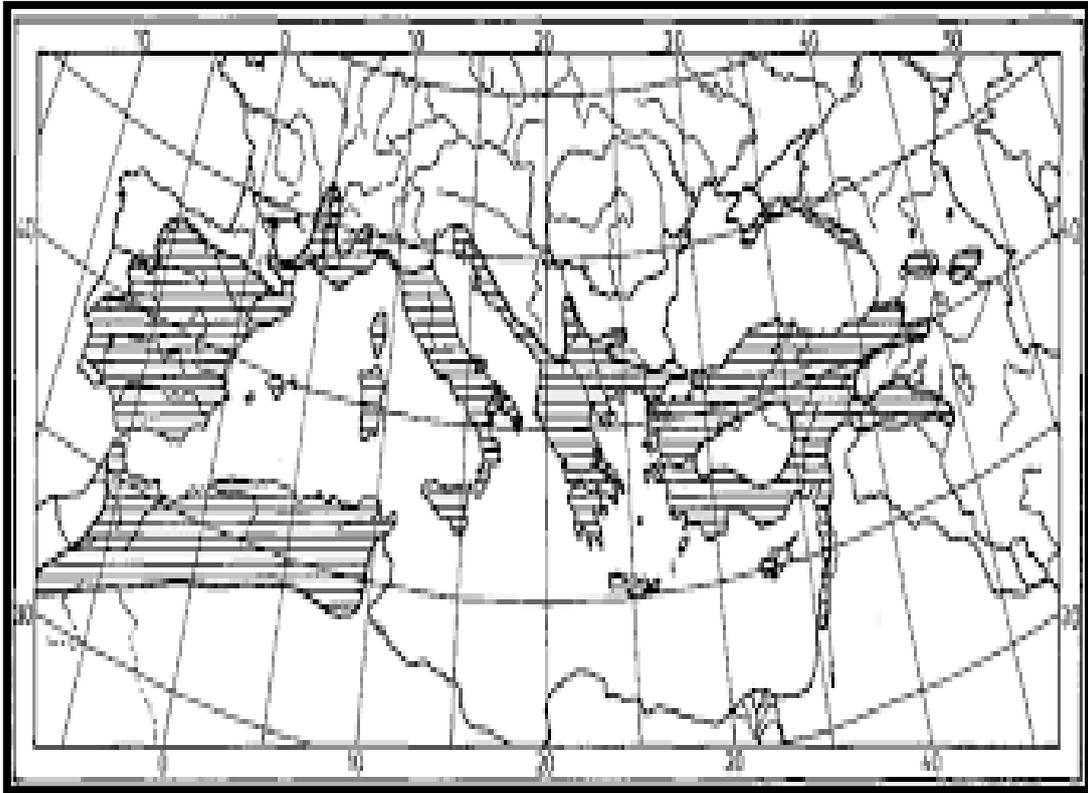


Figure 13: Aire de répartition naturelle de *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus* (Klimko *et al.*, 2007)

III.1.4. Description

J. oxycedrus subsp. oxycedrus est un grand arbuste ou arbre qui peut atteindre jusqu'à 13-15 m de hauteur (figure 14). Cette espèce possède des feuilles persistantes, glauques, en forme d'aiguilles, insérées sur les petites branches en verticilles alternés de trois. Les aiguilles sont plus longues (15-25 mm) et avec deux sillons de stomates cireux blancs peu profonds au-dessus et une crête en dessous et une pointe épineuse. Cette espèce est dioïque. Les cônes polliniques mâles sont solitaires à l'aisselle des feuilles, ovoïdes, jaunâtres, avec trois à sept sacs polliniques en dessous. Les plantes femelles ont des cônes axillaires sphériques, de couleur brun rougeâtre (jaunâtres lorsque immatures), pruneuses et insipides ressemblant à des baies (pseudo-baies) ; appelés galbulus, ils mesurent 7 à 12 mm de long. Ces cônes mûrissent en deux ans, ils ne s'ouvrent pas et se terminent par trois petites protubérances de forme

triangulaire. À l'intérieur se trouvent une à trois graines brunes de forme lancéolée et de section triangulaire obtuse. La floraison se produit de février à avril. Le tronc a une écorce fibreuse grise à brun-rougeâtre desquamant en bandes longitudinales. Il possède de nombreuses branches, étalées ou ascendantes. Le système racinaire est très robuste, capable de pénétrer dans les fissures des roches (Zanotti, 2003 ; Vilar *et al.*, 2016).



Figure 14: Caractéristiques morphologiques de *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*

III.1.5. Activités biologiques et usages traditionnels

Le *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* possède diverses propriétés thérapeutiques et activités biologiques. Voici quelques-unes d'entre elles :

III.1.5.1. Activité antioxydante

Les composés présents dans le genévrier cade peuvent avoir des propriétés antioxydantes, ce qui signifie qu'ils peuvent aider à neutraliser les radicaux libres nocifs dans le corps.

Des études antérieures ont été évalué les propriétés antioxydantes des extraits aqueux, éthanolique et méthanolique ainsi que des huiles essentielles de différent partie (aiguilles, baies, bois) de *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus* (Joo) selon divers tests ; tests de piégeage des radicaux libres (tests DPPH• et ABTS•+), activité chélatante des ions ferreux (Fe²⁺) et test du pouvoir réducteur (FRAP). Les résultats Les résultats ont montré une activité antioxydant remarquable de ces extraits végétale (Loizzo *et al.*, 2007 ; Ben Mrid *et al.*, 2019,

III.1.5.2. Activité antibactérienne

L'huile essentielle et les extraits de feuilles, résines, écorces et fruits de *J. oxycedrus* peut aider à prévenir la croissance de microorganismes tels que les bactéries, les champignons et les levures. L'extrait méthanolique des feuilles a également des effets inhibiteurs contre un large éventail d'espèces bactériennes des genres *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Brucella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Xanthomonas*, ainsi que contre *Candida albicans* (Karaman *et al.*, 2003). En outre, Les huiles essentielles de sciure de bois de Joo possédaient une activité antimicrobienne modérée contre *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli* et *Campilobacter jejuni* (Sela *et al.*, 2013 ; Medini *et al.*, 2013 ; Ouair *et al.*, 2018). Cela en fait un ingrédient potentiel pour les désinfectants et les produits de soins de la peau.

III.1.5.3. Activité anti-inflammatoire et analgésique

Des études ont montré que certaines parties du *J. oxycedrus ssp. Oxycedrus*, y compris les extraits et les huiles essentielles, peuvent présenter des propriétés anti-inflammatoires et analgésiques. Les extraits méthanolique et dichlorométhanolique de feuilles et de tiges de Joo présentent des effets anti-inflammatoires et analgésiques significatifs. Les deux extraits ont inhibé l'œdème de la patte induit chez de rat par la carraghénane. L'extrait méthanolique a montré un effet analgésique dans les modèles de stimulation chimique, mécanique et thermique alors que l'extrait de dichlorométhanol n'a montré qu'un effet significatif dans les modèles de douleur induite par stimulation chimique (Moreno *et al.*, 1997). Le extraits aqueux , méthanolique et le sous-extrait de n-butanol de de l'extrait éthanolique de *J.o. subsp.oxycedrus* poussant en Turquie ont montré une activité antinociceptive contre les contractions abdominales induites par la p-benzoquinone, ainsi qu'une activité anti-inflammatoire significative contre deux modèle d'œdème de la patte arrière induit par le carraghénane et la PGE2 chez la souris à la dose de 100 mg/kg (Akkol *et al.*, 2009 ; Orhan *et al.*, 2012). Il inhibent la réponse à l'histamine, à la sérotonine et à l'acétylcholine (Moreno *et al.*, 1998).

III.1.5.4. Hypoglycemic effect

Les activités hypoglycémiques et antidiabétiques des extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de *J.oxycedrus subsp. oxycedrus*, ont été évalués sur des rats normaux, hyperglycémiques au glucose et diabétiques induits par la streptozotocine. Les fractions et les sous-fractions isolées du sous-extrait de n-hexane et de n-butanol par chromatographie sur colonne de gel de silice selon des processus de fractionnement *in vivo* guidés par la bioactivité; possédaient une activité antidiabétique (Orhan *et al.*, 2012).

L'inhibition de l' α -amylase a été utilisée pour étudier l'action hypoglycémique de *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*. L'huile produite par hydrodistillation du bois de plante a démontré une activité inhibitrice de l' α -amylase avec IC50 de 3.49 μ l/m (Loizzo *et al.*, 2007).

III.1.5.5. Effet hypotenseur

Les extraits méthanoliques et dichlorométhanoliques de *J. oxycedrus* d'Espagne réduisent la tension artérielle des rats normotendus. L'effet hypotenseur de ces extraits était indépendant du système adrénergique (Bello *et al.*, 1997).

III.1.5.6. Effet sur la motilité des muscles lisses

Les principes actifs présents dans les extraits méthanoliques et dichlorométhanoliques des feuilles et des tiges de *Juniperus oxycedrus* exercent une réduction significative de l'activité motrice, pouvant s'opposer de manière concentration-dépendante à la réponse contractile induite par différents neurotransmetteurs (Moreno *et al.*, 1997)

III.1.5.7. Utilisations traditionnelles

Le bois, les baies et les feuilles de genévrier sont utilisés depuis l'Antiquité et étaient connus comme remède miracle au Moyen Âge. *J. oxycedrus* étaient principalement utilisés comme encens et comme remède populaire contre diverses maladies telles que les douleurs abdominales et les troubles gastriques, contre l'indigestion, les maladies gynécologiques, les hémorroïdes, le rhume, la toux, la bronchite, l'obésité, la tuberculose, pneumonie, la calcinose des articulations, contre les infections fongiques et l'hyperglycémie (WHO, 1980 ; Hayta and Bagci, 2014).

L'infusé de feuilles représentent un bon remède contre l'ictère, les troubles respiratoires (asthme) et comme un bain de bouche contre les douleurs dentaires. Les feuilles en décoction sont utilisées pour lutter contre les troubles urinaire, l'inflammation des reins, et pour éliminer les calculs rénaux (Kahouadji, 1995). Cette espèce a été utilisée dans la médecine

populaire algérienne comme diurétique, stimulante, tonique de l'estomac et pulmonaire et désinfectant dépuratif (Baba Aissa, 1991). En Turquie, la décoction de baies et de feuilles est utilisée dans la médecine populaire en interne et pour abaisser la glycémie (Baba Aissa, 1991). Les baies sont encore utilisées dans la cuisine d'Europe comme épice et pour conférer une saveur nette et nette aux plats de viande (Loizzo et al., 2007).

L'huile était très appréciée pour ses propriétés antiseptiques, ce qui signifie son large utilisation en dermatologie humaine et vétérinaire pour traiter l'eczéma, teigne, herpès et acné ou psoriasis, et s'est également révélée être un vermifuge et un parasiticide efficace contre la psore, gale, et le favus (Bertaudière-Montes et Montès, 2004; Bhar & Balouk, 2011). Le goudron est utilisé comme composant de parfum dans les savons, les détergents, les crèmes, les lotions et les parfums (Al-Snafi, 2018).

III.2. *Myrtus communis* L.

III.2.1. Classification phylogénétique

Myrtus communis L. appartient à la famille des Myrtaceae. La classification de cette famille est référée à la classification APG III (2009), qui est une classification botanique des Angiosperme basée sur des études moléculaires des deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire de ribosome (Franceschini, 2016).

Embranchement : *Spermatophytes*

Sous embranchement : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies (ou Eudicotylédones ou Eudicots), Eudicotylédones supérieurs, Rosidées, Eurosidiées II ou Malvidées

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtacées

Genre : *Myrtus*

Espèce : *Myrtus communis* L.

III.2.2. Description

Myrtus communis L, le nom grec de Myrtle et communis signifie plante commune poussant en groupes, connu sous les noms de vrai myrte, Rihan ou mersin (Sumbul *et al.*, 2011 ; Quezel et Santa,1962).

C'est un arbuste ou petit arbre vivace aromatique de 1,8 à 2,4 m de hauteur, avec une écorce profondément fissurée (Mendes *et al.*, 2001). Le myrte commun a une tige dressée et ramifiée, ses branches de taille fine de couleur verte qui se transforme rapidement en brun orangé, pubescents dans leur jeunesse, forment une tête pleine et fermée, densément couverte des petites feuilles persistantes (Barboni, 2006 ; Baytop, 1999). Ces dernières sont opposées, coriaces, ovales à lancéolées,, d'un vert foncé brillant , 2 à 3 fois plus longue que larges mesurant entre 20 et 24 mm de long et 4 à 11mm de large, à nervation pennée persistantes, munies d'un pétiole très court, à extrémités aiguës-pointues, et un peu convexes. Chaque feuille renferme au niveau de l'épiderme d'un grand nombre de cavités sécrétoires qui secrètent les huiles essentielles les rendant très aromatiques (Quezel et Santa, 1962). Il a des fleurs solitaires, hermaphrodites, actinomorphes, blanches axillaires sur des pédoncules minces, et longs de taille moyenne d'environ 3 cm de diamètre, raides ayant des anthères jaunes (figure 15). Les pétales sont d'un blanc pur avec des glandes et une marge un peu tomenteuse recouverte de poils fins. Ils dégagent une douce odeur parfumée grâce à la richesse de leurs organes floraux (sépalés, pétales, étamines, réceptacle, ovaire et style) en structures de sécrétion d'huile essentielle (Franceschini, 2016).

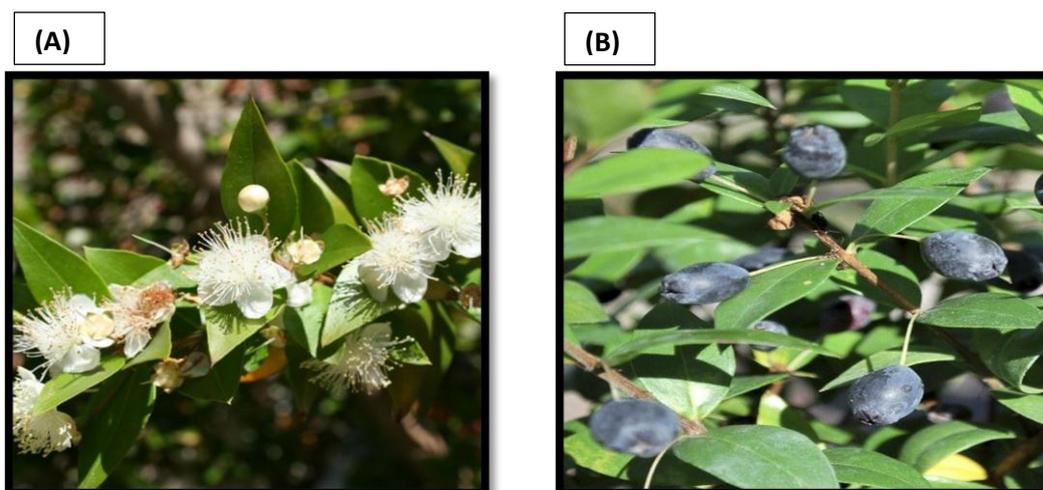


Figure 15 : Caractéristiques morphologiques de *Myrtus communis* L.

(A: fleurs, B : baies)

Le fruit est une baie orbiculaire ou ovoïdes-ellipsoïdes, bleu noirâtre, avec pédoncule ténu, surmontée par le calice. A maturité, il fait 7-10 x 6-8 mm. Le fruit développé est initialement vert pâle, puis devient rouge foncé et devient finalement indigo foncé à pleine maturité. Ils sont amers quand ils ne sont pas mûrs, doux quand ils sont mûrs. Les graines dures en forme de rein, luisantes, de couleur ivoire, et de saveur résineuse avec des formes et de tailles variables (Sumbul *et al.*, 2011 ; Bouzabata, 2015).

III.2.3. Habita

Il est originaire d'Europe du Sud, d'Afrique du Nord et d'Asie de l'Ouest (figure 16). Il est distribué en Amérique du Sud, dans le nord-ouest de l'Himalaya et en Australie et répandu dans le bassin méditerranéen. Il est également cultivé dans les jardins, en particulier dans la région du nord-ouest de l'Inde, pour ses fleurs parfumées (Sumbul *et al.*, 2011). Il peut être trouvé en Macaronésie, en Iran et en Afghanistan, en particulier à des altitudes ne dépassant pas env. 500 m au-dessus du niveau de la mer (Migliore *et al.*, 2012).

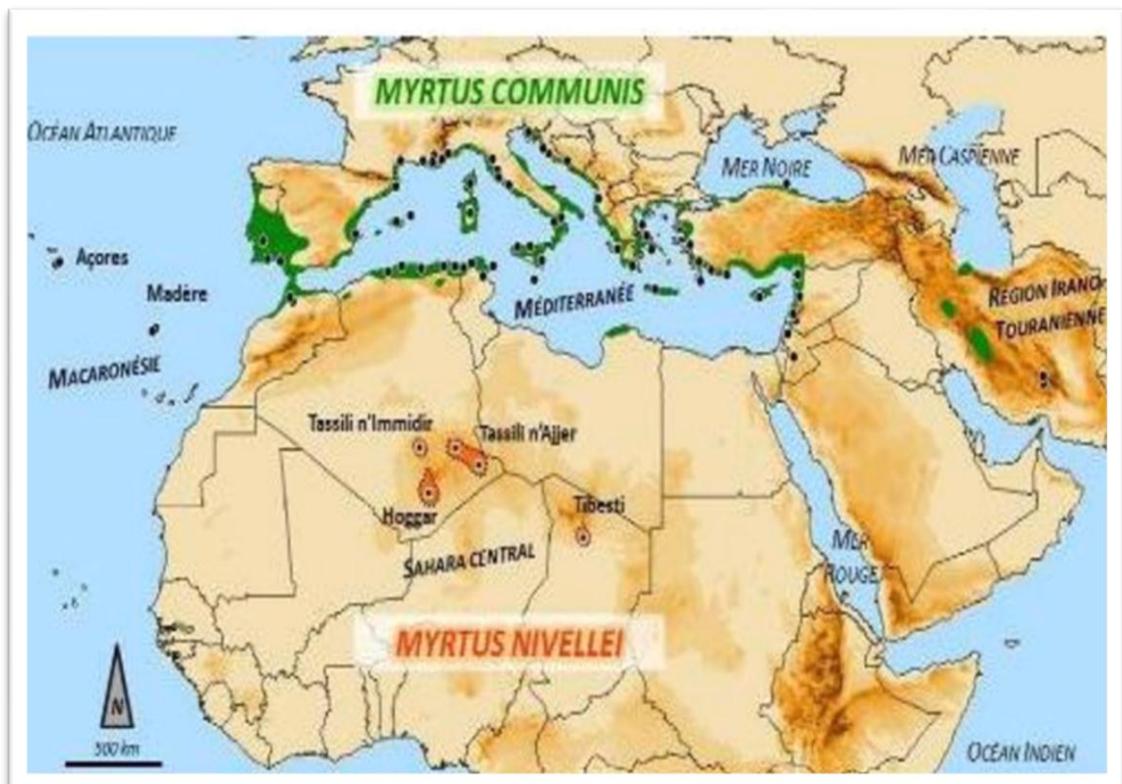


Figure 16: Aire de distribution de *Myrtus communis* L. (Migliore, 2011).

Cette espèce tolère des sols humides et bien drainés. Il est fréquent sur les sols alcalins riches en calcium. Il pousse généralement dans des conditions de température modérée et s'acclimata facilement aux températures élevée et aux températures minimales allant de -5 à -10°C. Il supporte de lumière extrême comme il peut pousser à l'ombre. Sa période de floraison est l'été (Franceschini, 2016).

III.2.4. Usages médicaux et autres

Diverses parties de *M.communis* (feuilles, baies, fleurs, branches et grains) sont depuis longtemps largement utilisées en médecine traditionnelle. De manière générale, cette plante est utilisée traditionnellement dans le traitement de nombreux types de maladies infectieuse et inflammatoire du système digestif notamment la diarrhée, et la diarrhée sanglante, dysenterie, la constipation, rectite, vomissements, prolapsus rectal, hémorroïdes et comme appétissante. Les préparations à base de plantes sont préconisées contre les ulcères gastroduodénaux, les aphtes, ulcères oculaires, les ulcères du pied et les ulcères fétides et pour désinfecter les plaies. La décoction des feuilles et des baies est utilisé en gynécologie contre les infections génitales, prolapsus utérins, leucorrhée et parois vaginales laxistes et contre certaines maladies cutanées telles que l'eczéma, mélasma et pour baigner les nouveau-nés à la peau rougie. La décoction de baies est encore utilisées pour traiter l'hypoglycémie, les hémorragies, épistaxis et la ménorragie, piqûre de scorpion, et pour la chute des cheveux (Akin *et al.*, 2012 ; Alipour *et al.*, 2014 ; Hennia *et al.*, 2018).

Les caractéristiques antiseptiques, anticatarrhale et anti-inflammatoires de cette plante justifient son utilisation comme bain de bouche, pour le traitement de la candidose, rhumatismes, entorse, fractures, mal de tête, fièvre, contre les maladies respiratoires (toux, bronchites, hémoptysie, rhinite, les sinus profonds, otorrhée) et rénale (miction, dysurie) (Mansouri *et al.*, 2012 ; Charles, 2013).

D'autres parts, la plante a été utilisée dans l'industrie alimentaire, par exemple pour aromatiser la viande et les sauces (Chalchat *et al.*, 2008). Les fleurs sont utilisées en cosmétique pour faire noircir les cheveux. L'huile obtenue à partir de baies de myrte est utilisée comme tonique capillaire dans la médecine populaire française, prévenant la chute des cheveux et favorisant leur croissance (Sumbul *et al.*, 2011). Les fleurs sont utilisées pour faire noircir les cheveux.

III.3. *Smyrniium olusatrum* L.

III.3.1. Taxonomie et noms commun

Smyrniium olusatrum, est une plante à fleurs comestible. Le nom du genre « *Smyrniium* » est dérivé du grec smyrna qui fait référence à la myrrhe en raison de l'arôme typique de ses fruits et « *olusatrum* » signifie herbe noire en raison de ses fruits noirs mûrs (Maggi et al., 2012). Il est connu sous le nom de Baldıran, Yabani kereviz, Deli kereviz, Göret et Kokar baldıran (en Turquie), alexanders ou wild Celery (en anglais), Macerone, Corinoli ou Sedano selvatico (en Italie), Macéron (en français) (Kizilarıslan-Hançer et Akalin, 2014) et sous le nom commun arabe HAYAR.

Quezel et Santa (1963) ont classé cette plante selon l'ordre systématique suivant :

Règne: Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Sous- embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotyledones

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Smyrniium*

Espèce : *Smyrniium olusatrum* L.

III.3.2. Description

Alexanders est une plante herbacée bisannuelle, facultative, robuste, glabre, parfumée au céleri, atteignant 150 cm de haut (parfois 180) cm de hauteur, avec une tige solide atteignant 22 mm de diamètre, qui devient creuse et rainurée à la fructification ; et des branches en partie supérieure souvent opposées. Il possède une racine pivotante aromatique épaissie pouvant atteindre 50 à 60 cm de long de, ainsi que des racines latérales fibreuses plus fines près de la surface. Sillons plus apparents et plus profonds sur les tiges supérieures. Les feuilles sont largement en forme ovales à rhombiques, divisées 2 ou 3 fois en terne (parfois pennées), vert foncé et brillante (figre 17), lobées et dentelées avec des dents obtuses, tous

pédunculés. Ombelles composées axillaires et terminales avec un pédoncule plus long que les rayons. Généralement, l'ombelle terminale porte des fleurs mâles et hermaphrodites dans un rapport d'environ 4 : 1 (les ombellules mâles sont au centre); tandis que les ombelles axillaires n'ont souvent que des fleurs mâles. Cela se voit mieux à maturité, lorsque les fleurs mâles se fanent sans produire de fruits. Bractées sont petites, pâles et discrètes (ou absentes). Les fleurs actinomorphes sont petites (1,5 mm) avec 5 pétales jaunâtres et 5 minuscules sépales verts, 5 étamines et 2 styles à bases allongées. La plante fleurissant une fois avant de mourir.

Le fruit mûr est un schizocarpe noir de 7 à 8 mm de long, qui se divise en deux méricarpes à une seule graine, révélant une tige (le carpophore) qui passe entre eux. Chaque méricarpe est doté de 3 crêtes et de nombreux vittae (tubes d'huile), qui exsudent une huile piquante semblable à celle de la myrrhe. Une seule plante peut produire entre 3 000 et 9 000 graines en une seule année.

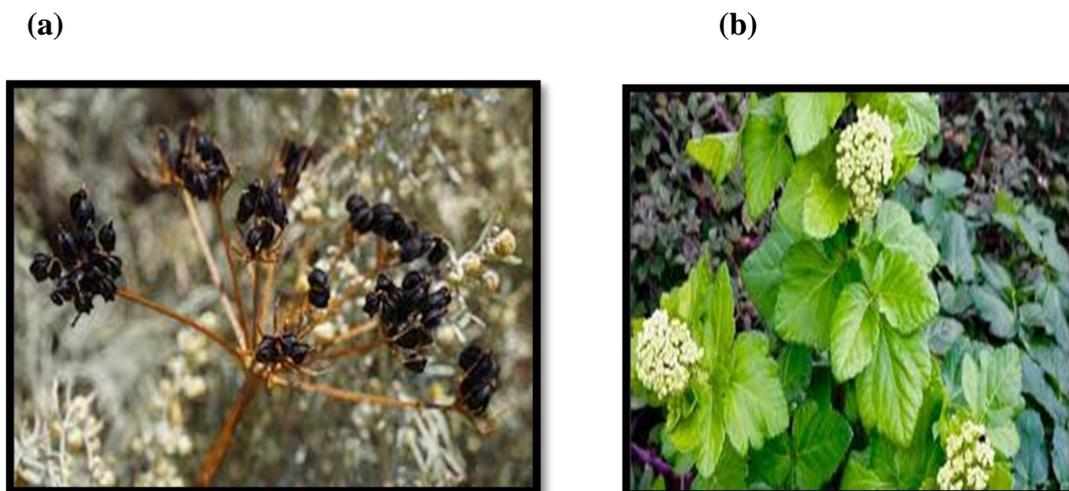


Figure 17: Caractéristiques morphologiques de *Smyrniium olusatrum* L.

(a: grains, b : feuilles et fleurs)

III.3.3. Répartition géographique et habitat

S. olusatrum est une plante originaire du bassin méditerranéen et atlantique, qui pousse abondamment dans les marais salants et les terres incultes proches de la mer, généralement sur des sols calcaires. Il pousse à l'état sauvage dans les champs, incultes, entre les haies, les ruines et les décombres et bien établi dans des endroits humides, à la lisière des forêts, des dunes humides et des falaises côtières. *Smyrniium olusatrum* est répandu dans les pays riverains du bassin méditerranéen à sa limite nord en Écosse et en Irlande. Il est présent dans toute l'Europe, où il est signalé dans les zones côtières, y compris les îles, et s'étend jusqu'à la

Crimée et la mer Noire (figure 18). En Angleterre, il est localement commun dans les haies, les berges clôturées, les falaises, les carrières, les talus de voies ferrées et occasionnellement dans les zones boisées. Il est également répandu sur la côte ouest d'Irlande et les zones côtières de la Turquie occidentale, au sud de l'Espagne, à l'Italie, et moins fréquent sur les matos du Portugal (Pignatt, 1982 ; Randall, 2003).

Il est également réparti le long de la côte atlantique du continent depuis la péninsule ibérique vers le nord en passant par la France, la Belgique, les Pays-Bas, le Danemark et (récemment) jusqu'en Norvège ; et vers l'ouest jusqu'aux Açores. En Afrique du Nord, il est limité aux régions méditerranéenne et atlantique, y compris les îles Canaries. Il est signalé comme une introduction en Nouvelle-Zélande, en Australie et aux Bermudes (Randall, 2003).

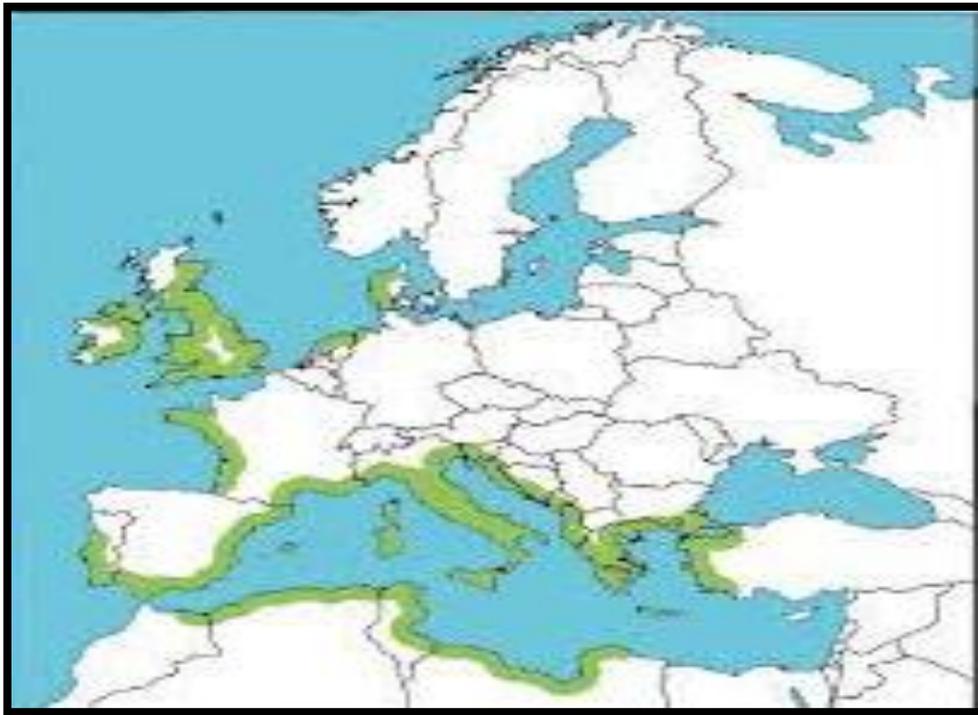


Figure 18 : La répartition de *Smyrniolus sativus* L. (Randall, 2003)

III.3.4. Usages

Toutes les parties de la plante sont considérées comme comestibles. Le céleri sauvage est utilisé en cuisine pour leur contenu aromatique comme condiment et épice. En Sardaigne, les graines séchées moulues donnent une poudre aromatique piquante comme du poivre (Atzei, 2003).

En plus de ses utilisations culinaires, le *Smyrniium* a été utilisé à des fins thérapeutiques en médecine traditionnelle. Les racines étaient utilisées pour ses propriétés aromatiques, stimulantes de l'appétit, diurétiques, laxatives, comme antiscorbutique, stomacale et antiasthmatique. Les feuilles et les fruits ont été utilisés comme remède contre le scorbut. Les graines ont également été considérées comme stomachique et antiasthmatiques. Les tiges ont été considérées comme antiscorbutique dépuratif, diurétique, stomacale et laxatif (Fournier, 1947 ; Saida et al., 2020).

Alexandre est également donné au bétail pour traiter les plaies buccales causées par le scorbut. En Écosse, les marins l'utilisaient pour purifier le sang et prévenir le scorbut (Allen et Hatfield, 2004).

III.3.5. Activités biologique

De nombreux de recherches ont prouvé les effets bénéfiques de *S. olusatrum* en tant qu'agent antileishmanien, insecticide, agent acaricide antimicrobien et antifongique.

a/ Activité insecticide

Une étude menée par Benelli et al. (2017) a montré que l'isofuranodiène et le germacrone, deux sesquiterpène oxygéné isolé de l'huile essentielle de *S. olusatrum*, sont toxiques pour les adultes du tétranyque à deux points *Tetranychus urticae*, en plus de leur efficacité contre les acariens, et donc les considérant ainsi comme une nouvelle molécule pour le développement des biopesticides.

Les isofuranodiènes isolé de l'HE de *S. olusatrum* ont montré une activité potentielle en tant qu'agent insecticide contre les larves de moustiques *Culex quinquefasciatus*, avec peu d'impact sur les espèces non ciblées (Pavoni *et al.*, 2019).

b/ Activité antimicrobienne

D'un autre côté, certaines recherches se sont concentrées sur L'effet antibactérien et antifongique de *S. olusatrum* L. Il a été démontré l'action antiproliférative des huiles essentielles notamment contre les espèces à Gram-positifs : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecium* *Enterococcus faecalis*, et contre *Bacillus rhurinziensis* (Saida *et al.*, 2020 ; Daroui-Mokaddem *et al.*, 2010)

Des études ont été prouvé l'effet antifongique de céleri sauvage. Les huiles essentielles étaient particulièrement actives contre *Cryptococcus neoformans* et contre cinq souches

cliniques de dermatophytes isolées des ongles et de la peau (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*) avec des valeurs de CMI comprises entre 0,32 et 0,64 mL (Marongiu *et al.*, 2012). En outre, il a été rapporté que Les HE de *S. olusatrum* possède une bonne activité inhibitrice de la souche *Aspergillus niger* et de *Candida albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition égale à 18 mm et 8 mm respectivement (Daroui-Mokaddem *et al.*, 2010 ; Quassinti *et al.*, 2013)

c/ Activité anticancéreuse

Une étude a révélé que les isofuranodiène isolés de l'huile essentielle (HE) de *S. olusatrum* supprime la prolifération de nombreuses lignées de cellules cancéreuses telles que le carcinome hépatocellulaire, la leucémie et les cellules du cancer du poumon, montrant une synergie avec certains agents chimiothérapeutiques, tels que le tamoxifène et le paclitaxel (Xu *et al.*, 2012). En revanche, les huiles essentielles de ce légume négligé ont montré des effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires tumorales humaines, liés à leur teneur en furanosesquiterpénoïdes, avec des valeurs IC50 sur les cellules du carcinome du côlon, du glioblastome et de l'adénocarcinome du sein de 8,51, 13,35 et 14,81 µg/ml respectivement (Quassinti *et al.*, 2013).

d/ Effet antiparasitaire

Petrelli *et al.* (2017) ont étudié *in vitro* l'activité anti-trypanosomienne de *S. olusatrum*. Les huiles essentielles obtenues à partir de différentes parties de la plante ont inhibé efficacement la croissance du parasite protozoaire *Trypanosoma brucei*, responsable de la trypanosomiase humaine africaine (THA), avec des valeurs IC50 variant entre 1,9 et 4,0 µg/ml.

e/ Activité antioxydant

les extraits méthanoliques et les huiles essentielles extraites de différentes parties du céleri sauvage (feuilles, racines et fruits) ont montré un puissant pouvoir antioxydant avec les tests DPPH, ABTS et FRAP qui pourrait être dû à la présence de curzérène (Minareci *et al.*, 2012 ; Quassinti *et al.*, 2013)

PARTIE II

Etude expérimentale

Chapitre 1

Matériels et méthodes

1. Objectifs

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la région de Mascara et la découverte des nouveaux anti-inflammatoires naturels alternatif à la médecine moderne, ce travail est porté sur l'étude de la composition chimique des extraits phénoliques et des huiles essentielles de trois plantes *Myrtus communis* L., *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* L. et *Smyrniium olusatrum* L. et d'évaluer leur effet antioxydant et anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* chez le modèle animal ; le rat Wistar.

A cet effet, nous traitons les points suivants:

- Extraction des polyphénols et des huiles essentielles de la partie aérienne des plantes sélectionnées.
- Criblage phytochimique des extraits végétaux
- Détermination de la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins.
- Analyser de la composition chimique des extraits phénoliques par HPLC et des huiles essentielles par GC-MS.
- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des substances bioactives.
- Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*
- Tester *in vivo* la toxicité aiguë des huiles essentielles
- Préparation des formes galéniques à base des huiles essentielles
- Contrôler la qualité physicochimique et microbiologique et l'irritation primaire cutanée des formulations galéniques préparées.
- Evaluation *in vivo* de pouvoir anti-inflammatoire des préparations galéniques sur l'arthrite rhumatoïde induit par le formol chez le rat Wistar.

Cette étude a été réalisée au sein de laboratoire de bioconversion, génie microbiologique et sécurité sanitaire (BGMSS) de l'université de Mascara et au niveau de la ferme expérimentale de la faculté SNV.

2. Matériels

2.1. Matériel végétal

Le choix des plantes est axé sur la valorisation de la flore de la région algérienne, notamment les espèces abandonnées, géographiquement accessibles afin de contribuer à sa réévaluation et à la découverte de nouvelles activités biologiques non encore testées.

Les parties aériennes (feuilles et tiges) des plantes étudiées ont été récoltées dans trois stations différentes dans la wilaya de Mascara. *Myrtus communis* L. (Rayhane) a été récolté en mois de juin 2018 à Ghirène au niveau de la région d'El-Menaouer (*Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus* (Taga) a été récolter en octobre 2018 a la daira de Nesmet et *Smyrniium olusatrum* L.(Hayar) a été récolté à Sidi Benyekhlef en en mois d'avril 2019.

En effet, L'identification botanique des espèces étudiées a été effectuée par Mr Righi K., professeur en botanique à la faculté d'SNV de l'université de Mascara. Les localisations géographiques des zones de récolte ont été déterminées par le logiciel de Google Earth . Tous les spécimens ont été récoltés d'une manière homogène en gardant une distance inter-plantes fixe sur chaque terrain, afin de couvrir l'ensemble des populations végétales retrouvées et garder le caractère aléatoire de l'échantillonnage (Landoulsi, 2016). Les caractéristiques géographiques des lieux de récolte des différents échantillons sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 01 : Les caractéristiques géographiques des régions de récolte.

Plantes médicinales	station de cueillette	Altitudes(m)	Latitude	Longitude
<i>Myrtus communis</i> L.	El-Menaouer	905	35°32'57N	0°22'23 E
<i>Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus</i>	Nesmoth	750	35°14'58N	0°22'57 E
<i>Smyrniium olusatrum</i> L.	Sidi Benyekhlef	600	35°22'30 N	0°11'08 E

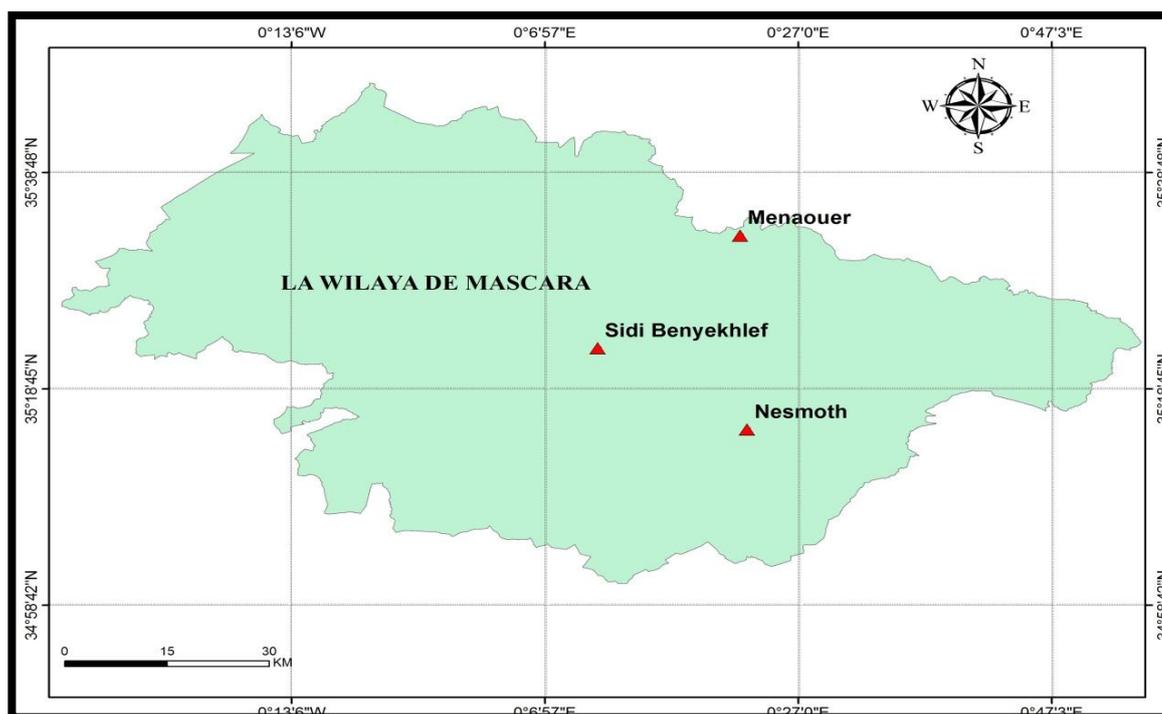


Figure 19 : La carte géographique représentant le site de récolte.

Les parties aériennes (tiges et feuilles) des plantes (figure 20) ont été séchées à l'air libre et à température ambiante (25-30°C) pendant deux semaines. Le séchage des plantes assure la stabilité des composés antioxydants tels que certains flavonoïdes, en particulier les glycosides qui peut être dégradé par les enzymes du matériel végétal frais (Bruneton, 1999).

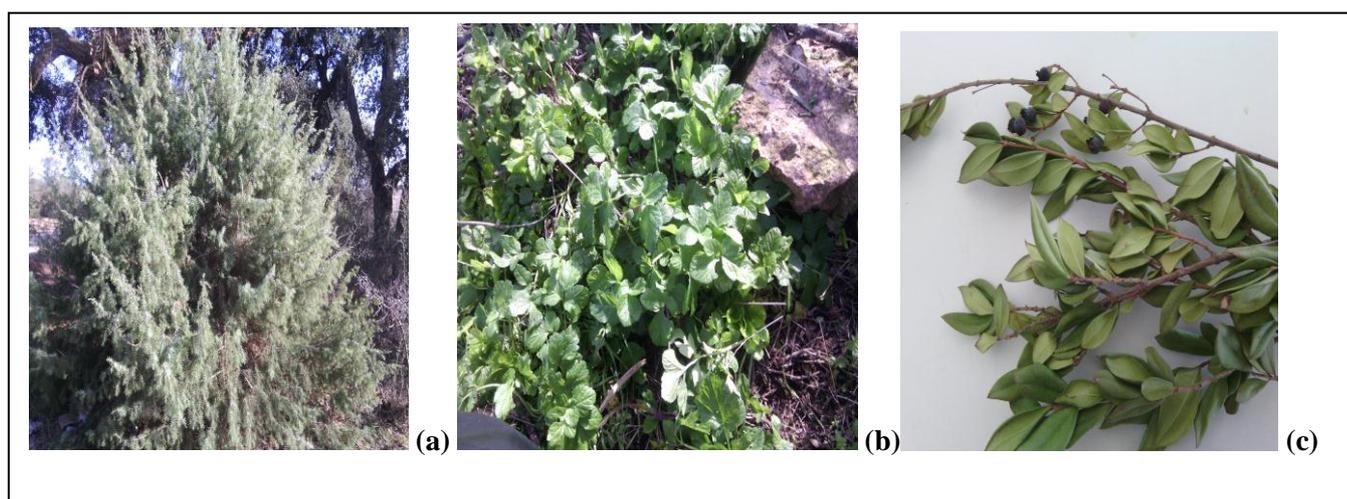


Figure 20 : Les parties aériennes de *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus* (a), *Smyrnium olusatrum* L. (b) et de *Myrtus communis* L. (c)

2.2. Modèle animal

Le modèle utilisé est le rat adulte "Rattus norvegicus" de la souche Wistar, de sexe male et de poids corporel moyen de 210 ± 10 g. Les animaux sont élevés à l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mascara. Les rats sont gardés à une température ambiante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, une humidité entre 35-60% avec un cycle photopériodique naturel et une nourriture avec des granules alimentaires et de l'eau d'une manière ad libitum, respectant les conditions d'expérimentation et de traitement conformes aux lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE, 2004).

3. Méthodes

3.1. Extraction et caractérisation des composés phénoliques

3.1.1 Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols a été effectuée selon deux techniques ; extraction à chaud par infusion et extraction à froid par macération organique dans le méthanol selon le protocole décrit par Chavane et al., (2001) en y apportant quelques modifications. Les extraits aqueux ont été préparés en trempant 10 g de la poudre végétale dans 200ml d'eau distillée bouillante, l'infusé a été mis en repos pendant 30 min. La préparation des extraits hydro-méthanolique a été faite en mélangeant 10g de chaque poudre avec 100 ml de méthanol 70%, les mélanges ont été mis en agitation constante pendant 24H. L'ensemble des préparations ont été filtrés à travers du papier filtre Whatman n° 1, ensuite les extraits obtenus ont été séché à 45°C puis maintenu à 4°C .

Calcul des rendements

Le rendement des extraits des plantes étudiées a été calculé selon, la formule suivante :

$$R(\%) = PE/PMV * 100$$

PE : Poids de l'extrait obtenu

PMV : Poids de matière végétale

3.1.2 Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualitatif destiné à identifier les différents constituants phytochimiques tels que les flavonoïdes, les tanins, les saponines et les terpénoïdes et les stéroïdes présents dans les plantes et leurs extraits.

Détection des phénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols. 2ml de chaque extrait a été traité avec 3-4 gouttes de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. La formation d'une couleur noire bleuâtre verte plus ou moins foncée indique la présence de phénols (N'Guessan et al., 2009).

Détection des flavonoïdes

La recherche des flavonoïdes est effectuée selon la Réaction de cyanidine. 2 ml d'extrait est introduit dans un tube à essai avec 5ml d'acide chlorhydrique. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration rose-orangé ou violacée avec un dégagement de chaleur ont confirmé la présence de flavonoïdes (N'Guessan et al., 2009).

Détection des saponines

2 ml d'extrait dilués avec de l'eau distillée (10%) a subi une agitation horizontale pendant 10 secondes. les résultats sont exprimés en fonction de la hauteur (cm) de la couche de mousse obtenus après 10 minutes de repos (Ayoola et al, 2008).

Détection des tannins

Un volume de 1 ml d'extrait est introduit dans un tube à essai avec 1 ml d'eau distillée et 1 ml de solution de trichlorure de fer (FeCl_3) diluée 10 fois. L'apparition d'une couleur vert foncée indique la présence des tannins catéchiques. Tandis que les tannins galliques sont confirmés par une couleur bleu-verte (Ayoola et al, 2008).

Détection des Stéroïdes et terpènes

Le test de Salkowski est utilisé pour la caractérisation des terpènes et stéroïdes dans les extraits végétal. Un volume de 5 ml de chaque extrait a été additionné à 2 ml de chloroforme. En suite, 3 ml de H_2SO_4 concentré ont été ajoutés avec précaution et sans agitation pour assurer la séparation des couches. Une coloration brun rougeâtre de l'interface indique la présence de produits stéroïdiques ou terpéniques (Ayoola et al, 2008).

3.1.3. Dosage des composés phénoliques

a/ Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Cette méthode est basée sur le pouvoir des polyphénols oxydés à réduire le réactif folin-ciocalteau formé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), de couleur jaune à un complexe de couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et charpentier, 2006). La longueur d'onde de spectrophotomètre est réglée à 765nm (Kanoun, 2011).

Dans un tube à essai introduire 100 μ l d'extrait (préparé à une concentration de 1 mg/ml) et 0,75 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois avec de l'eau distillée. Le mélange a été agité vigoureusement laissé reposer à température ambiante pendant 5 minutes. 0,75 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 6% (p/v). Après incubation à l'ombre et à la température ambiante pendant 90 min, l'absorbance est mesurée à 765nm à l'aide d'un Spectrophotomètre UV-Vis. La courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (figure 21), les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

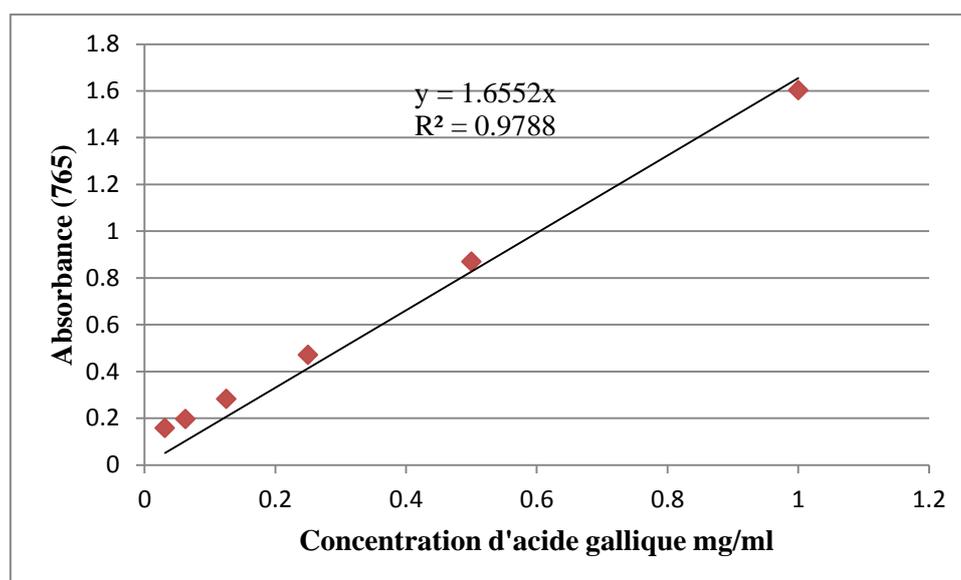


Figure 21 : Courbe d'étalonnage d'Acide gallique

b/ Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) décrite par Bouaziz et al., 2015 légèrement modifiée. 1ml d'extrait est ajouté à 1 ml d'AlCl₃ à 2% préparé dans le méthanol, le mélange est homogénéisé par une agitation vigoureuse, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance du mélange a ensuite été déterminée à 510 nm contre un blanc. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme flavonoïde standard (figure 22). La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g).

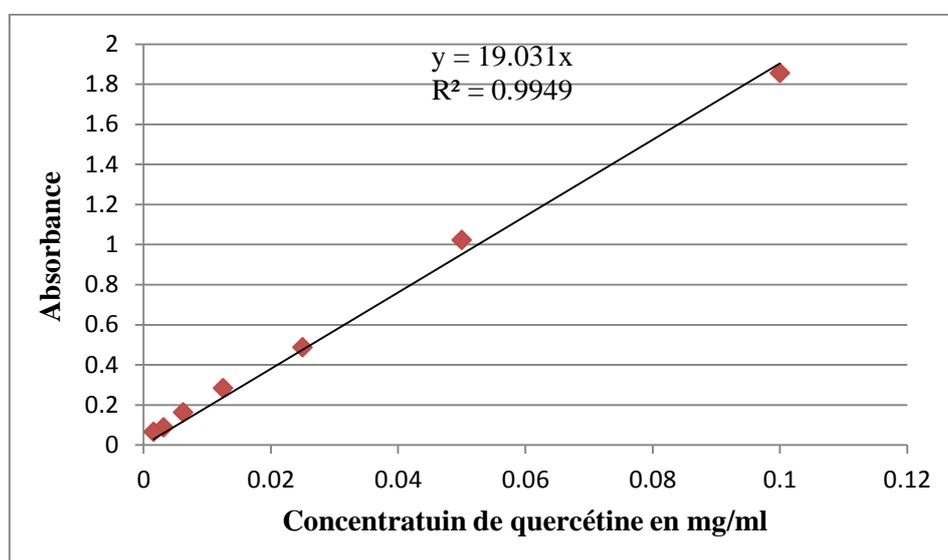


Figure 22: Courbe d'étalonnage de la quercétine

c/ Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode à la vanilline en milieu acide décrite par Chaouche et al (2015). L'ajout de la vanilline dans un extrait contenant les tanins donne une coloration rouge. Cette dernière est issue de la formation des complexes entre la vanilline et les flavan-3-ols libres ainsi que les unités terminales des proanthocyanidines, dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le mélange (Boukhenoufa, 2020).

Un volume de 0.25 ml d'extrait a été mélangé avec 1.5 ml de solution de vanilline (4 % dans du méthanol) et 0.75 ml d'acide chlorhydrique. Le mélange a été incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance a été mesurée à 500 nm contre un blanc constitué d'un mélange de méthanol et de HCL. Une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard (figure 23). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de catéchine (CE) par gramme d'extrait sec (mg EC/g).

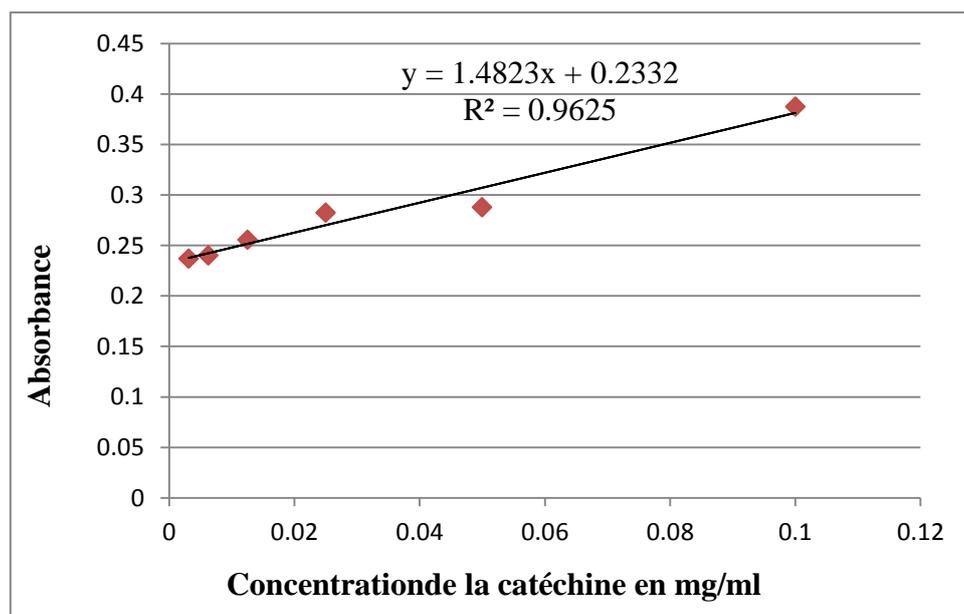


Figure 23: Courbe d'étalonnage de la catéchine

3.1.4. Analyse Chromatographie liquide à haute performance HPLC

L'analyse Chromatographie des extraits sont réalisé au niveau du laboratoire VTRS, Université d'El Oued, Algérie, suivant la méthode décrite par Mesbahi et al. (2019).

Les composés phénoliques présents dans les extraits ont été identifiés à l'aide d'une chromatographie liquide à proéminence modèle Shimadzu, à un compartiment à colonne thermostatique et un dégazeur en ligne. Le détecteur UV-visible est de type SPD-20A fonctionné à 268 nm. L'analyse quantitative de ces échantillons est faite en utilisant une colonne de type Shim-pack VP-ODS C18 (4,6 mm × 250 mm, 5 µm), (Shimadzu Co., Japon).

La phase mobile est caractérisée par l'utilisation de deux solvants : acétonitrile (solvant A) et acide acétique dilué dans l'eau distillée 0,2 % (Solvant B).

Des solutions mères d'extraits de plantes, ainsi que des solutions standard ont été préparées en dissolvant 10 mg d'extrait ou de polyphénol purifié dans une bouteille volumétrique de 50 ml contenant un volume suffisant de méthanol (qualité HPLC) et il a été soniqué pendant environ 10 min puis amené au volume avec la phase mobile. Le volume d'injection des échantillons et des solutions étalons était de 20 μL avec un débit de 1 ml/min. Tous les échantillons et la phase mobile ont été filtrés à travers un filtre à membrane de 0,45 μm .

La méthode linéaire du gradient était : à partir de 90 % (B) ; puis diminuant à 86 % (B) en 6 min, à 83 % (B) en 16 min, à 81 % (B) 23 min, maintenu à 77 % (B) en 28-35 min, à 60 % (B) en 38 min, à 90 % (B) en 50 min. L'identification des pics de chromatographie a été réalisée en comparant leur temps de rétention et leur spectre d'absorption UV avec ceux des standards de référence réalisés dans les mêmes conditions. Toutes les opérations de chromatographie ont été réalisées à température ambiante.

3.2. Extraction et identification des huiles essentielles

3.2.1. Extraction des huiles essentielles

Le choix de la technique d'extraction influe directement sur le rendement d'extraction et sur la qualité des substances obtenues. Dans le présent travail, les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation en utilisant un montage d'hydrodistillation classique à partir de la partie aérienne des plantes (figure 25).

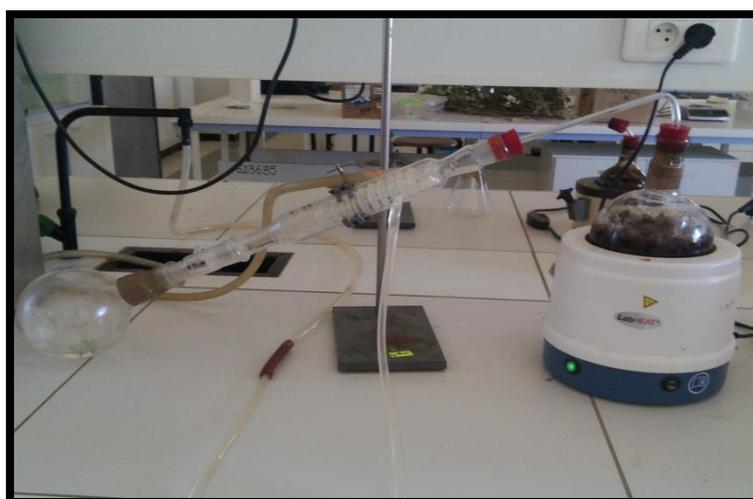


Figure 24: Dispositif d'extraction des huiles essentielles

Le principe consiste à immerger la matière première sèche dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à l'ébullition. Les molécules odorantes volatiles et semi-volatiles sont alors entraînées par la vapeur d'eau. Ces vapeurs hétérogènes, au contact du froid, se condensent et deviennent liquides. Le liquide en question est formé d'un mélange d'eau et d'huile essentielle aromatisée.

L'extraction des huiles essentielles est réalisée selon le protocole de Khebrine, 2011 avec modification. 250 g de la matière végétale sèche est introduite dans un ballon contenant 750mL d'eau distillée, L'ensemble a été soumis à l'hydrodistillation pendant 3 heures. Sous hotte, l'hydrodistillat a subi 3 lavages successifs (10, 10, 20 ml) de cyclohexane avec l'ajout de 8 g de chlorure de sodium (NaCl), après agitation le mélange a été mis dans une ampoule à décanter pour séparer la phase organique de la phase aqueuse.

Les HE sont récupérés par condensation au rotavapeur, puis séchées avec 5 g de sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 et stockées dans des flacons en verre hermétiques. Elles ont été conservées à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à l'étape d'analyse (Belkhodja, 2017)

Calcul des rendements

Le rendement en HE est exprimé en pourcentage et il est défini selon Khebrine (2011) par l'équation suivante :

$$R(\%) = \frac{P1 - P2}{P3} * 100$$

P1: Poids du ballon avant évaporation

P2: Poids du ballon après évaporation

P3: Poids de la matière végétale

3.2.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles par CG-SM

L'identification chromatographique est réalisée au niveau du Laboratoire de Chimie Physique des Macromolécules et Interfaces Biologiques (LCPMIB), Université Mustapha Stambouli, Mascara, Algérie.

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Shimadzu QP2010 (figure 25) avec une colonne capillaire de type TG-5MS (30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm d'épaisseur de film). Le mode d'injection était sans division (splitless) avec un rapport de division de : 30,0. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,58 ml/min. La température de la colonne a été programmée à chauffer de 60 °C à 240 °C à une vitesse de 5°C/min pendant 20 min. Dans l'unité de spectromètre de masse, les conditions suivantes ont été utilisées : température de la source d'ions de 200°C ; Température d'interface : 250 °C ; Temps de coupure du solvant : 2 min et une tension ionisante de 1,04 kV. La plage de balayage était de 20 m/z à 600 m/z. Les constituants volatils des échantillons ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse avec la base de données des spectromètres du NIST 11- MassSpectral Library, version 2011.



Figure 25 : Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse de type Shimadzu QP2010

3.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Estimation du pouvoir antiradicalaire des plantes a été étudiée selon deux méthodes : le piégeage du radical libre DPPH et la capacité antioxydante totale.

3.3.1. Piégeage du radical libre DPPH

Principe:

Le DPPH° est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Les composés à propriété antiradicalaire (A-H) cèdent un hydrogène au radical DPPH ° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et le réduit en diphényle-picrylhydrazine de couleur jaune pâle. Cette décoloration est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002). La réaction est résumée dans la figure 26.

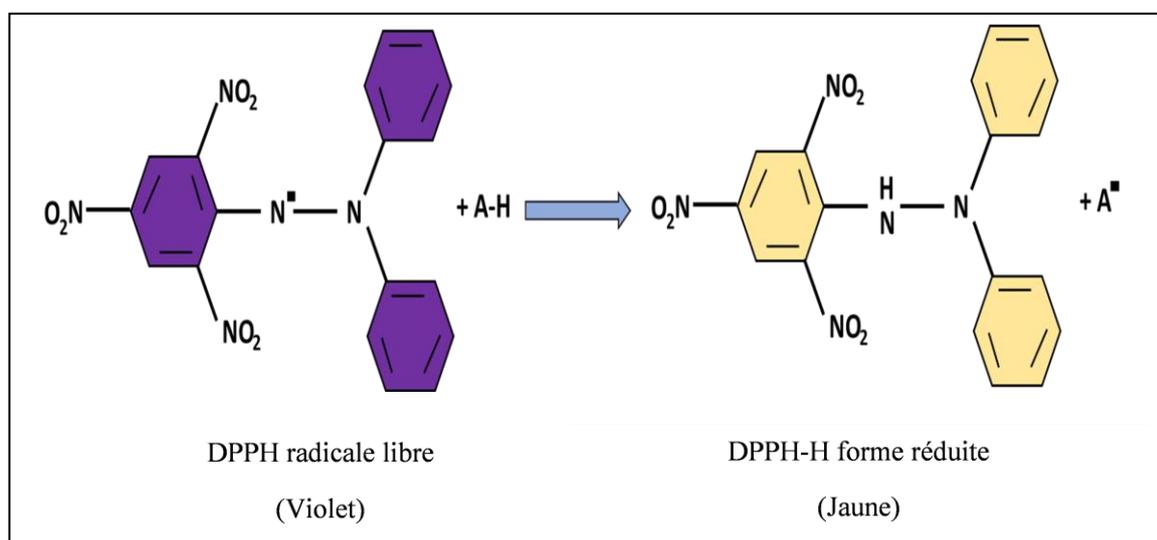


Figure 26: Mécanisme réactionnel de DPPH (Sanchez-Moreno, 2002).

Mode opératoire :

Le potentiel antioxydant des extraits de plantes a été étudié selon la méthode DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) décrite par Wannes et al. (2010). 0.5ml d'une solution méthanolique de DPPH 0,2 mmol/l ont été ajoutés à 1ml de solution d'échantillon préparée dans du méthanol à différentes concentrations (1 000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml). Après agitation, le mélange est incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance a ensuite été mesurée à 517 nm contre un blanc en remplaçant les extraits par le méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ;

l'acide ascorbique dont l'absorbance été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I) selon la formule suivante

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

Calcul des IC50

IC50 est défini comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les valeurs de l'IC50 ont été déterminées graphiquement par une régression linéaire (Attou, 2021).

3.3.2. Activité antioxydante totale (TAC)

Principe

La capacité antioxydante totale (TAC) a été évaluée selon la méthode au phosphomolybdène décrite par Prieto et al., 1999. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait ou de l'huile pour former un complexe vert à jaunâtre de phosphate/Mo(V) à pH acide.

Mode opératoire :

Dans un tube à essai, 0.3 ml de chaque extrait (1mg/ml) ou de l'huile essentielle sont mélangés avec 3 ml de solution du réactif (préparé par 0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 95 min, après refroidissement l'absorbance est mesurée à 695 nm contre le blanc en remplaçant les échantillons par le méthanol incubé dans les mêmes conditions. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/ g MS) (Prieto et al., 1999). Les expériences sont répétées en 3 fois.

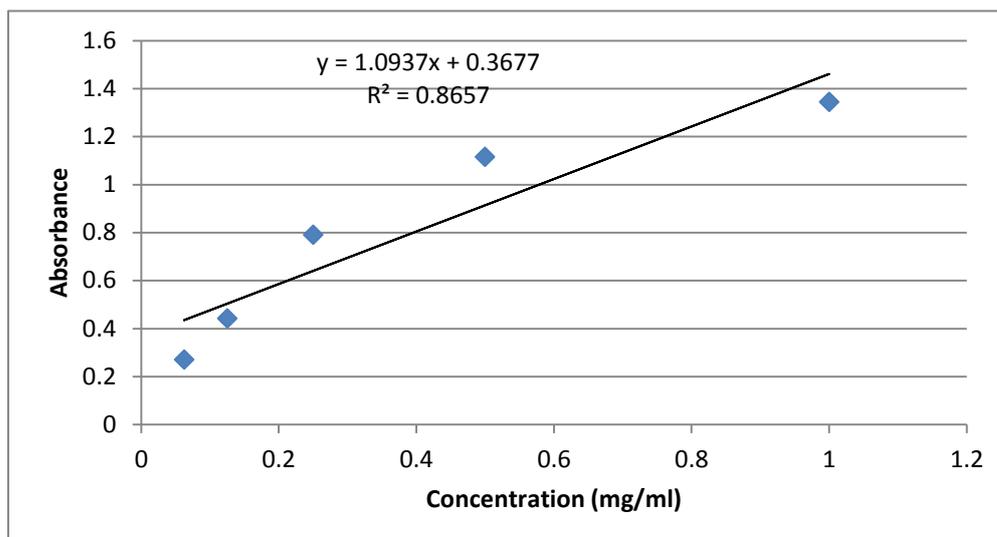


Figure 27 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

3.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été réalisée par la méthode de dénaturation des protéines d'albumine d'œuf, selon le protocole décrit par Bailey-Shaw *et al.* (2017) avec de légères modifications. 2 mL de solutions d'échantillons ou standard (diclofénac) à différentes concentrations (125, 250, 500 et 1000 µg/ml) ont été mélangées avec 0,2 ml de solution aqueuse d'albumine d'œuf (5 %) et 2,8 ml de solution saline de tampon phosphate (pH 6,4). Un volume double de méthanol a servi de contrôle. Les mélanges sont ensuite incubés à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 15 min puis chauffés à 70°C pendant 10 minutes pour induire la dénaturation. Après refroidissement, les absorbances sont mesurées à 660nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé, en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_{\text{test}} - A_{\text{contrôle}}) / A_{\text{contrôle}} \times 100.$$

Dont: $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de blanc et A_{test} est l'absorbance du standard ou de l'échantillon à 660 nm.

Le résultat obtenu est la moyenne de trois répétitions. La concentration (CI50) de l'extrait pour une inhibition de 50% est déterminée par la courbe dose-réponse.

3.6. Etude *in vivo* de la toxicité orale aiguë

L'évaluation de la toxicité aiguë est une étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques résultant d'une administration unique ou multiple d'un xénobiotique ne dépassant pas 24 heures. Les manifestations cliniques se développent rapidement en général, la mort ou la guérison survient sans retard (Bensakhria, 2018).

Les tests de la toxicité aiguë ont été menés par voie orale suivant la méthode de la ligne 423 de l'OCDE ; Directives du Journal Officiel des Communautés Européenne (OCDE, 2001). Les huiles essentielles ont été sélectionnées pour cette étude test en basant sur les résultats de l'étude *in vitro* du pouvoir anti-inflammatoire.

Mode opératoire

L'évaluation de la toxicité orale a été réalisée sur 50 rats WISTAR (mâles) saines pesant entre 200 – 250 g, répartis en 10 lots. Les rats sont mis à jeun pendant 24 h, ils ont accès juste à l'eau, puis divisées 4 groupes de 15 animaux. Le 1^{er} groupe ou groupe-témoin reçoit de l'eau distillée (10ml/kg) tandis que le 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} groupes recevant les différentes doses croissantes de l'huile essentielle de *J. oxycedrus*, *M. communis* et *S. olusatrum* respectivement. Chaque groupe est divisé en trois lots de 5 rats dont chacun a reçu par gavage une dose unique 1000, 2000 et 5000 mg/kg du poids corporel respectivement.

Les animaux ont été observés durant 14 jours, les signes cliniques et les mortalités ont été notés. L'évolution pondérale est aussi notée.



Figure 28 : Toxicité aiguë par voie orale

3.5. Préparation et contrôle de la formulation galénique

3.5.1. Préparation de la formulation galénique

Le choix de type de formulation est basé sur la voie d'administration qui pose moins de problèmes, dont nous pouvons également surveiller leurs effets secondaires à l'œil nu.

La voie cutanée a été sélectionnée pour l'administration des traitements représentée par une formulation classique de pommade. Nous avons préparé 3 formulations à base des huiles essentielles des plantes : formulation à base des huiles essentielles de juniperus (FHJ), la deuxième à base de l'huile essentielle extraite à partir de myrte (FHM), et la dernière formulation est préparée en utilisant les HE de smyrnium (FHS).

Mode de préparation

Nous avons préparé des pommades de type hydrophobe à 1% à base des huiles essentielles (Tableau 2) selon les étapes suivantes :

- Dans un cristallisateur faire liquéfier la quantité de vaseline sur le bain marie et incorporer successivement le benzoate de Sodium jusqu'à la solubilisation.
- Mettre le mélange initial dans un mortier, une fois qu'il commence à refroidir, ajouter l'huile essentielle, glycérine et l'huile de vaseline en triturant jusqu'à l'obtention d'une consistance onctueuse et fine au toucher (Figure 28).
- Les préparations sont conservées dans des récipients hermétique dans un endroit froid et sec jusqu'au moment d'utilisation.

Tableau 02: Composition de la formulation galénique

Composant	Rôle	Quantité (g)
Huile essentielle	Principe actif	1
Benzoate de sodium	Conservateur	1
Huile de vaseline	Excipient	7.5
Huile de paraffine	Excipient	7.5
Glycérine	Agent hydratant	10
Vaseline	Excipient	73

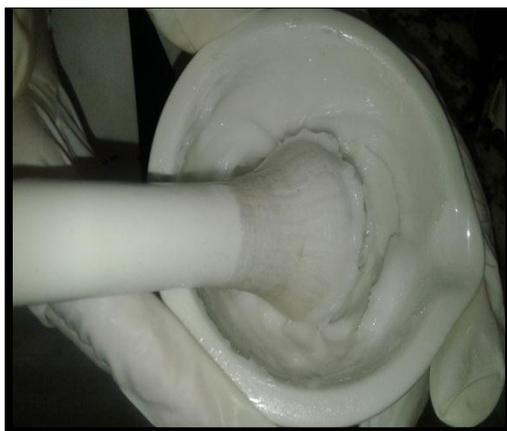


Figure 29 : Formulation de la pommade hydrophobe 1%

3.5.2. Vérification de la qualité de la pommade

3.5.2.1. Caractères organoleptiques

Le test des caractères sensoriels est une approche de la qualité qui sera réalisé à la fin de la formulation. C'est le premier test d'acceptabilité de l'utilisateur qui permet de détecter toute anomalie. Les caractéristiques organoleptiques de la pommade sont évaluées par l'observation de la couleur, l'aspect et l'odeur (Sanogo et al., 2006).

3.5.2.2. Homogénéité

L'homogénéité des pommades est vérifiée par étalement de 0,2 g environ de pommade sur une surface colorée ; aucun agrégat blanc n'est visible à l'œil nu (Pharmacopée européenne, 2014)

3.5.2.3. Mesure du pH

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'un pH mètre, elle peut se faire directement si la préparation est assez fluide, ou après dilution à 10% dans de l'eau distillée (Monique et Claude, 1996). L'électrode l'appareille est ensuite plongée dans une dilution au dixième de pommade dans de l'eau distillée bouillie, trois mesures sont effectuées.

3.5.2.4. Qualité microbiologique

Le contrôle de la qualité microbiologique des pommades formulées est une étape fondamentale pour éviter toute altération, en effet, la présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut réduire l'effet thérapeutique du produit (Attou, 2021). Ce test est effectué selon les techniques décrit par la pharmacopée européenne (2014) pour le

contrôle microbiologique des formes pharmaceutique non stériles, il consiste à dénombrer la flore mésophile aérobie totale (FTAM), levures et moisissures ainsi que la recherche de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Préparation de la suspension mère et des dilutions

La suspension mère a été préparée en pesant 10 g d'échantillon de façon aseptique auquel 0.5 g de Tween 80 stérile ont été ajoutés. Ensuite, un volume de 90 ml de solution tampon peptonée au chlorure de sodium stérile (TSE) (pH 7,0) a été additionné. L'ensemble est chauffé dans un bain-marie réglé à 40°C, et mélangé soigneusement au vortex pendant 2 minutes pour avoir une solution homogène (SM) constitue la dilution 10^{-1} . A partir de cette suspension mère, une série de dilutions décimales est réalisée en ajoutant 1 ml de la solution mère à 9ml de diluant (eau peptonée stérile), on obtient ainsi la dilution 10^{-2} . On procède ainsi de suite jusqu'à l'obtention de toutes les dilutions désirées (Boukhennoufa, 2020).

On utilise pour dénombrer les bactéries le milieu gélose glucosée à l'extrait de levure (PCA) (Gélose Plate Count Agar) placé à 30-35°C pendant 5 jours, et pour dénombrer les levures et moisissures le milieu de Sabouraud placé à 20-25°C pendant 10 jours. Un millilitre de l'échantillon dilué est mélangé à 15 ml de milieu gélosé liquéfié dont la température n'excède pas 45°C.

❖ Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

La FTAM a été dénombrée sur gélose PCA (annexe). 1 ml de chacune des dilutions ainsi que la suspension mère a été versé de façon aseptique dans les boîtes de pétri stériles, ensuite 20ml à 25ml de la gélose PCA liquéfié dont la température n'excède pas 45°C ont été coulés. L'ensemble a été homogénéisé avec des mouvements rotatifs de sorte à incorporer l'inoculum à la gélose et laisser à solidifier à température ambiante. Les boîtes sont incubées à 30-35 °C pendant 5 jours. Le dénombrement des germes a été fait selon la norme NF EN ISO 7954 (1988).

❖ Dénombrement des levures et moisissures

Les levures et les moisissures ont été dénombrées sur gélose de Sabouraud de au Chloramphénicol. 1mL de chaque dilution a étéensemencé sur la surface du milieu gélosé, L'incubation a été faite à 25° pendant 5 jours. Les colonies des levures sont d'aspect laiteux

alors que celles des moisissures sont filamenteuses. Le dénombrement des germes en UFC/ml d'échantillons analysés a été fait selon la norme NF EN ISO 7954 (1988).

❖ Recherche des *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*

Le pré-enrichissement est nécessaire pour la recherche des germes pathogène. 1g de pommade a été ensemencé dans 100ml du milieu Bouillon Tryptone Soja (TSB), et incubées à 33°C pendant 24h. Un volume de 0.1 ml a été repiqué sur le milieu gélosé sélectif « Chapman » pour la recherche des staphylocoques et sur milieu gélosé de « Cétrimide » pour les *Pseudomonas*. Les boîtes sont incubées à 33°C pendant 72h. La croissance de colonies jaunes-blanches entourées d'une auréole jaune indique la présence de *S. aureus*, tandis que l'apparition des colonies verdâtre fluorescente indique la présence de *P. aeruginosa* (Pharmacopée. Européenne, 2014)

3.5.3. Test d'Irritation cutanée primaire

Le test de tolérance cutanée est un test de toxicité cutanée aigue pour contrôler le degré d'irritation cutanée régénéré après application dermique des produits chimiques industriels, pharmaceutiques ou naturel.

Principe

L'indice d'irritation cutanée des pommades a été étudié selon le test de l'irritabilité primaire aiguë de Draize selon la technique publié au Journal officiel de la République française (JORF) du 21 février 1982. La méthode est basée sur l'appréciation du pouvoir irritant éventuel des formulations galéniques sur la peau après une application unique.

Mode opératoire

L'essai est pratiqué sur six rats albinos male de poids corporel compris entre 300-350 g. Vingt-quatre heures avant l'essai, une surface d'environ de 3cm² des flancs de la région dorsale des animaux a été rasés. A l'aide d'une aiguille de seringue stérile et avec précaution, trois légère scarifications parallèles d'environ 2.5 cm de long et espacées de 0,5 cm ont été pratiquées d'un côté tendue de l'axe vertébral, sans atteindre le derme (sans saignement), tandis que l'autre flanc restant intact (flanc témoin). 0,5 g de pommade ainsi que les excipients ont été appliqués directement sur la peau des animaux sur les deux flancs intacte et

scarifiée à l'aide d'une spatule. Les sites d'applications ont été ensuite recouverts de compresses stériles puis tenues par des morceaux de sparadrap.

Les réactions d'irritations doivent être évaluées après 24 et 72 heures de l'application des pommades. La formation d'œdème et d'érythème sur la peau intacte et la peau scarifiée est notée selon le système de score de Draize (1959) (tableau 3). Les résultats ont été donnés par la valeur de l'indice de l'irritabilité primaire (**IP**) ; c'est la somme de la valeur moyenne d'érythème et celle d'œdème avec IP maximal égal à 8, en appliquant la formule suivante :

$$IP = (\text{œdème} + \text{érythème})_{\text{flanc scarifié}} + (\text{œdème} + \text{érythème})_{\text{flanc témoin}} / 24$$

$24 = 6(\text{nombre des rats}) \times 2(\text{nombre des flancs testés (scarifié et non scarifié)}) \times 2$ (nombre de type d'irritation : érythème et œdème).

Tableau 03: Système de scores de Draize (1959)

Erythème		Œdème	
Pas d'érythème	0	Pas d'œdème	0
Léger érythème (à peine visible)	1	Très léger œdème (à peine visible)	1
Erythème bien visible	2	Léger œdème (contours bien définis, gonflement apparent)	2
Erythème modéré à important	3	œdème moyen (épaisseur environ 1 mm)	3
Erythème grave (rouge pourpre) avec formation de légères escarres (lésions profondes)	4	œdème grave (épaisseur supérieure à 1 mm et surface supérieure à celle de la zone d'application)	4

Expression des résultats

D'après la législation française, les substances testées sont classées en quatre catégories (BENE, 2017):

Non irritante pour un indice inférieur à 0.5.

Légèrement irritante pour un indice compris entre 0.5 et 2.

Moyennement irritante pour un indice compris entre 2 et 5.

Sévèrement irritante pour un indice compris entre 5 et 8.

3.8. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire des formulations galéniques préparées à partir des huiles essentielles des plantes, un modèle expérimental d'inflammation chronique ; arthrite rhumatoïde a été sélectionné. L'arthrite est une maladie inflammatoire qui peut être affecté de nombreuses articulations.

Principe

Le principe de cette méthode est basé sur le pouvoir anti-inflammatoire des plantes médicinales sur l'arthrite rhumatoïde induite chez le rat Wistar par injection intra-plantaire d'un produit chimique; le formol (Brownlee, 1950). Le formaldéhyde stimule la libération de plusieurs médiateurs chimiques tels que l'histamine, la sérotonine et la biosynthèse des prostaglandines qui sont responsables à la formation d'œdème et la sensation de la douleur et donc qui sont à l'origine du processus inflammatoire.

3.8.1. Répartition des groupes

Le pouvoir anti-inflammatoire des huiles essentielles a été évalué selon la méthode décrit par Vinita et al. (2015) en utilisant des rats adultes male de souche Wistar du poids de 200-250g. Les animaux ont été repartit en sept groupes dans chacun 06 rat :

Groupe 1 : Groupe non arthritique; contrôle négatif

Groupe 2 : Groupe arthritique non traité ; contrôle positif

Groupe 3 : Groupe arthritique traité par la formulation sans principe actif (placébo)

Groupe 4 : Groupe arthritique traité par la formulation FHJ 1%

Groupe 5 : Groupe arthritique traité par la formulation FHM 1%

Groupe 6 : Groupe arthritique traité par la formulation FHS1%

Groupe 7 : Groupe arthritique traité par diclofénac diéthylamine (Emulgel de 1%) (Groupe standard).

3.8.2. Induction et traitement de l'inflammation

L'induction de l'arthrite a été effectuée par injection intra-plantaire de 0,1 ml de solution de formaldéhyde à 2.5% (v / v) préparé dans du NaCl 0,9% dans la patte arrière droite des animaux le 1er et le 3ème jour (Vinita et al., 2015) (figure 30). Les médicaments ont été administrés par voie cutanée à titre curatif, le troisième jour ou le jour où l'arthrite a été établie. 0.3 gramme de chaque formulation, placebo ou traitement de référence ont été appliqués sur la cheville des animaux une fois par jours pendant 18 jours. L'œdème de la patte de rats traités a été mesuré avant l'injection de formaldéhyde et quotidiennement après l'établissement de l'arthrite.



Figure 30 : Induction d'œdème.

3.8.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Evolution de l'œdème

Les modifications quotidiennes de l'œdème inflammatoire ont été surveillées en mesurant la section transversale linéaire immédiatement au-dessous de l'articulation de la cheville avec un pied à coulisse numérique (figure 31).



Figure 31 : Mesure de diamètre d'œdème

Le pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème est calculé selon formule suivante: $\%AUG = (D_t - D_0) / D_0 \times 100$

D_t : diamètre de la patte au temps t

D_0 : diamètre initial de la patte (avant l'injection de formol)

Le pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition pour chaque lot traité avec les pommades 1% ou avec le médicament de référence a été calculé par rapport au lot contrôle négatif selon la formule suivante :

$$\%INH = 100 \times (\%AUG_{\text{contrôle positif}} - \%AUG_{\text{traité}}) / \%AUG_{\text{contrôle positif}}$$

Evolution du poids corporel et de la température rectale

La prise de poids corporel et température rectal des rats est mesuré avant l'expérimentation et pendant la période du traitement en respectant les conditions d'hygiènes.

3.8.4. Sacrifice des animaux et prise de poids des organes

A la fin du traitement, les rats ont été mis à jeun pendant 24 heures, puis anesthésiés par injection abdominale de 3ml chloral (10%) par kg de poid corporel. Les rats ont été sacrifiés et les organes (Cœur, Poumons, Foie, Rate, Reins, Thymus) ont été prélevés et pesés(g).

3.8.5. Analyse des marqueurs biologiques

Le sang a été prélevé de l'aorte abdominale à l'aide d'une seringue stérile. Le sang prélevé est récupéré dans trois types de tubes : tubes avec anticoagulant EDTA pour déterminer le NFS (Numération Formule Sanguine), tube citaté pour doser la protéine C-réactive (CRP) et des tubes héparines pour doser la vitesse de sédimentation (VS).

a/ La numération de la formule sanguine (hémogramme)

La numération de la formule sanguine (NFS) est nécessaire pour diagnostiquer une inflammation, une infection, une anémie ou une affection de la moelle osseuse. Hémogramme est une analyse quantitative et qualitative des éléments figurés du sang globules rouges (érythrocytes), globules blancs (leucocytes) et plaquettes (thrombocytes). La numération a été effectuée en utilisant un analyseur d'hématologie différentielle en 3 parties de type Mindray BC-30s.

b/ Protéine C-réactive (CRP)

La Protéine C-réactive (CRP) est une glycoprotéine appartenant à la famille des pentraxines. La CRP est synthétisée principalement par le foie en réponse à certaines cytokines pro-inflammatoires. Elle joue un rôle important dans l'immunité innée, par ses propriétés d'activation et de liaison aux récepteurs des immunoglobulines. Elle s'élève très rapidement et est, de ce fait, un marqueur précoce de la réaction inflammatoire. Le dosage de la CRP est réalisé par immunoturbidimétrie sur l'automate d'hématologie (Lusina et al., 2002).

La méthode est basée sur la mesure photométrique du trouble amené par la réaction antigène-anticorps à 340 nm.

c/ Vitesse de sédimentation

C'est un examen de laboratoire qui consiste à laisser sédimenter les hématies dans un tube vertical. On mesure la distance parcourue pendant 1 heure (parfois également 2 heures). La méthode de référence est la méthode de Westergreen (Hay-Lombardie, 2020).

3.8.6. Analyse radiologique

L'examen radiographique est le seul examen complémentaire indispensable pour visualiser l'état des os et des articulations et de rechercher des signes de dommages et de changements arthrosiques au niveau de l'os (infections, fracture, tumeur) ou au niveau articulaire ; arthrose, accumulation de liquide dans une articulation (épanchement) et la luxation.

Principe

La technique d'imagerie médicale est basée sur utilisation des rayons X. L'interaction entre les rayons X et les parties de l'animal entraîne une diminution d'intensité que subit alors le faisceau incident. On parle d'atténuation du faisceau incident. Les rayons transmis, portants avec eux l'image de la partie traversée, donneront naissance à une image de rayonnement. L'image de rayonnement sera réceptionnée par une cassette standard et imprimée sur un film radiographique. L'image sera composée de blanc pour les os, de noir pour l'air et divers tons de gris pour les différents tissus mous

Mode opératoire

Après la dissection, les pattes postérieures droites des rats traités et témoins ont été séparées, ensuite le tissu musculaire est soigneusement retiré pour éviter d'endommager l'os. L'os a été conservé dans du formol 10%. L'analyse radiologique a été réalisée au niveau du service radiographie au sein de l'hôpital de Tighennif, à l'aide d'appareils à rayons X (AGEA2400) et une cassette (AGFACPB 400) à rayons X industriels, avec une exposition de 150mA, une durée de 0.2 sec et une intensité de 51 Kv. Les clichés ont été développés par un révélateur, puis imprimés.

Les clichés radiographiques favorisent la classification de l'atteinte arthrosique en différents stades pour mesurer la progression de la pathologie dans le temps : ostéophytes

(excroissances osseuses anormales autour de l'articulation), ou pincement de l'interligne articulaire (la diminution de l'espace entre les deux extrémités osseuses, du fait de l'amincissement du cartilage), Ostéocondensation ou Géodes sous-chondrales.

4. Analyse statistique

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Le programme utilisé pour les analyses statistiques est R (R Core Team, 2023). Le traitement des données est réalisé par l'application de l'ANOVA ou $P \leq 0.05$ est considéré comme significatif.

Résultats et discussion

1. Extraction et caractérisation des composés phénoliques

1.1. Rendements d'extraction

Les extraits aqueux et hydrométhanolique bruts ont été préparés à partir des parties aériennes (feuilles et tiges) des plantes suite à une infusion dans l'eau et macération organique dans le méthanol respectivement. Les rendements d'extraction ainsi que leurs caractéristiques sont donnés dans le tableau 5.

Tableau 04 : Rendements et caractéristiques organoleptiques des extraits bruts

Extrait brut	Rendement (%)	Caractéristiques		
		Aspect	Couleur	Odeur
AM	13.55 ± 0,06	Collant	Vert	Légère, caractéristique de myrte
MM	19.26 ± 0.72	Sec (poudre)	Vert foncé	Légère, caractéristique de myrte
AJ	9.6 ± 2.04	Collant	Marron foncé	Légère, caractéristique de juniperus
MJ	14.21 ± 0.33	Sec (poudre)	Jaune foncé	Légère
AS	17.32% ± 0.07	Très collant	Marron très foncé	Légère douce
MS	15.37% ± 0.01	Très collant	Marron très foncé	Légère , douce

Le rendement des extraits hydrométhanolique de *J.oxycedrus* et de *M.communis* sont plus élevés que les extraits aqueux. En revanche, l'extrait hydro-alcoolique de *S.olusatrum* a donné un pourcentage légèrement inférieur par rapport à l'extrait aqueux.

Nos résultats est en concordance avec les résultats de l'étude de Chaouche et al. (2015) sur les racines de *J.oxycedrus ssp oxycedrus* qui ont montré que le rendement en extraits hydrométhanolique a donné une valeur supérieur à celui de l'extrait aqueux.

Selon les travaux réalisés par Touaibia et al (2012) sur l'espèce *Myrtus Communis L.* de la région de Zaccar, les extraits méthanoliques (Me OH) issus de la plante obtenue in situ, présentent une couleur marron très foncé, un aspect légèrement gras avec un rendement de 41,30%. Ce dernier est trouvé supérieur à celui mentionné dans les travaux de Bouchenak et al. (2020) avec un rendement d'extraction égal à 30,6%.

Le rendement en extraits hydroalcoolique de *S. olusatrum* (15.37 %) est supérieur à celui enregistrés dans les travaux réalisés par Mohammedi et Atik (2011) sur les extraits méthanoliques de la même espèce récolté en Algérie avec un pourcentage égal à 1.08%. Alors que Minareci et al. (2012) ont noté un rendement important en extraits méthanoliques (14,4%) mais il reste inférieur par rapport à la valeur obtenue.

Il faut noter que, le rendement d'extraction varie d'une espèce de plante à une autre, et d'une partie à l'autre et en fonction des conditions climatiques et la saison de récolte de la plante, de la méthode d'extraction effectuée (à chaud ou à froid), et le solvant utilisé (Lee et al., 2003). Selon Do et al. (2014), les produits chimiques sont plus solubles dans un mélange d'eau et de solvants organiques (méthanol, éthanol et acétone) que dans l'eau.

1.2. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique est l'ensemble des tests préliminaires qui permet la mise en évidence des métabolites secondaires, il est basé sur l'utilisation des réactifs chimiques appropriée, le changement de couleur ou l'apparition des précipités indique le résultat positif. Les résultats d'analyses sont mentionnés dans le tableau 6.

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits de *M.communis L.*, *J. oxycedrus* et *S.olusatrum L.* ont démontré une diversité moléculaire sur le plan des métabolites secondaires. Les tanins sont plus abandon dans tous les extraits des plantes. En revanche, les extraits de *M.communis* et *J. oxycedrus* indiquent une forte richesse en phénols et flavonoïdes. Les saponines, stéroïls et terpènes sont faiblement présents dans les extraits de *S.olsatrum L.*

Tableau 05 : Criblage phytochimique des extraits végétaux

Métabolites secondaires	AM	MM	AJ	MJ	AS	MS
phénols	+++	+++	+++	+++	+	++
Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++	++	+++
Tannins	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Saponines	+++	+++	++	+++	+	+
Stérols et terpènes	+++	+++	++	++	+	+

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Ainsi:

(+) : Test faiblement positif (si le réactif présente une légère opacité).

(++) : Test positif (si produit réactif et pas de turbidité floculation).

(+++): Test fortement positif (si le réactif produit un précipité ou une floculation importante).

Des travaux antérieurs sur les tests phytochimiques de *M. communis L.* ont rapporté une abondance de polyphylols, de flavonoïdes, de tanins et de saponosides, ce qui est conforme avec que nous avons obtenus (Hayder et al., 2004, Bouchenak et al., 2020). Bouchenak et al. (2020) a signalé l'absence totale des tanins dans les feuilles de *Myrtus communis L.*

Les résultats obtenus pour les extraits de *J.oxycedrus* sont en accord avec ceux rapportés par Živić et al. (2019) qu'il a mentionné que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les coumarines, les stéroïdes et les terpènes étaient présents dans les extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle des baies de la même espèce.

En revanche, il n'existe pas des données bibliographiques sur l'évaluation phytochimique des extraits de *S.olusatrum L.*

La variation de la composition en substances phénoliques peut être expliquée par l'origine de la plante, la méthode d'extraction et la polarité des solvants utilisés dans l'extraction (Lee et al., 2003). Selon Do et al. (2014),.

1.3. Dosage des composés phénoliques

La quantification des polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux dans les différents extraits des plantes a été analysés par des méthodes colorimétriques en utilisant le spectrophotomètre UV-visible. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 7.

Tableau 6: Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins totaux

Composés Phénoliques	EAM	EMM	EAJ	EMJ	EAS	EMS
Polyphénols totaux (mg EAG/g)^a	184.1 ± 3.27	201.61 ± 9.4	148.8 ± 2.9	167.77 ± 5.12	52.17 ± 1.71	59.82 ± 3.84
Flavonoïdes totaux (mg EQ/g)^b	220.18 ± 2.97	242.25 ± 0.74	74.06 ± 3.71	90.56 ± 2.23	52.55 ± 1.86	106.15 ± 5.2
Tanins totaux (mg EC/g)^c	26.36 ± 3.24	42.45 ± 0.24	86.51 ± 0.63	110.21 ± 2.38	15.98 ± 0.4	9.26 ± 2.93

a: mg équivalent à l'acide gallique/ g par gramme d'extrait sec **b:** mg équivalent à la quercétine /g par gramme d'extrait sec, **c:** mg équivalent à la catéchine /g par gramme d'extrait sec.

Les résultats représentés dans le tableau 6 montrent que les extraits méthanoliques des trois plantes possèdent des teneurs élevées en composés phénolique par rapport aux extraits aqueux, ce qui peut être expliqué par la grande solubilité des composés phénolique dans un mélange hydroalcoolique que dans l'eau (Do et al., 2014). Le taux en composées phénolique dans les extraits hydrométhanoliques et aqueux préparés à partir de la partie aérienne de *M.communis* L et de *S. olusatrum* L. est dans l'ordre suivant : flavonoides totaux> polyphénols totaux> tanins totaux. Alors que, les constituants phénolique dans les extraits de *J.oxycedrus* sont dans l'ordre : polyphénols > tanins > flavonoides.

L'extrait hydrométhanoliques de *M.communis* a enregistré des taux en polyphénols et flavonoïdes totaux élevés avec une concentration égale à 242.25 ± 0.74 mg EQ/g et $201.61 \pm$

9.4 mg EAG/g d'extrait sec respectivement. En revanche, l'extrait organique de *J.oxycedrus* a dominé les autres extraits dans pour la teneur en tanins totaux (110.21 ± 2.38 mg EC/g).

Les résultats d'études antérieures sur les feuilles de *M.communis* réalisées par Amensour et al. (2009) et Bouchenak et al. (2020) montrent que les teneurs en phénols totaux dans les extraits méthanolique sont très faibles par rapport à la teneur obtenue dans le présent travail. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Wannes et al. (2009), qu'ils ont rapporté que les extraits méthanolique des feuilles de myrte récoltées en Tunisie renferme des teneur en polyphénols (33.67 mg GAE/g), flavonoïdes (3 mg CE/g,) et tanins (26.55 mg GAE/g) totaux inférieur à ceux que nous avons obtenues .

Par contre, l'étude menée par Gardeli et al. (2008) a constaté que la quantité des polyphénols dans les extraits hydrométhanolique de myrte grec est égale à 373 ± 0.5 mg AG /g de plante, cette valeur est plus élevée par rapport aux teneurs que nous avons obtenus. De même, les valeurs des polyphénols et flavonoïdes totaux obtenus sont inférieurs aux résultats enregistrés dans l'extrait éthanolique des feuilles de *M.communis* récoltées en Egypte avec une composition de 472.47 ± 3.73 mg GAE/gE en polyphénols et 281.15 ± 21.88 mg RE/ gE en flavonoïdes (Nassar et al., 2010) .

Concernant *J.oxycedrus*, Ben Mrid et al.(2019) a reporté que la concentration en phénols totaux dans l'extrait méthanolique des feuilles de la même espèce d'origine marocaine ($292,52 \pm 11,68$ mg GAE/g) est élevée par rapport à la concentration obtenue, et leur teneur dans l'extrait aqueux est à l'ordre de $147,29 \pm 6,76$ mg GAE/g, ce qui est presque égal à la valeur que nous avons trouvée. Par contre, ces auteurs ont trouvé des teneurs en flavonoïdes inférieurs aux résultats obtenus avec des concentrations égales à 28.66 ± 0.97 mg QE/g ES pour l'extrait aqueux et 54.58 ± 2.98 mg QE/g ES pour l'extrait méthanolique.

Alors que, les niveaux des composés phénoliques trouvés dans les EMJ et EAJ semblent supérieurs à ceux rapportés par Chaouche et al. (2013) pour les extraits hydrométhanoliques d'aiguilles de la même plante d'origine algérienne (Tlemcen), avec les concentrations en phénols, flavonoïdes et tanins totaux égale à: $133,08 \pm 4,1$ mg AGE/g DW, $61,52 \pm 3,1$ mg CE/g DW et $26,43 \pm 2,6$ CE/g DW respectivement.

Pour *S.olusatrum*, La recherche menées par Messaoud et al, (2013) indique des teneurs en composés phénoliques plus faibles dans les parties aériennes (feuilles, fleurs et

fruits) du tunisien maceron avec des valeurs en polyphénols totaux qui varient entre 31.48 ± 1.73 et 48.97 ± 1.92 mg EAG/ g de plante sec et des valeurs variait de 7.46 ± 0.87 à 52.63 ± 1.09 mg ER/g de matière sec pour les flavonoïdes totaux. D'autre part, le céleri sauvage récolté en Algérie (Tlemcen) a enregistré des teneurs totales en phénols et en flavonoïdes égale à 0.09g en équivalent résorcinol et 20mg équivalent catéchol par 100g de matériel végétal en poudre respectivement (Mohammedi, 2006). Au contraire, une étude antérieure sur l'extrait hydroalcoolique de feuilles de *S. olusatrum* rapportait une teneur phénolique totale (70 mg équivalents d'acide chlorogénique par gramme d'extrait) supérieure à celle observée dans notre étude actuelle (Conforti et al., 2011).

Cette différence pourrait s'expliquer par les conditions environnementales et climatiques, la période de récolte et la partie de la plante qui a été étudiée : partie aérienne ou racinaire (Lee et al., 2003).

1.4. Analyse Chromatographique (HPLC)

La composition chimique des extraits méthanoliques de plantes et les chromatogrammes de l'analyse HPLC sont présentés dans le tableau et les figures ci-dessous (tableau 8 et figure 32, 33, 34). Huit composés phénoliques, dont l'acide gallique, acide chlorogénique, acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique, vanilline, rutine, naringine et la quercétine, ont été identifiés.

À propos des résultats obtenus, les extraits MME et MJE semble riche en composés phénoliques par rapport à l'extrait méthanolique de *S. olusatrum*. Ceci est conforme aux résultats obtenus par les méthodes colorimétriques.

Les flavonoïdes sont les principaux composants de l'extrait méthanolique de *J. oxycedrus ssp oxycedrus* et *M. communis L.* dont la rutine a été détectée comme le composé phénolique le plus abondant dans l'extrait MME et la naringine est le composant flavonoïque majeur dans l'extrait MJE. L'acide chlorogénique est l'acide phénolique le plus abndant dans les deux extraits. Alors que l'extrait MSE a enregistré une quantité plus élevé en acides phénolique par rapport aux flavonoïdes avec une dominance d'acide chlorogénique. En conclure que donc l'acide chlorogénique est le composant majeur dans l'EMJ et l'EMS tandis que la rutine a dominé l'EMM.

Tableau 07: Le contenu phénolique ($\mu\text{g/g ES}$) de *M.commnis L.*, *J.oxycedrus ssp oxycedrus* et *S.olusatrum L.* analysé par HPLC-UV

N°	Composé phénolique ($\mu\text{g/g ES}$)	Rt (min)	MM	MJE	MS
1	Acide gallique	5.29	6265.1	1374.514	1100.4
2	Acide chlorogenic	13.39	11760.42	19872.01	3862.75
3	Acide vanillique	15.53	5426.95	770.77	345.30
4	Acide caféique	16.28	7376.75	2161.58	184.79
5	Vanillin	21.46	ND	1067.96	582.59
6	Acide p-Coumaric	23.82	ND	237.58	232.98
7	Rutin	28.37	35796.44	12078.10	161.85
8	Naringin	34.79	7327.89	13950.33	1405.52
9	Quercétine	45.05	521.71	ND	1535.1

ND : Non détecté

Des études ont déjà été menées pour identifier les composés phénoliques des extraits de *Myrtus communis L.* Romani et al., 1999 ont constaté que les acides phénoliques (acides caféique, ellagique et gallique) et les dérivés de la quercétine (quercétine 3-O-galactoside et quercétine 3-O-rhamnoside) présents en faible quantité dans l'extrait éthanolique de feuilles de *Myrtus communis L.*, tandis que les dérivés de la myricétine (myricétine 3-O-galactoside, myricétine 3-O-rhamnoside) et les dérivés de la catéchine (épigallocatechine, épicatechine et épigallocatechine 3-O-gallate) sont abondants. En outre, Messaoud et al. (2012) ont identifié 11 composés phénoliques dans l'infusé de la partie aérienne de *M.commnis* récolté en Tunisie. Ils ont rapporté que les teneurs en flavonol (myricétine-3-O-galactoside, myricétine-3-O-rhamnoside, myricétine-3-O-arabinoside, quercétine-3-Ogalactoside et quercétine-3-O rhamnoside), et flavonols (myricétine et quercétine) sont supérieures à celles des acides phénoliques (acides gallique, caféique, syringique et férulique), et que myricétine-3-O-galactoside, myricétine et acides gallique sont les principaux composés de ces trois groupes respectivement. L'étude de Wannes et al. (2010) a révélé que les tanins hydrolysables, ou gallotannins, représentaient la majorité de la classe phénolique dans les extraits méthanoliques

de feuilles de *Myrtus communis* (79,39 %, 8,90 mg/g). En revanche, les flavonoïdes constituent le composant majoritaire de l'extrait de tige (61,38 %, 1,86 mg/g), ce qui pourrait être attribué à la forte présence de catéchine. Tous les organes du myrte contenaient des acides phénoliques (acides gallique, caféique, syringique, vanillique et férulique) qui formaient 12,49 % et 38,61 % dans les feuilles et les tiges respectivement, avec une prédominance d'acide gallique (Wannes et al., 2010).

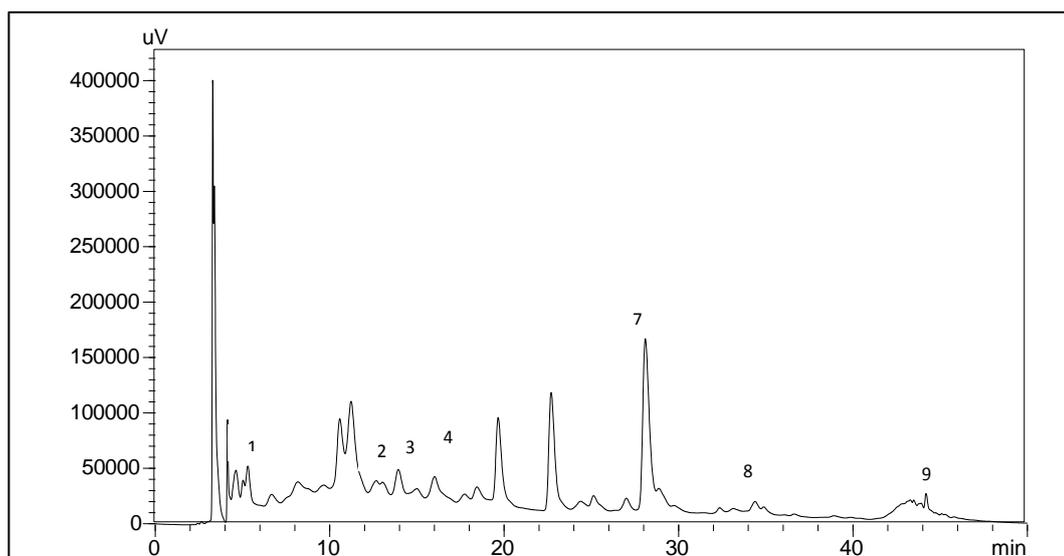


Figure 32 : Chromatogramme d'HPLC d'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Myrtus communis* L.

En ce qui concerne l'identification des polyphénols présents dans les extraits de *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*, Seca et Silva (2006) ont prouvé que les coumarines (ombelliférone) et les flavonoïdes (amentoflavone, cupressuflavone, hinokiflavone, rutine) se trouvent dans diverses parties de *J. oxycedrus*. Selon Yaglioglu et Eser (2017), la catéchine et la rutine sont les métabolites les plus abondants trouvés dans les feuilles de la plante poussant en Turquie. Dans une étude récente, Miceli *et al.* (2020) ont découvert que l'amentoflavone était le composé flavonoïde le plus dominant, et l'acide protocatéchique était le seul acide phénolique observé. Cependant, la quercétine n'a pas été identifiée, ce qui concorde avec les résultats trouvés dans notre présent travail. La composition chimique des aiguilles de la plante récoltées au Maroc a été identifiée par Ben Mrid *et al.* (2019). Ils ont démontré l'abondance d'acides phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide p- coumarique, l'acide hydroxybenzoïque et l'acide salicylique, ce dernier représentant le composé le plus important dans l'extrait aqueux et méthanolique avec un ratio de 3398,1 mg/100 g et 2942,7 mg/100 g

respectivement. Bien que l'acide gallique n'a pas été identifié. Les flavonoïdes tels que la rutine et la naringine ont également été identifiés (Ben Mrid *et al.*, 2019). En revanche L'hexose de quercétine et la quercétine sont détectés dans l'écorce de racine de *J. oxycedrus* d'Algérie (Chaouche *et al.*, 2015).

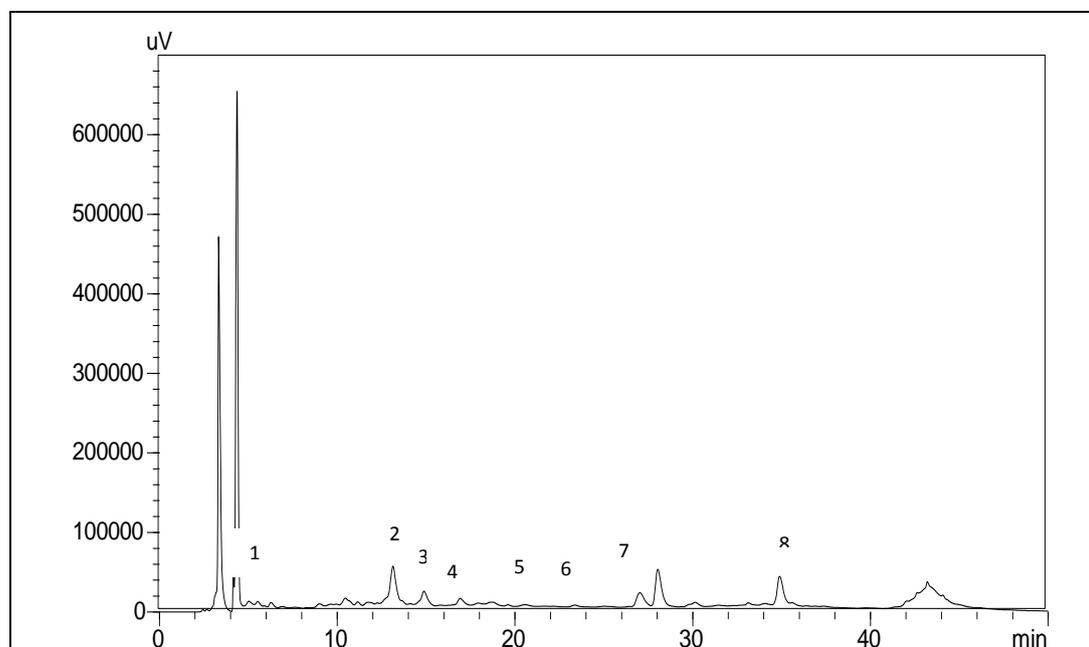


Figure 33: Chromatogramme d'HPLC d'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*.

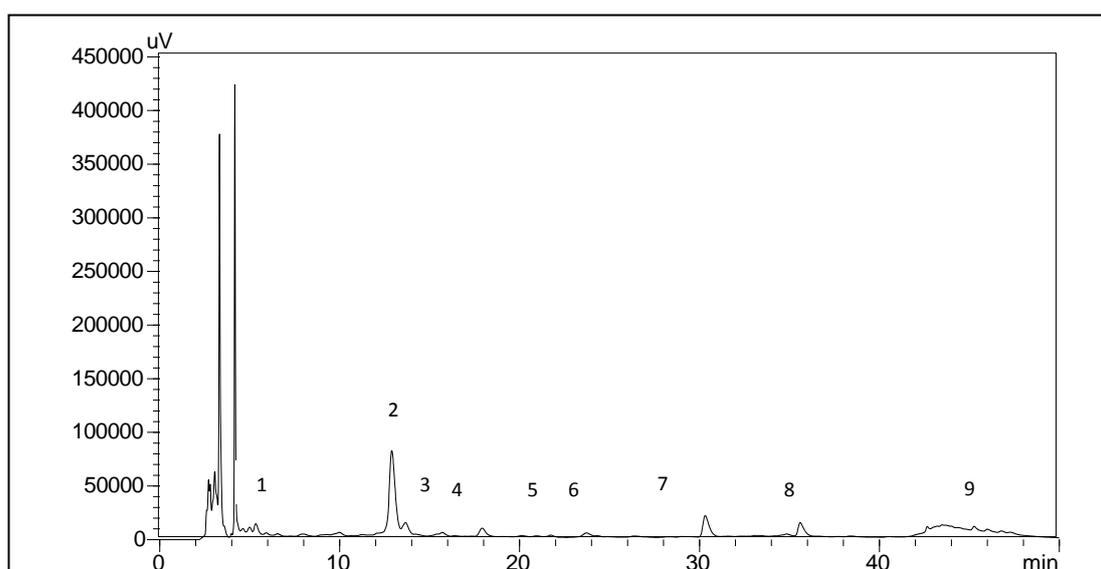


Figure 34 : Chromatogramme d'HPLC d'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Smyrniium olusatrum L.*

Pour les travaux sur l'analyse de la composition phénolique des extraits de *Smyrniium Olsatrum* L., dans une étude de Potter et Jones (2021) le profil chimio-polyphénolique de *Smyrniium* a été déterminé par UPLC-HDMSE. Ils ont découvert que l'isoquercétine était le composé phénolique le plus abondant dans les extraits éthanoliques de *S. olusatrum*, et que le glucoside d'isorhamnétine, l'acide 3-féruoylquinique, l'acide néochlorogénique, l'irisolidone 7-O-glucuronide et le feruloyl C1-glucuronide, le diméthylépigallocatechine 4,4 gallate et la quercétine étaient présents en très grande quantité. Alors que l'isoliquiritigénine, l'acide trans-caféique et l'acide gallique ont été trouvés en faible abondance dans les extraits de plantes. De plus, la (-)-épigallocatechine a été détectée.

D'autre part, les extraits éthanoliques obtenus à partir de racines, feuilles et graines de *S. olusatrum* ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Cette procédure de séparation a identifié quatre composés polaires principaux : le sucre saccharose, l'acide phénolique chlorogénique, l'isoquercétine flavonoïde (quercétine-3-O-glucoside) et l'hormone végétale acide 3-indoleacétique (Maggi et al., 2014). De plus, Mohammedi (2006) a identifié par CCM cinq composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de *S. olusatrum* : les acides phénoliques, les anthocyanidines 3,5-diglycosides, les flavones, les flavonols et les anthocyanidines 3-glycosides.

La différence entre les résultats rapportés précédemment et les résultats actuels peut probablement être influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales telles que la lumière du soleil, la température et les précipitations (Ebrahimzadeh et al., 2008).

2. Huiles essentielles

2.1. Rendements et caractéristiques organoleptiques

Les rendements ainsi que les caractéristiques organoleptiques et physicochimique des huiles essentielles extraites par hydro-distillation de *M.communis* L., *J.oxycedrus* ssp *oxycedrus* et *S.olasatrum* L sont représentés dans le Tableau 9.

Tableau 8: Rendements et caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraits de partie aérienne des plantes.

Extrait brut	Rendement (%)	Caractéristiques organoleptiques			
		Aspect	Couleur	Odeur	
<i>Myrtus communis</i> L.	0.8 ± 0,01	Visqueux	Jaune foncé	Odeur caractéristique de myrte	intense de
<i>Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus</i>	0.48 ± 0.06	Visqueux	jaune foncé	Odeur caractéristique de juniperus	intense de
<i>Smyrniium olusatrum</i> L.	0.82 ± 0.02	Liquide	Jaune pale	Odeur caractéristique de smyrniium	intense de

Le rendement de l'huile essentielle de Myrte est de 0.8% avec une couleur jaune foncé. Cette valeur est égale à la valeur obtenue par Mimica-Dukić et al. (2010) pour les huiles essentielles extraites des feuilles de *M.communis* de Montenegro. Dans l'étude de Gardeli (2008), les rendements obtenus en huiles essentielles de myrte du grec Island étaient compris entre 1.2 et 1.45 pour cent. Contrairement, dans une étude menée dans le nord -est de la Tunisie, les parties aérienne (feuilles, tiges et fleurs) de *M.communis* ont donné des rendements en huiles essentielles varient entre 0.08 et 0.61% (Wannes *et al*, 2010).

En ce qui concerne *J.oxycedrus ssp oxycedrus*, le rendement d'extraction des huiles essentielles est de 0.48%. Dans l'étude menée par Hayta et Bagci (2014), le rendement en feuilles était plus élevé avec une valeur égale à 0,7%. En revanche, de nombreuses études rapportent des valeurs inférieures aux résultats que nous avons trouvés. Semerdjieva et al. (2019) ont trouvé un rendement d'extraction en HE dans les feuilles de genévrier séchées, variait de 0,06 % (Kopaonik, Serbie) à 0,24 % (Markovo, Bulgarie) D'autre part, les feuilles de *J. oxycedrus ssp oxycedrus* collecté dans quatre sites en Tunisie ont enregistré des rendements d'extraction entre 0,28 ± 0,19 et 0,4 ± 0,14 % (Medini et al., 2013). De même,

dans l'étude de Adams et al. (1999), les HE de *J.oxycedrus* ont une couleur jaune claire à foncé avec un rendement compris entre 0.2 et 0.42% (Adams et al., 1999).

Quant au rendement en huiles essentielles de *Smyrniium olusatrum L.*, les résultats obtenus (0,8%) sont inférieurs aux résultats constatés par Daroui-Mokaddem et al. (2010) pour les feuilles et tiges fraîches récoltées à Constantine ; Est de l'Algérie (1,2%). Dans d'autres études antérieures ; La teneur en huile essentielle de *S. olusatrum* obtenue d'Italie variait de 0,1% à 2,0% (Benelli et al., 2017 ; Petrelli et al., 2017 ; Rosato et al., 2018). En revanche, l'hydrodistillation de tiges et de feuilles fraîches de *S. olusatrum* de Grèce a donné des huiles essentielles sub-jaunes, avec un parfum désagréable et un rendement d'extraction égal à 0,07%, 0,39% (p/v) respectivement (Papaioannou et al., 2010).

2.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles par CPG/ SM

L'identification des composés chimique des huiles essentielle extraites de la partie aérienne des plantes par hydrodistillation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectre de masse. Les composants chimiques déterminés dans les huiles essentielles sont indiqués dans les tableaux 10, 11 et 12 les chromatogrammes sont présentés dans l'annexe.

L'analyse chromatographique nous a permis d'identifier quatre-vingt-six composés dans l'huile essentielle de *M.communis*, dont l'Eucalyptol (1,8-Cineole) est identifié comme le composant majeur avec un pourcentage égale à 17.18 %. Les principaux constituants (> 1%) sont : alpha-pinène (1.66%), benzène (1.24%), 2-Pyridinepropanoic acid-Alpha-Methyl-Beta-Oxo, Ethyl Ester (1.15%), oxetane (1.1%), butyric Acid Hydrazide (1.03%). En outre, l'huile essentielle testée contient également des quantités considérables d'acétate de myrtényle (0.85%), linalool (0.77%), limonene (0.81%).

De nombreuses études ont rapporté la composition chimique des huiles essentielles de *M.communis L.* Selon Bouzabata et al.(2014) et Belmimoune (2016) , le α -pinène et le 1,8-cinéole sont identifiés comme les composants majeurs dans l'HE de myrte récolté en Algérie avec la présence de linalol et d'acétate de linalyle du limonène en quantités modérées. Au contraire, l'acétate de myrtényle a été retrouvé dans nos échantillons à une concentration de 0.85%, ce qui n'avait pas été identifié dans ces études.

D'autres études ont trouvé que l'huile extraite de différentes parties (feuilles, fleurs, tige et baies) de myrte de pays méditerranéens avait une composition qualitative similaire mais avec des proportions significatives et distinctes, l' α -Pinène et le 1,8-cinéole étaient les principaux composants, et d'autres composés tels que : le limonène, le linalol, d'acétate de linalyle sont également présents à des teneurs appréciables (Wannes et al., 2010 ; Mimica-Dukić et al., 2010, Franceschini, 2016). Il apparaît que les huiles essentielles extraites de myrte présentent des profils chromatographiques similaires aussi bien d'un point de vue qualitatif, alors que la principale différence était basée sur leur contenu en α -pinène et 1,8-cinéole ou selon la présence ou l'absence d'acétate de myrtényle.

La comparaison entre les huiles essentielles a révélé que le 1,8-Cinéole est présent dans les HE de myrte et de smyrnium. Au contraire, l' α pinène est absent dans les HE de ces dernières alors qu'il a été détecté dans les deux autres échantillons d'HE.

Tableau 9 : Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extraite à partir de la partie aérienne de *Myrtus communis* L.

N°	Composant chimique	Rt (min)	Area (%)
1	Hydrazinecarboxamide	2.09	0.55
2	2-Methoxy-4-(2-Methyl-2-Propanyl)-1-Piperidinecarbaldehyde	2.17	0.32
3	Manganese, Acetylpentacarbonyl-, (OC-6-21)-	2.127	0.77
4	Aminourea	2.194	0.93
5	Pentanal	2.360	0.9
6	Carbohydrazide	2.406	0.46
7	Benzene	2.488	1.24
8	Ethyl 3-Butenoate	2.765	0.38
9	1H-Pyrrole-3-Propanoic Acid, 5-[(4-Ethenyl-1,5-Dihydro-3-Methyl-5-Oxo-2	2.910	0.52
10	7-Hydroxynorlumiflavine	2.958	0.6
11	Lactonitrile	3.030	0.37
12	Nickel Tetracarbonyl	3.151	0.89
13	Butyric Acid Hydrazide	3.216	1.03
14	3-Pentanone	3.315	0.58
15	Alpha-Pinene	3.509	1.66

16	1,4-Methanonaphthalene-6-Carboxylic Acid, 1,2,3,4,5,8-Hexahydro-, Methyl	3.561	0.72
17	Oxalamidrazone	3.633	0.79
18	2-Isobutyl-4,4-Dimethyl-1,3-Dioxane	4.037	0.43
19	2-(1,3-Benzodioxol-5-Yl)-6-Hydroxy-2-Méthyl-2H-Pyran-3(6H)-One	4.081	0.42
20	Glycine-D3	4.146	0.99
21	Methyl D-Glycollate	4.295	0.66
22	1-(3,3-Dimethylbicyclo[2.2.1]Hept-2-Yl)-2-Pentanol	4.250	0.56
23	Methanol	4.326	0.28
24	Cyclic Propylene Carbonate	4.472	0.35
25	4-Dimethylaminobut-2-Yn-1-Ol	4.441	0.98
26	Acetylene-D2	4.524	0.27
27	Acetofluoronitrile	4.668	0.55
28	Ethylene-D4	4.730	0.75
29	Diethyl 3-Oxopentanedioate	4.921	0.88
30	3,7,11,15-Tetramethyl-17-(2,6,6-Trimethyl-1-Cyclohexen-1-Yl)-2,4,6,8,10,12,14	4.980	0.34
31	Carbamic Acid Methyl Ester	5.00	0.31
32	Ethane-D6	5.035	0.47
33	1-Propanol-1-D1	5.054	0.95
34	2-Isononenal	5.095	0.92
35	5alpha,6alpha-Dihydroxy-5,6-Dihydrouracil	5.373	0.46
36	2-Aminoquinoline-3-Carbonitrile	5.396	0.32
37	Isobutyl Isobutyrate	5.451	0.93
38	Oxetane	5.490	1.1
39	Piperonol	5.746	0.49
40	1-(4-Chlorophenyl)-3-(1h-Imidazol-1-Yl)-4,4-Dimethyl-1-Pentanone	5.781	0.5
41	2-Pyridinepropanoic Acid, .Alpha.-Methyl-.Beta.-Oxo-, Ethyl Ester	5.876	1.15
42	1-Propen-1-Ol, 3-[4-(1,1-Dimethylethyl)Phenyl]-2-Methyl-,	6.026	0.65

	Acetate		
43	Glyoxylic Acid (Oxaldehydic Acid)	6.113	0.57
44	Phloracetophenone	6.315	0.5
45	Cyclohexane, 1,1'-[1-(2,2-Dimethylbutyl)-1,3-Propanediyl]Bis-	6.720	0.37
46	Ethyl Carbazate	6.434	0.71
47	N-Methyl-2-Thienyl-Pyrrole	6.505	0.52
48	Ethane	6.607	0.4
49	Manganese, Pentacarbonylmethyl-	6.666	0.79
50	Iso-Butyl-2-Methylbutyrate	7.053	0.45
51	Limonene	7.277	0.81
52	Eucalyptol (1,8-Cineole)	7.369	17.18
53	Linalool (1,6-Octadien-3-Ol, 3,7-Dimethyl-)	10.650	0.77
54	1,2-Hydrazinedicarboxamide	10.925	0.13
55	4-Carvomenthenol	11.074	0.21
56	Bicyclo(10.3.0)Pentadec-1(12)-En-13-One Tosylhydrazone	11.231	0.15
57	Pinocarveol	11.441	0.08
58	Anisole, P-AllylEstragole)	11.546	0.09
59	(-)-(Z)-Verbenol	11.576	0.04
60	Myrtenyl Acetate	11.647	0.85
61	(-)-Beta-Fenchol	11.687	0.46
62	Geraniol Acetate	12.033	0.34
63	Methyl Eugenol	13.529	0.25
64	Durohydroquinone	13.717	0.13
65	Piperazine	14.063	0.7
66	4'-Ethoxy-2'-Hydroxyoctadecanophenone	14.291	0.11
67	Silane, Trimethyl(3-Methylbutoxy)-	14.579	0.12
68	Elemicin	14.621	0.08
69	(-)-Dehydroaromadendrene	14.811	0.14
70	D-Ledol	14.979	0.15
71	Trans-.Beta.-Terpinyl Pentanoate	15.052	0.16
72	L-Aspartic Acid	15.165	0.13

73	Beta-Cedrene	15.257	0.2
74	1,4- Spermidine	15.357	0.22
75	1,1,2-Trimethyl-1-Sila-3-Thiacyclohexane	15.438	0.13
76	2,4,4-Trimethyl-3-(1-Hydroxy-2-Propenyl)-2-Cyclohexenone	15.492	0.15
77	Hydrazinecarbothioamide, N-Ethyl-	15.755	0.15
78	Cyclobutane-1,1,2,2,3,4-D6, 3,4-Di(Ethenyl-D3)-	15.822	0.1
79	5-Aminopentanol	15.883	0.1
80	Methyl 3-Nonenoate	15.962	0.13
81	3,7,11,15-Tetramethylhexadecyl Acetate	16.084	0.31
82	Pristan	16.183	0.14
83	3-Methoxy-1,6-Hexanediol	16.536	0.16
84	1,4-Bis(3-Aminopropyl)Piperazine	16.796	0.1
85	Nopinone	16.342	0.19
86	Hexadecyl Iodide	17.014	0.14

Rt : Temps de rétention

Alors que, l'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *J.oxycedrus* a révélé cent quatre-vingt constituants dont l'alpha-pinène est le majeur composant (2.05%). Cependant d'autres composés principaux ont été trouvés, y compris le acétofluoronitrile (1.55%), 7-hydroxynorlumiflavine (1.48%) et 4-diméthylaminobut-2-yl-1-ol (1.12%), éthylène D4 (1.11%) et 3,7,11,15-Tétraméthyl-17-(2,6,6-Triméthyl-1-Cyclohexen-1-yl) 2,4,6,8,10,12,14 (1.05%). Bêta-Pinene, verbénol, limonène, trans-sabinène, pinocarvone, trans-pinocarvéol, caryophyllène Oxide, alexandrofuran et farnesol isomère (A) sont également détectés. En revanche, le 1,8-Cineole est non détecté.

La teneur élevée en α -pinène dans nos résultats est cohérente avec des résultats similaires dans l'huile essentielle de feuille de *J. oxycedrus var oxycedrus* en Tunisie (Medini et al., 2010), en Italie (Valentini et al., 2003), Turquie (Hayta et Bagci, 2014), au Maroc, Portugal, Espagne et France (Adams et al., 2005), et en Algérie (Boudiba et al., 2021). Un autre travail a montré que le germacrène D (15,9%), l'oxyde de manoyl (10,2%) et le 1-épicubéol (5,4%) étaient les constituants dominants de l'huile essentielle extraite de feuille de

J.oxycedrus ssp oxycedrus (Marongiu et al., 2003). À côté de ces résultats, myrcène a été détecté dans les feuilles de *J.o ssp oxycedrus* de Turquie tandis que verbénol, limonène, pinocarvone, trans-pinocarvéol, linalool , trans-sabinène n'étaient pas identifiés (Hayta et Bagci, 2014), ce qui ne concorde pas avec les résultats cités dans notre travail .

Les résultats des analyses chromatographiques d'algérien *J.oxycedrus* collecté à Djelfa (Dob et al. 2006) ont montré que les principaux composants étaient respectivement le trans-pinocarvéol (7,0%), le cis-verbénol (6,3%) et l'oxyde de manoyl (6,0%). Nos échantillons comprennent α -pinène comme composés majeurs, qui n'ont pas été détectés dans des parties aériennes de *J. oxycedrus* de la région Aures dans lesquels l'oxyde de manoyl (23,5 %), suivi du pentadécane-2-énone 6Z (12,6 %), de l'abiétatriène (8,0 %), de l'abiète 8,11,13-triène -7-one (6,5%), cubebol (4,6%), épi-torilénol (3,8%) et α -cadinol (2,6%) étaient les composants dominants (Fadel et al., 2019).

Tableau 10: Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extrait à partir de la partie aérienne de *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus*.

N°	Composés chimique	Rt (min)	Area (%)
1	4-Diméthylaminobut-2-YN-1-OL	2.081	1.12
2	7-Hydroxynorlumiflavine	2.169	1.48
3	Benzo[G]Pteridine-2,4(3h,10h)-Dione, 10-Ethyl-8-Hydroxy-7-Méthyl-	2.25	0.41
4	1-Propène-1-OL, 3-[4-(1,1-Diméthylethyl)Phényl]-2-Méthyl-, Acétate	2.271	0.56
5	2-Isononène	2.424	0.79
6	Benzène	2.482	0.73
7	1-(4-Chlorophényl)-3-(1h-Imidazole-1-Yl)-4,4-Diméthyl-1-Pentanone	2.514	0.55
8	4-Octène-3-One	2.563	0.55
9	Glycine-D3	2.72	0.78
10	Hydrazinecarboxamide	2.757	0.7
11	1,2-Hydrazinedicarboxamide	2.845	0.46
12	Acétofluoronitrile	2.927	1.55
13	1h-Imidazole-4-Propanoic Acid, Ethyl Ester	3.006	0.62

14	Ethane	3.046	0.92
15	2,5-Furandione	3.137	0.38
16	Methyl Carbamate	3.165	0.38
17	2-(1,3-Benzodioxol-5-Yl)-6-Hydroxy-2-Méthyl-2h-Pyran-3(6h)-One	3.195	0.8
18	1,3-Dioxane	3.294	0.3
19	3-Hydroxy-3-Methylbutanohydrazide	3.351	0.98
20	1-Méthyl-1h-1,2,4-Triazole	3.415	0.3
21	1,2-Diformylhydrazine	3.434	0.6
22	Alpha-Pinene	3.509	2.05
23	Diethyl 3-Oxopentanedioate	3.589	0.74
24	D4-Méthyl Glycollate	3.862	0.72
25	3-Chloro-3-Méthyl-1-Butene	4.05	0.57
26	Nickel Tetracarbonyl	4.226	0.71
27	Ethyl Carbazinate	4.272	0.57
28	Oxalic Acid	4.386	0.28
29	2-Aminoquinoline-3-Carbonitrile	4.424	0.78
30	Methacetone	4.596	0.98
31	2-Isobutyl-4,4-Diméthyl-1,3-Dioxane	4.797	0.69
32	2-Pyridinepropanoic Acid, .Alpha.-Méthyl-.Beta.-Oxo-, Ethyl Ester	4.97	0.55
33	3(2h)-Pyridazinone, 4-Chloro-5-Mercapto-2-Phenyl-	5.056	0.47
34	Formamide	5.115	0.41
35	16-Hexadecanoyl Hydrazide	5.192	0.57
36	Hydroxyacetic Acid, Hydrazide	5.37	0.39
37	3,7,11,15-Tetraméthyl-17-(2,6,6-Triméthyl-1-Cyclohexen-1-Yl)-2,4,6,8,10,12,14	5.413	1.05
38	(-)-Beta-Pinene	5.523	0.58
39	Ethylene-D4	5.803	1.11
40	1-(3,3-Diméthylbicyclo[2.2.1]Hept-2-Yl)-2-Pentanol	5.867	0.72
41	Oxalamidrazone	5.989	0.65
42	Oxetane	6.04	0.58

43	Phloracetophenone	6.086	0.29
44	Carbohydrazide	6.184	0.51
45	Pentacarbonylmethylmanganese	6.224	0.5
46	1,4-Methanonaphthalene-6-Carboxylic Acid, 1,2,3,4,5,8-Hexahydro-, Meth	6.271	0.77
47	Methyl D-Glycollate	6.605	0.3
48	3-Hydroxypropanehydrazide	6.641	0.6
49	1,3,5-Trihydroxycyclohexane	6.744	0.92
50	Glyoxylic Acid (Oxaldehydic Acid)	6.89	0.55
51	Ethane-D6	6.82	0.24
52	Alpha-Ethenyl-2,2-Dimethyl-, Acetate	7.03	0.57
53	Semioxamazide	7.108	0.35
54	4,5-Pentamethylene-1h-Pyrazole	7.275	0.77
55	Hydrazine	7.425	0.19
56	Methyl Vinyl Ether-	7.487	0.3
57	2,3-Dehydropiperidin-6-One	7.614	0.32
58	Eisen, Pentacarbonyl-	7.986	0.15
59	Alpha-Chlorotoluene	8.097	0.24
60	P-Cymene	8.236	0.39
61	Piperonol	8.359	0.41
62	Oxygen	8.489	0.26
63	1h-Pyrrole-3-Propanoic Acid, 5-[(4-Ethenyl-1,5-Dihydro-3-Methyl-5-Oxo-2	8.539	0.3
64	Diethyl Ether-D10	8.702	0.18
65	5-Pyrazolidone	8.93	0.15
66	2-Butoxyethanol	8.974	0.25
67	Nonanal	9.482	0.22
68	Ethyl (E)-2-Acetamido-4-(Cyclohex-1-En-1-Yl)Pent-4-Enoate	9.616	0.19
69	Ethylphosphine	9.666	0.16
70	1,1'-Bicyclohexyl	9.724	0.13
71	A-Campholenal	9.756	0.14

72	Eicosyltrichlorosilane	9.87	0.15
73	6-Methyl-2-(2-Pyrazinyl)Pyridine	10.03	0.17
74	4-Methyl Sydnone	10.14	0.13
75	1,7,7-Trimethyl-Bicyclo[2.2.1]Hept-5-En-2-Ol	10.28	0.33
76	Limonene	10.48	0.25
77	Linalool-	11.07	0.17
78	Decyl Propionate	10.71	0.11
79	Sabinene Hydrate <Trans->	10.79	0.17
80	Pinocarvone	10.88	0.12
81	Bicyclo[2.2.1]Heptan-2-Ol, 1,3,3-Trimethyl-, Acetate, Endo-	10.93	0.1
82	1-Terpinenol	11.23	0.11
83	Trans-Pinocarveol	11.44	0.19
84	Verbenol	11.58	0.29
85	P-Mentha-1,5-Dien-8-Ol	11.87	0.1
86	Caryophyllene Oxide	13.46	0.56
87	Alexandrofuran	13.54	0.62
88	5-Tetradecen-1-Ol, Acetate, (Z)-	13.63	0.15
89	(4-Isopropyl-1-Methyl-6,7-Dimethylenbicyclo[3.2.1]Oct-8-Yl)Methanol	14.07	0.12
90	Cyclohexyl-15-Crown-5	14.195	0.1
91	2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-Octahydro-2-Naphthalenyl)-2-Propen-1-Ol	14.374	0.15
92	5,8,11-Eicosatrienoic Acid, Methyl Ester	14.45	0.12
93	Iron, Tetracarbonyl-2-(Dimethylamino)Ethylphosphine	14.51	0.11
94	Iso-Leucine-D3	14.61	0.13
95	Spathulenol	14.67	0.23
96	Pyridine, 2-Methoxy-	14.72	0.15
97	4,8-Decadienal, 5,9-Dimethyl-	14.79	0.18
98	(R)-4-Methyl-3-(3'-Oxobutyl)Pent-4-Enal	14.89	0.12
99	1-(2,6,6-Trimethyl-2-Cyclohexen-1-Yl)-2-Butyn-1-Ol	14.98	0.27
100	6-Isopropenyl-4,8a-Dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-Octahydro-Naphthalen-2-Ol	15.03	0.2

101	2-(Benzyloxy)Aniline	15.15	0.26
102	Isocrotylhydrazine	15.21	0.11
103	Farnesol Isomer A	15.28	0.26
104	N,N',N''-Methylidynetrisformamide	15.31	0.13
105	1H-Naphtho[2,1-B]Pyran, 3-Ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-Pentamethyl-, [3R-(3. Alpha.,4a. Bet	15.38	0.36
106	2(1H)-Naphthalenone, 3,4,4a,5,6,7-Hexahydro-1,1,4a-Trimethyl-	15.48	0.13
107	1-(.Beta.-D-Ribofuranosyl)-4-Difluoromethyl-5-Bromouracil	15.54	0.1
108	12-Crown-4	15.58	0.21
109	1,4-Dioxane	15.65	0.1
110	1-Formyl-5-Hydroxyhydantoin	15.68	0.14
111	Dimethyl 2,3-Dimethylsuccinate	15.75	0.13
112	Ethyl 2-Isocyanato-4-Methyl Valerate	15.94	0.15
113	Succinchlorimide	16.02	0.11
114	N-Methyl-N-(1-Oxo-Dodecyl)-Glycine	16.09	0.12
115	(-)-Kaur-16-Ene	16.14	0.31
116	Methoxycarbonyl Isothiocyanate	16.27	0.14
117	Piperazine, 2-Methyl-	16.33	0.1
118	Abieta-8,11,13-Triene	16.39	0.31
119	Methyl 6-Methylheptanoate	16.61	0.17
120	Permethylated And Reduced Product Of Degradation Product From H3	16.759	0.15
121	1,3-Butanediol	17.04	0.17
122	N,N-Dimethylhexanamide	17.7	0.11
123	Anthracene, 9-Dodecyltetradecahydro-	18.29	0.11
124	1-(4-Isopropylphenyl)-2-Methylpropyl Acetate	18.85	0.11

En outre, On constate la présence de quatre-vingt-trois composés dans l'huile essentielle de *Smyrniium olusatrum* L. (tableau 11), notons que, 7-Hydroxynorlumiflavine (2.59%) limonène (1.22%), 1,8-Cineole (0.99 %) étaient les dominant.

L'huile essentielle de *S. olusatrum* collectés dans le nord-ouest de l'Algérie est caractérisée principalement par la dominance de furanoérémophilone (31,5 %), le furanodiène + curzérène (19,3 %) et le (E)- β -caryophyllène (11 %) (Merad et al., 2021). Alors que, le sabinène, curzérène (, méthyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane carboxylate, α -pinène, cryptone et β -pinène représentent les constituants majeur dans les échantillons collectés à Constantine dans l'est Algérien (Daroui-Mokaddem et al., 2010).

Les hydrocarbures monoterpéniques y compris Le β -pinène (24,96%), β -phellandrène (21,85%), l' α -pinène (5,43%) et le myrcène (2,67%) constituaient le principal groupe phytochimique présent dans l'huile essentielle obtenue à partir des fruits de *S. olusatrum* récoltés dans la région de Mohammedia (Maroc). Les autres hydrocarbures monoterpéniques ont été retrouvés dans des pourcentages inférieurs à 1 % (Saida et al., 2020). À côté de ces résultats, Tsasi et.al (2016) indiquent que, le furanodiène, le furanoeremophil-1-one et la germacrone sont les principaux constituants de l'huile essentielles des feuilles poussant à l'état sauvage sur l'île de Céphalonie (Grèce). De plus, elle se caractérise par la présence de quantités élevées de β -myrcène (11,7 %) et de β -phellandrène (5,2 %). Il apparaît que le La composition de notre huile est très différente de celle rapporté par Quassinti et al. (2013). L'huiles essentielles des racines, feuilles et grains principalement représenté par les sesquiterpènes de type furanogermacrane (isofuranodiène, furanoeremophil-1-one, 1bacétoxyfuranoeudesm-4(15)-ène), alors que les monoterpènes constituaient la deuxième fraction majeure (myrcène, le d-3-carène et le β -phellandrène, l' α -pinène).

Tableau 11 : Composition chimique de l'huile essentielle (HE) extrait à partir de la partie aérienne de *Smyrniium olusatrum*L.

N°	Composés chimique	Rt (min)	Area %
1	Sydnone	2.132	0.51
2	Aminourea	2.176	0.87
3	Pentanal	2.222	0.66
4	Trans-1,3,5-Trihydroxycyclohexane	2.265	0.52

5	3,7,11,15-Tetramethyl-17-(2,6,6-Trimethyl-1-Cyclohexen-1-Yl)-2,4,6,8,10,12,14	2.410	0.85
6	Benzène	2.484	0.78
7	4-Diméthylaminobut-2-Yn-1-Ol	2.572	0.63
8	Nickel Tetracarbonyl	2.897	0.96
9	Ethyl Carbazate	2.690	0.69
10	Acétofluoronitrile	2.737	0.85
11	2-Isobutyl-4,4-Diméthyl-1,3-Dioxane	2.759	0.7
12	Phloracétophénone	2.840	0.41
13	1-(4-Chlorophényl)-3-(1h-Imidazol-1-Yl)-4,4-Diméthyl-1-Pentanone	3.151	0.82
14	22,3-Diméthyl-6-(4-Méthoxyphényl)Imidazo[2,1-B]Oxazole	3.181	0.27
15	1-(2-Phénethyl)-2-Méthyl-4-(N-Propanilido) Piperidine . Hcl	3.217	0.74
16	2-Aminoquinoline-3-Carbonitrile	3.311	0.4
17	1-(3,3-Diméthylbicyclo[2.2.1]Hept-2-Yl)-2-Pentanol	3.376	0.8
18	Oxalamidrazone	3.489	0.96
19	1H-Imidazole-4-Propanoic Acid, Ethyl Ester	3.577	0.46
20	1,2-Hydrazinedicarboxamide	3.627	0.58
21	Manganese, Pentacarbonylméthyl-	3.698	0.79
22	3,3-Diméthylthietane	3.819	0.63
23	Méthyl D-Glycollate	3.967	0.78
24	Z)-1-(Éthoxycarbonyl-1-Fluoro-2-(Méthoxycarbonyl)-1,3-Butadiene	4.01	0.26
25	3-Hydroxypropanehydrazide	4.08	0.87
26	Ethyl 3-Oxoglutarate	4.252	1.22
27	1-Propen-1-Ol, 3-[4-(1,1-Diméthylethyl)Phényl]-2-Méthyl-, Acetate	4.181	0.63
28	Succinic Acid	4.399	0.26
29	N-Fluoropropane	4.425	0.45
30	2-Pyridinepropanoic Acid, .Alpha.-Méthyl-.Beta.-Oxo-, Ethyl E	4.450	0.6
31	Oxalic Acid	4.569	0.65

32	Hydroxyacetic Acid, Hydrazide	4.668	0.5
33	3-Pentanone	4.725	0.31
34	2-Isononenal	4.785	0.75
35	Benzo[G]Pteridine-2,4(3h,10h)-Dione, 10-Ethyl-8-Hydroxy-7-Methyl-	4.859	0.43
36	Acetic Acid Hydrazide	4.921	0.25
37	1H-Pyrrole-3-Propanoic Acid, 5-[(4-Ethenyl-1,5-Dihydro-3-Methyl-5-Oxo-2	5.049	0.75
38	Ethane	5.121	0.74
39	1-Bromo-2-(2-Ethoxyethoxy)Ethane	5.219	0.67
40	Piperonol	5.360	0.25
41	Glycine-D3	5.395	0.77
42	1,1,4,4,8,8,11,11-Octamethyl-1,2,3,4,8,9,10,11-Octahdropentacene	5.476	0.24
43	Oxétane	5.496	0.24
44	Alpha-Ethenyl-2,2-Dimethyl-, Acetate	5.572	0.24
45	1,4-Methanonaphthalene-6-Carboxylic Acid, 1,2,3,4,5,8-Hexahydro-, Methyl-	5.638	0.54
46	7-Hydroxynorlumiflavine	5.670	2.59
47	2h-3,4-Dihdropyran	5.835	0.27
48	Ethylene-D4	5.961	0.38
49	1,2-Diformylhydrazine	6.106	0.41
50	Vanadium, Pentacarbonyl(.Eta.3-2-Propenyl	6.242	0.25
51	Glycolonitrile	6.278	0.59
52	1,2-Dideuterioethyne	6.353	0.48
53	1,1,2,2-Tetradeuterio-2-Phenylethanamine	6.445	0.62
54	Deuteroethyl N-Deutero-N-Ethylcarbamate	6.508	0.23
55	Cyclohexane, 1,1'-[1-(2,2-Dimethylbutyl)-1,3-Propanediyl]Bis-	6.720	0.5
56	Cyclopropanecarboxylic acid	6.853	0.73
57	Hydrazine, (1,1-Dimethylethyl)-	7.025	0.51
58	Diphenylmaleic Anyhydride	7.099	0.42
59	Methyl Vinyl Ether -	7.239	0.29

60	Iron, Tricarbonyl-(1,5-Dimethyl-2,6 Dimethylenecyclooctane)- .Eta.4	7.270	0.29
61	Eucalyptol (1,8-Cineole)	7.362	0.99
62	N-Butylamine-D9	7.505	0.13
63	Manganese, Acetylpentacarbonyl-, (OC-6-21)-	7.835	0.69
64	Pipérazine	8.09	0.18
65	Beta-Caryophyllene	11.052	0.12
66	Caryophyllene Oxide	13.452	0.28
67	9,15-Octadecadienoic Acid, Methyl Ester, (Z,Z)-	13.630	0.14
68	6-Methoxypiperidin-2-One	13.722	0.1
69	1-(3-Hydroxy-1-Propynyl)Cyclooctanol	13.834	0.17
70	Ethyl (E)-2-Acetamido-4-(Cyclohex-1-En-1-Yl)Pent-4-Enoate	13.944	0.11
71	Trans-1,2-Cyclohexanediol Monoacetate	14.021	0.11
72	Cyclodecanone	14.079	0.12
73	1,3-Dioxolane-4-Methanol, 2-Pentadecyl-, Acetate, Trans-	14.140	0.09
74	1,2-Benzenedicarboxylic Acid, Dicyclohexyl Ester	14.265	0.2
75	4-(Bromomethyl) Cyclohexene	14.446	0.19
76	Cyclohexanemethanol, 4-Ethenyl-.Alpha.,.Alpha.,4-Trimethyl-3- (1-Meth	14.564	0.2
77	1-(2,6,6-Trimethyl-3-Oxo-1-Cyclohexen-1-Yl)Ethyl Acetate	14.677	0.17
78	1,1'-Bicyclohexyl]-2-One, 1'-Hydroxy	14.886	0.17
79	L-aspartic acid	15.032	0.14
80	Tetraethyleneglycol Monomethylether	15.574	0.15
81	Hexyl Butanoate	15.825	0.1
82	D4-Methyl Glycollate	15.871	0.15
83	Trans-Phytol	17.191	0.16

Il est important de souligner que les variations de la composition chimique du point de vue qualitatif et quantitatif par rapport aux travaux antérieurs peuvent être influencées par plusieurs facteurs tels que les parties de plantes utilisées comme matière première, le stade de maturité, le métabolisme adaptatif des plantes, certains facteurs écologiques ou même à des facteurs génétiques (Anwar et al., 2009).

3. Evaluation de l'activité antioxydante

3.1. Piégeage du radical libre DPPH

Le pouvoir antioxydant exercé sur le radical libre DPPH par les extraits et les huiles essentielles des plantes est exprimé par les pourcentages d'inhibitions (INH%) et les valeurs d'IC50.

D'après les résultats illustrés dans la figure 35, le pourcentage d'inhibition de radical DPPH est augmenté de manière dose-dépendante. Les extraits méthanoliques suivis par les huiles essentielles ont exercé une inhibition très importante de radical DPPH par rapports aux extraits aqueux. Cependant, les extraits méthanoliques ont enregistré des taux d'inhibition supérieur à ceux de l'acide ascorbique ($68.36 \pm 2.77 \%$) à la dose de 0.125 mg/ml, avec une meilleure inhibition enregistrée par les extraits méthanoliques de *M. communis* avec un pourcentage égale à $77.42 \pm 3.48 \%$. Cela est probablement lié aux teneurs élevés des extraits méthanoliques de myrte en composés phénolique et en flavonoïdes y compris l'acide gallique et la rutine. Par contre, les pourcentages d'inhibition enregistrés par les huiles essentielles sont proches à ceux de l'acide ascorbique, ce qui suggère que ces extraits biologiques ont un grand potentiel antioxydant.

Les valeurs d'IC50 sont indiqués dans la figure 36, rappelons que la valeur la plus basse correspond à une meilleur activité antioxydante. Les huiles essentielles et les extraits méthanoliques à l'exception EMS ont enregistré des valeurs d'IC50 inférieure à celles enregistré par l'acide ascorbique ($10.34 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$). Concernant les extraits phénoliques, les extraits méthanoliques de *M. communis* présent des propriétés antioxydantes supérieures enregistré par une faible IC50 ($0.042 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$) suivi par l'EMJ. En revanche, les extraits aqueux possèdent un faible pouvoir antiradicalaire avec une grande valeur d'IC50 affiché par EMJ. Cela pourrait être dû à la différence de teneur en phénols et en flavonoïdes entre les extraits. Une forte corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur phénolique totale a été prouvée (El Jemli *et al.*, 2016). De plus, Krishnaveni et al. (2013) ont suggéré que les activités de piégeage des radicaux libres des plantes dépendent de la présence et de la concentration de métabolites secondaires. Les flavonoïdes et les acides phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique peuvent empêchés les dommages oxydatifs soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes soit par chélation des

métaux (le fer et le cuivre) ; ou par l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker et al., 1996). La grande efficacité des extraits méthanoliques de *M.commis* peut être interprétée par ces teneurs en rutine. Yang et al. (2008) ont indiqué que la rutine est un puissant inhibiteur de radicaux libres.

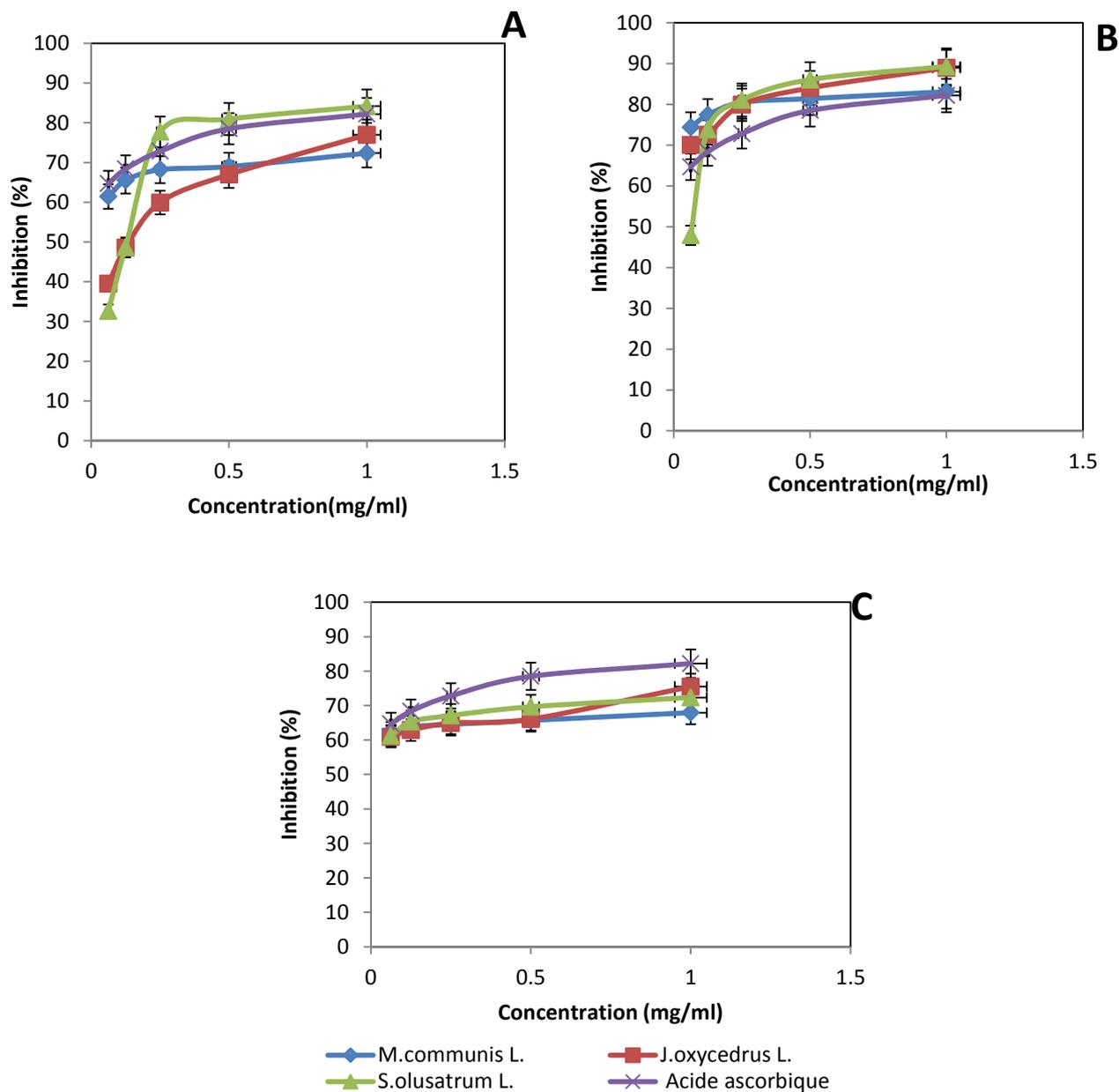


Figure 35 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par les extraits végétaux;(A) : Extraits aqueux, (B) : Extraits méthanolique, (C) : huiles essentielles

En outre, Les huiles essentielles évaluées ont réduit le radical stable DPPH en DPPH-H de couleur jaune, atteignant 50 % de réduction avec IC₅₀ variés entre 0.13 ± 0.0001 et

$8.36 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$ pour HEM et HEJ respectivement, cette différence peut être attribuée à la composition des huiles. Le 1,8-cinéole et le caryophyllène ont été signalé comme puissant piègeurs de radicaux libres (Ruberto et Baratta, 2000).

L'analyse statistique des valeurs d'IC₅₀ montre une différence non significative entre les huiles essentielles des trois espèces plus que l'EMM et EMJ par rapport aux autres extraits.

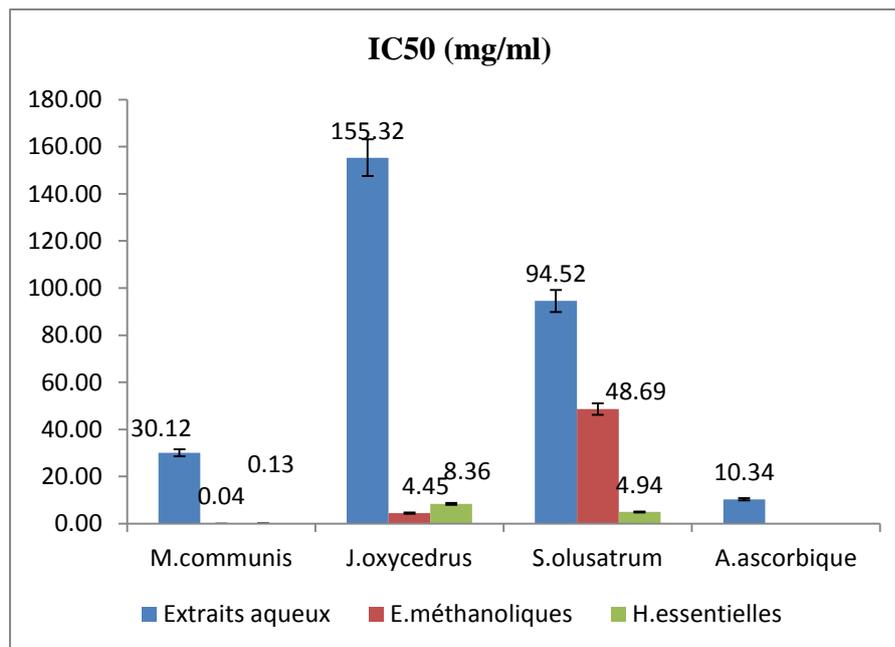


Figure 36 : IC₅₀ des différents extraits et huiles essentielles et de l'acide ascorbique en $\mu\text{g/ml}$. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 3).

Les résultats présentés sont en accord avec plusieurs études sur l'activité antioxydante de *M.communis*. Wannan *et al.*(2010) ont testés l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de différentes parties du myrte (feuille, tige et fleur) par le piégeage des radicaux DPPH, le blanchiment de l'acide b-carotène-linoléique, l'activité chélatante des métaux et les tests de pouvoir réducteur. Dans tous les tests, les extraits méthanoliques ont montré une meilleure activité antioxydante que l'huile essentielle. Au contraire, Hayder et al. (2004) ont étudié l'effet du solvant d'extraction sur l'activité anti-radicalaire des extraits de feuilles de myrte tunisien. Ils ont mentionné que l'extrait aqueux (IC₅₀ = 1,90 mg/ml) présentait une activité antiradicalaire supérieure à l'extrait méthanolique (IC₅₀ = 6,50 lg/ml) et à l'huile essentielle qui avait une IC₅₀ supérieure à 100 lg/ml. Mimica-

Dukić et al. (2010) ont trouvé que les huiles essentielles d'échantillons de plantes prélevés sur la côte du Monténégro ont présenté une activité modérée de piégeage des radicaux DPPH, avec des valeurs IC50 significativement inférieures à celles des antioxydants commerciaux (BHT, BHA et PG).

Pour les capacités antioxydantes de *J.oxycedrus ssp oxycedrus*, les résultats obtenus par Chaouche et al. (2013) pour d'extraits hydrométhanoliques d'aiguilles de genévrier du nord-ouest de l'Algérie (Tlemcen) sont cohérents avec ce que nous avons trouvé. Ils ont révélé une valeur IC50 (10,95 µg/ml) supérieure à celle que nous avons trouvée pour l'EMJ, et inférieure à la valeur authentique du standard (BHT). D'autres parts, les données expérimentales obtenus pour les extraits de *J.oxycdrus* marocain et turc (El Jemliet *al.*, 2016 ; Ben Mridet *al.*, 2019, Miceli et *al.*, 2020) ont démontrées des valeurs CI50 supérieur. En outre, L'huile essentielle de *J. oxycdrus* obtenue au Maroc présente une faible activité antioxydante contre le radical DPPH avec une valeur IC50 ($22,14 \pm 1,16$ µg/ml) inférieure aux standards (BHT, vitamine C et α -tocophérol). C'était également supérieur à ce que nous avons déjà trouvé.

Concernant *S. olusatrum L.*, Messaoud et al. (2013) ont étudié l'activité antioxydante des parties aériennes de la plante récoltées en Tunisie. Ils ont déclaré que les extraits méthanoliques exerçaient un grand pouvoir antioxydant avec des valeurs IC50 comprises entre $0,126 \pm 0,022$ et $0,138 \pm 0,016$ mg/ml par rapport aux huiles essentielles avec une IC50 allant de $40,68 \pm 1,36$ à $48,32 \pm 2,62$ mg/ml.

Les travaux de Quassinti et al. (2013) ont démontré l'activité antioxydante des huiles essentielles obtenues à partir de différentes parties (racines, feuilles basales, fruits verts et fruits mûrs) d'alexandre du centre de l'Italie. Ils ont prouvé le faible effet antiradicalaire (DPPH) des HE avec des valeurs IC50 comprises entre $21 \pm 0,7$ et $39 \pm 1,0$ µg/ml. Une autre étude menée par Minareci et al. a confirmé les résultats précédents avec une IC50 égale à 1,08 mg/ml.

3.2. Activité antioxydante totale (TAC)

Le dosage du phosphomolybdène est une méthode quantitative simple pour évaluer la capacité antioxydante totale. Elle a été déterminée en mesurant l'absorbance du complexe de phosphomolybdène vert à 695 nm, les résultats sont mentionnés dans la figure 38.

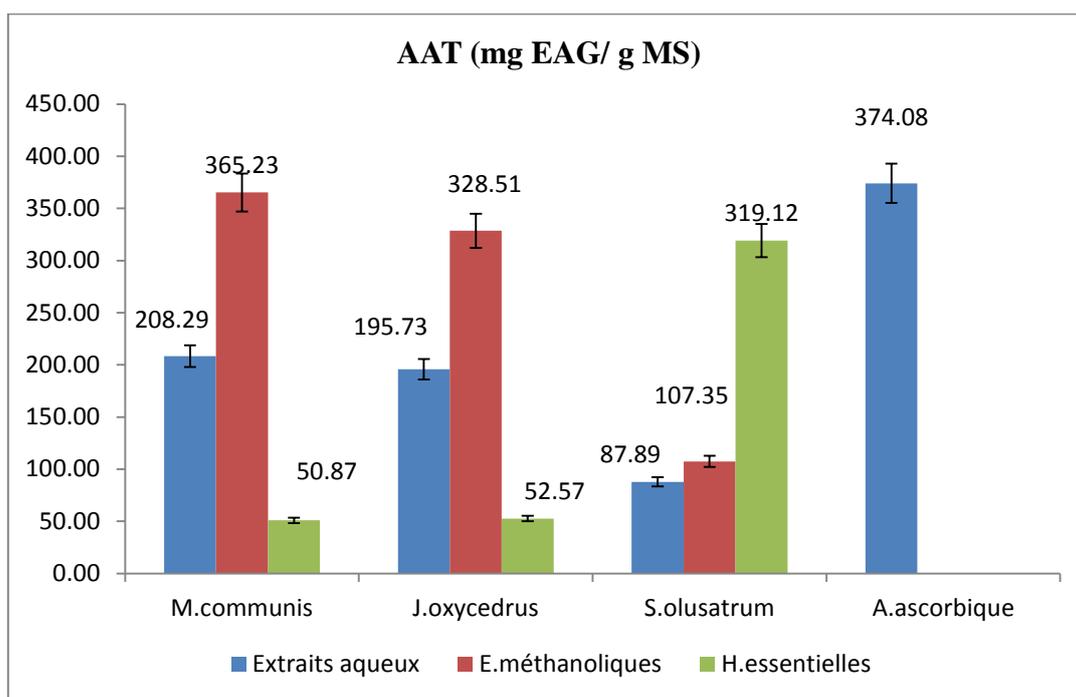


Figure 37: Capacité antioxydante totale des différents extraits et des huiles essentielle en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAG/ g MS). Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 3).

À propos des résultats obtenus, les extraits phénoliques possèdent une puissante activité antioxydante dont les extraits méthanoliques sont plus efficaces par rapport aux extraits aqueux. Les extraits de myrte ont enregistré des valeurs élevées avec une activité antioxydante totale de 365.23 ± 13.06 mg EAG/g DW pour l'extrait méthanolique et 208.29 ± 2.19 mg EAG/g ES pour l'extrait aqueux. Les extraits de *J.oxycedrus* occupe la 2^{ème} position ce qui en concordance avec les résultats obtenus pour le test de DPPH. La différence entre ces résultats peut être attribuée à la polarité du solvant. Selon Do et al. (2014), les produits chimiques sont plus solubles dans un mélange d'eau et de solvants organiques (méthanol, éthanol et acétone) que dans l'eau. Plusieurs composés phénoliques tels que le catéchol, la quercétine, la catéchine, la rutine et l'acide gallique contribuent de manière significative au piégeage des radicaux libres (Kessler et al., 2003 ; De Graft-Johnson et al., 2007). Par contre, l'huile essentielle de smyrnium a enregistré une activité antioxydante totale importante avec une valeur d'AAT de 319.12 ± 4.53 mg EAG/ g MS; supérieure à celui enregistré par les HEM et HEJ.

La capacité antioxydante totale des extraits de *J.oxycedrus* variait de 195,73 mg GAE/g DW à 328,52 mg GAE/g DW pour l'EAJ et l'EMJ respectivement, ce qui était comparativement supérieur à ceux obtenus par Chaouche et al. (2013) pour les extraits hydrométhanoliques (115,32 mg de EAG/ g MS.).

4. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des plantes a été étudiée par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf. Les résultats illustrés dans les figures 38 montre un effet inhibiteur significatif des huiles essentielles et des extraits de plantes, ainsi que du diclofénac sodique (médicament de référence) ($p < 0,001$) sur la dénaturation des protéines induite par la chaleur de manière dose-dépendante, affiché à différentes concentrations.

Les huiles essentielles ont un grand pouvoir inhibiteur contre la dénaturation de l'albumine par rapport aux extraits phénoliques. A la dose de 1mg/ml, Ils ont enregistré des taux d'inhibition variaient entre 95.86% et 312.53%, supérieur à celle de diclofénac sodium (91.51%) avec une meilleur inhibition enregistré par les HE de *J.oxycedrus*. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines exercé par les extraits méthanoliques de *J.oxycedrus* et *M.communis* à la dose de 1 mg/ml est supérieur à celui des aqueux extraits à la même dose qui ont des valeurs similaires. Par contre, le taux d'inhibition de l'inflammation *in vitro* affiché par l'extrait méthanolique de *S.olusatrum* est supérieur par rapport à l'extrait aqueux.

On s'attend donc à ce que la différence en propriétés anti-inflammatoires pourrait être liée à la composition chimique des extraits et des huiles essentielles des plantes. Les composés phytochimiques tels que les alcaloïdes, les saponines, les phytostérols, les tanins et les flavonoïdes présents dans les plantes médicinales réduisent les événements inflammatoires (Oguntibeju, 2018). Par ailleurs, Torres-Rêgo *et al.* (2016) ont révélé que la rutine et l'acide chlorogénique agissent en synergie pour supprimer les processus inflammatoires.

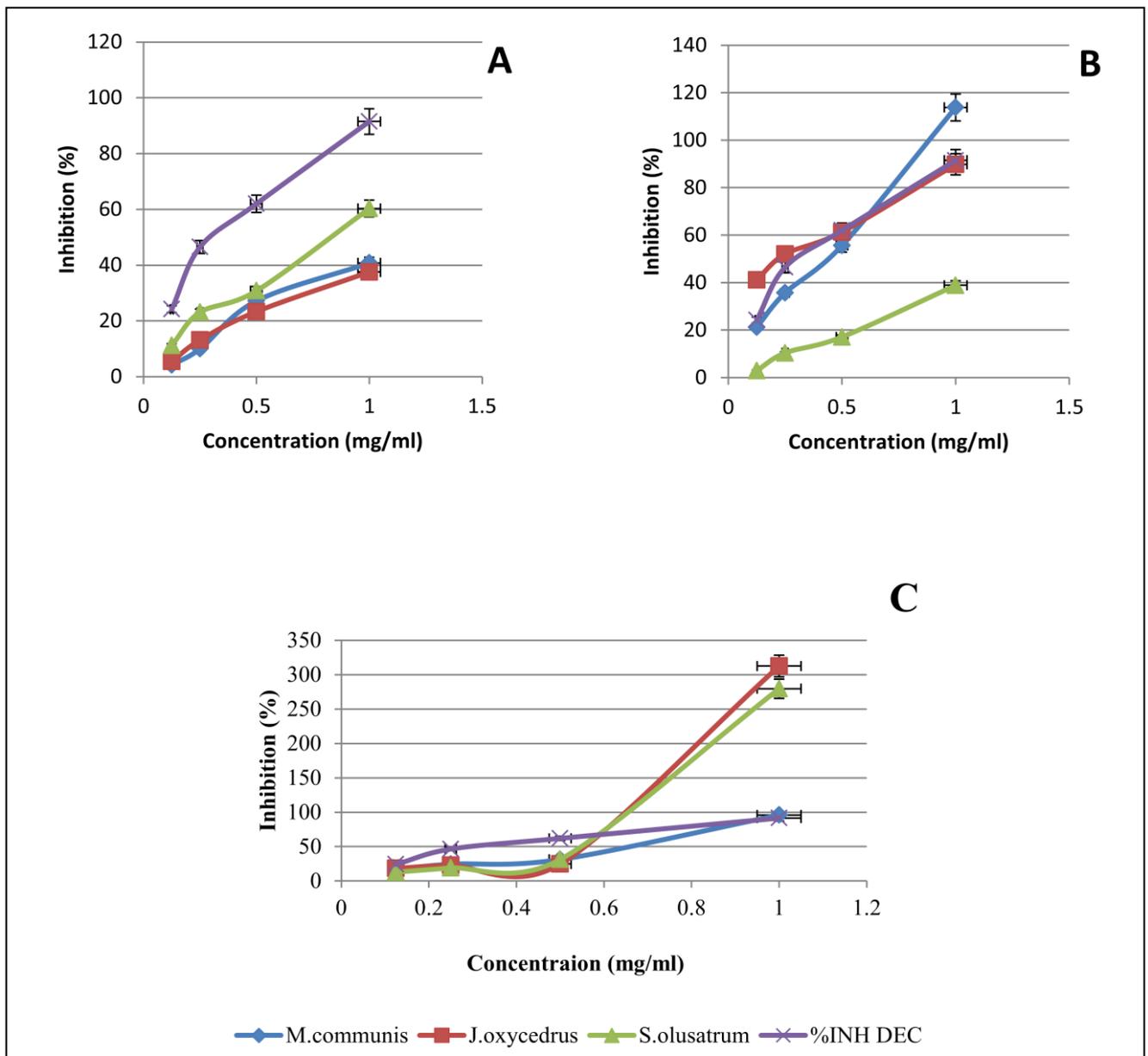


Figure 38: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'albumine d'œuf par les extraits végétaux;(A) : Extraits aqueux,(B) :Extraits méthanolique;(C) : huiles essentielles.

5. Toxicité orale aiguë

Afin d'évaluer l'innocuité d'une substance chimique, l'étude la toxicité aiguë par voie orale a été réalisé sur des rats Wistar male. Elle permet de révéler les connaissances ainsi que les effets secondaires et indésirables qui apparaissent suite à une administration unique par gavage d'une dose bien définie des extraits naturels de nos plantes produit au cours de 24 heures. D'après les résultats de l'étude de pouvoir anti-inflammatoire *in vitro*, les huiles essentielles des plantes sont sélectionnées pour l'étude *in vivo*.

L'administration orale des doses uniques des huiles essentielles de 1000, 2000 et 5000 mg/kg n'affiche aucun symptôme cliniques graves ni de mortalité. L'évolution du poids corporelle pendant la période expérimentale (14 jours) (figure 39) n'enregistre aucune différence significative entre les rats des groupes traités et celle de groupe témoin.

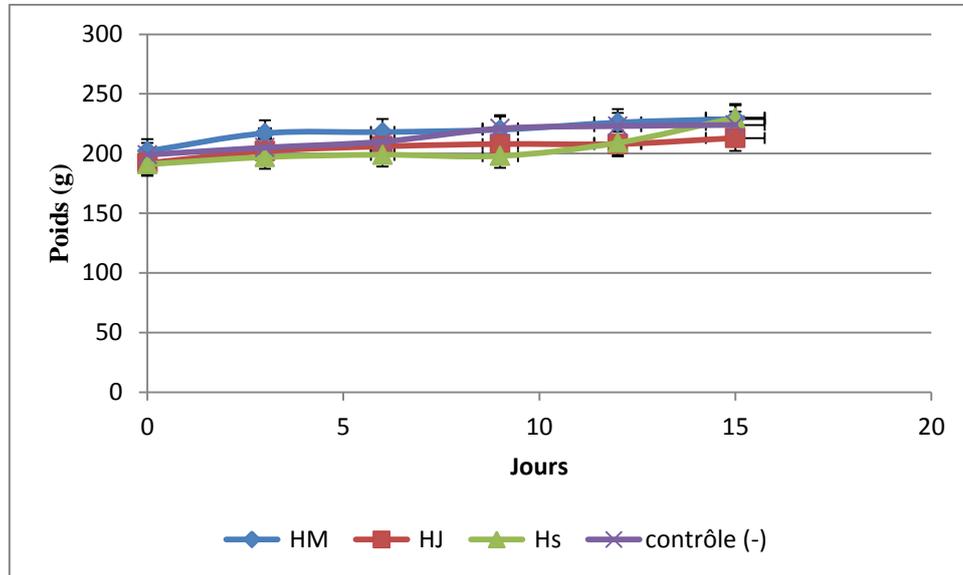


Figure 39 : Evolution du poids corporel des rats témoins et traités par les huiles essentielles de *M.communis L.*, *J.oxycedrus ssp oxycedrus* et *S.olusatrum L.* 5000mg/kg de poids corporelle.

6. Préparation et contrôle de la formulation galénique

Le contrôle des caractéristiques macroscopique et microbiologiques des formulations galénique est nécessaire à réaliser avant leur utilisation.

6.1. Vérification de la qualité des formulations galénique

Les caractéristiques organoleptiques (odeur et couleur), l'homogénéité, le pH et la qualité microbiologique des formulations galénique préparées à base des huiles essentielles (1%) sont mentionnées dans le tableau 13.

Tableau 12: Les caractéristiques macroscopiques, organoleptiques pH et des formes galéniques FHM, FHJ et FHS (1%).

Pommade	caractéristiques organoleptiques		Homogénéité	pH	Qualité microbiologique
	Odeur	Couleur			
FHM	Intense caractéristique à l'odeur de myrte	Blanche	aspect lisse et absence totale d'agrégats	4.88	Absence de la FTAM, levures, moisissures et les germes pathogènes (<i>S. aureus</i> , et <i>P. aeruginos</i>)
FHJ	Intense caractéristique à l'odeur	Blanche	aspect lisse et absence totale d'agrégats	5.48	Absence de la FTAM, levures, moisissures et les germes pathogènes (<i>S. aureus</i> , et <i>P. aeruginos</i>)
FHS	Légère caractéristique à l'odeur de smyrnium	Blanche	aspect lisse et absence totale d'agrégats	4.75	Absence de la FTAM, levures, moisissures et les germes pathogènes (<i>S. aureus</i> , et <i>P. aeruginosa</i>)

Les formulations galéniques préparées sont homogène. Elles ont présenté un aspect lisse avec absence totale de grumeau après étalement d'une couche mince de chaque préparation sur une surface plane a été constatée. Les formulations préparées ont un pH légèrement acide. Les valeurs de pH obtenus sont voisines à celle de la peau humaine qui est compris entre 4.5 et 6.0 avec une moyenne de 5.5 (Boukhira, 2017), ce qui prouve l'innocuité de ces pommades lorsqu'ils sont appliqués sur la peau humaine. Une variation de pH peut être le signe d'une instabilité, ou d'une altération des constituants (Parat, 1991). Les résultats des analyses microbiologique obtenus répondent aux normes exigées par la pharmacopée européenne (2016), ou on enregistre l'absence des germes viables totaux, des levures, des moisissures et les germes pathogènes (*S. aureus*, et *P. aeruginosa*). Les résultats précédents confirment la bonne qualité des formulations galénique.

6.2. Test d'Irritation cutanée primaire

L'indice d'irritation primaire est un paramètre primordial qui doit être mesuré pour tester le pouvoir irritant des médicaments destiné pour une application cutanée. Les résultats de l'IP des trois pommades formulées sur la peau du flanc scarifié et intacte de six rats sont présentée dans les tableaux 14, 15 et 16 avec les scores de Draize pour l'œdème et l'érythème apparus après 24 h et 72 h d'application du produit.

Tableau 13 : Résultats de l'indice d'irritation primaire de la pommade de l'huile essentielle de *M. communis* L. 1% suivant l'échelle de Draize

N° de rat	Flanc témoin				Flanc scarifié				
	24h		72h		24h		72h		
	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	
1	0	0	0	0	0	0	0	1	
2	0	0	0	0	1	1	0	1	
3	0	0	0	0	0	1	0	1	
4	0	0	0	0	1	1	0	0	
5	0	0	0	0	0	1	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	
IP	= [(0+0)+(0+0)] flanc témoin				+[(2+0)+(4+3) flanc scarifié] /24				IP=0.375

Tableau 14: Résultats de l'indice d'irritation primaire de la pommade de l'huile essentielle de *J.oxycedrus ssp oxycedrus* 1% suivant l'échelle de Draize.

N° de rat	Flanc témoin				Flanc scarifié				
	24h		72h		24h		72h		
	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	1	2	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	1	
4	0	0	0	0	1	2	0	1	
5	0	0	0	0	0	1	0	1	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	
IP	= [(0+0)+(0+0)] flanc témoin				+[(2+0)+(2+3) flanc scarifié] /24				IP = 0.417

Tableau 15 : Résultats de l'indice d'irritation primaire de la pommade de l'huile essentielle de *S.olusatrum L.* 1% suivant l'échelle de Draize.

N° de rat	Flanc témoin				Flanc scarifié			
	24h		72h		24h		72h	
	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème	Œdème	Erythème
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	2	0	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
IP = [(0+0)+(0+0)] flanc témoin + [(0+0)+(2+1)] flanc scarifié / 24								IP = 0.167

D'après les résultats mentionnés dans les tableaux précédents les indices d'irritation primaire cutanée des trois formulations galéniques sont inférieure à 0.5 et donc nos pommades sont considérées comme des produits non irritants pour la peau selon l'échelle numérique de Draize.

7. Etude de l'activité anti-inflammatoire des formulations galénique *in vivo*

7.1. Evolution du poids corporel et de la température rectale

Le suivi du poids corporel et de la température rectale des rats témoins sains, induits non traités, traités par diclofénac, placebo et par les trois formulations galéniques; FHM, FHJ, FHS l'expérimentation sont représentés dans les figure 40et 41. Sachant que les rats ont bénéficié de la même nourriture, en libre accès, et ont été pesés avec la même balance.

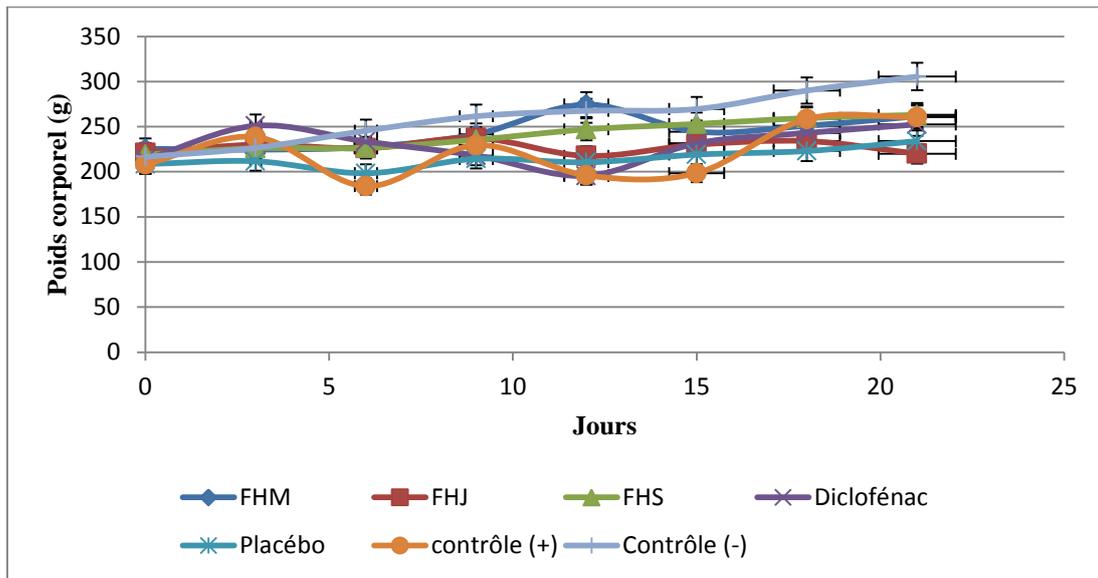


Figure 40 : Evolution du poids corporel des rats pendant la période d’expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5)

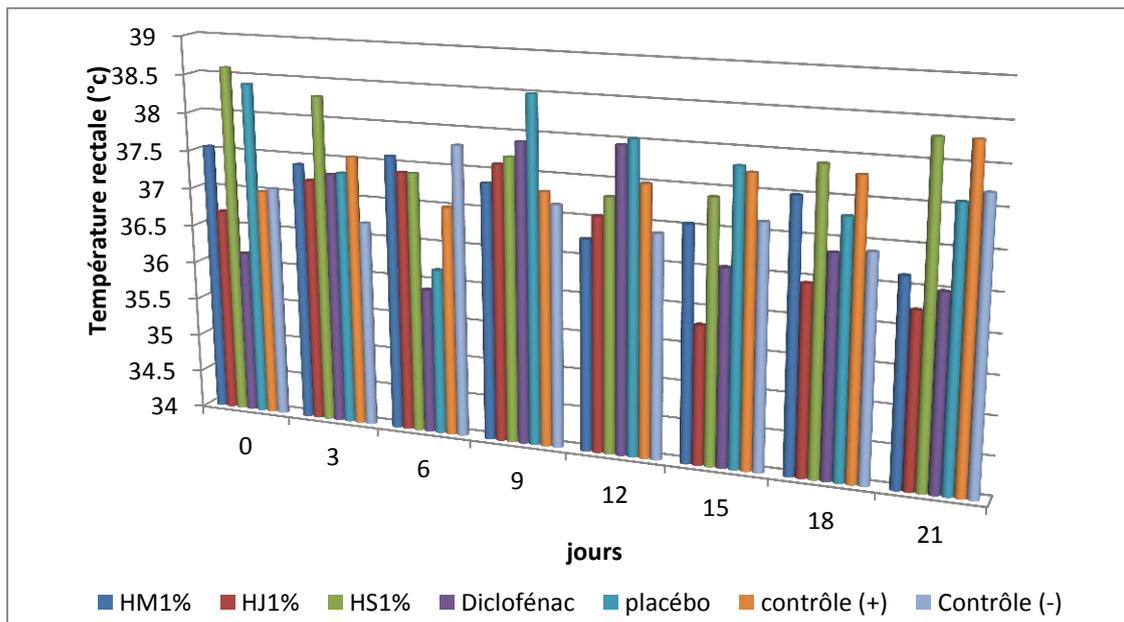


Figure 41: Température rectale des rats pendant la période d’expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5).

Nos résultats montrent une diminution du poids corporel chez les rats de tous les groupes après la 2ème injection de formol (figure 42). En effet, les rats avaient du mal à accéder à la nourriture grâce au processus physiopathologique de défense de l'organisme qui nécessite l'intervention de plusieurs systèmes et fonctions organiques et biologiques impliqués

dans ce processus (Belkhodja, 2016). Une nette croissance a été constatée dès les premiers jours d'application cutanée dans les groupes traités avec FHM et FHM. Tandis que la diminution du poids corporel chez les rats traités au diclofénac reste continue jusqu'au 11ème jour. De même, une légère amélioration du poids corporel a été enregistrée chez les rats induits, traités et non traités, à partir du 12ème jour d'expérimentation.

La température des rats était instable dans tous les groupes traités et sains. Elle est variée entre 35.9°C et 38.6° C tout au long de l'expérience. Une différence significative a été observée entre les groupes induits (traité et non traité) et le groupe contrôle négatif ($P < 0.005$).

7.2. Evolution de l'œdème

L'évolution de diamètre d'œdème des pattes des rats induit par le formol et traité par les pommades à base des huiles essentielles ainsi que par le placebo et par la pommade pharmaceutique Diclofénac diéthylamine 1% ont été comparé avec le groupe des rats induits non traités (contrôle +) et avec le groupe témoin sain (contrôle -). Les résultats sont présentés dans la figure 42.

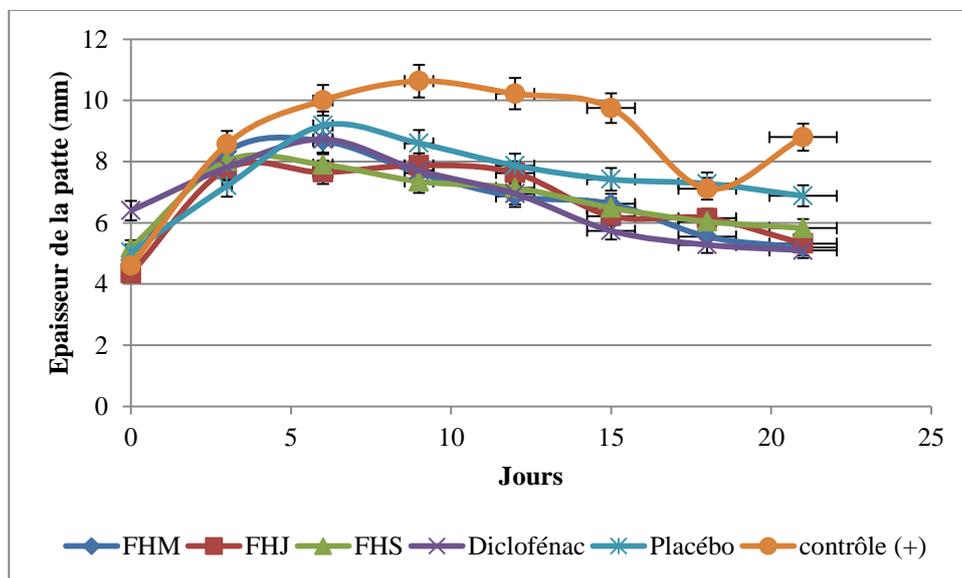


Figure 42: Evolution de l'œdème des rats induits non traités et traités pendant l'expérimentation

L'augmentation du gonflement des pattes arrière droite a été perçue jusqu'à 6^{ème} jours, puis elle a commencé à diminuer dans les groupes de traitement de manière dose-dépendante. Cette évolution chez les rats induits non traités le diamètre de l'œdème atteint une valeur maximale de 10,63 mm au 9^{ème} jour. En effet, l'injection du formaldéhyde induit en dégradant les protéines au site d'injection et accélère l'accumulation d'une réponse immunologique contre les produits dénaturés (Nair et al., 2012). Ce qui provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques responsables du processus inflammatoire tels que l'histamine et de la sérotonine et la bradykinine et la biosynthèse des prostaglandines (Reanmongkol et al., 2009). Ces médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel et cause de l'œdème localisé et la sensation de la douleur (Mansour, 2015). L'application locale des différentes formulations FHM, FHS, FHJ ainsi que du Diclofénac a réduit significativement ($P < 0.005$) l'épaisseur de la patte par rapport au groupe induit non traité et groupe traité par le placebo. Les résultats ont révélé que FHM, FHS, FHJ sont apparues efficace pour réduire les réponses induites par le formol.

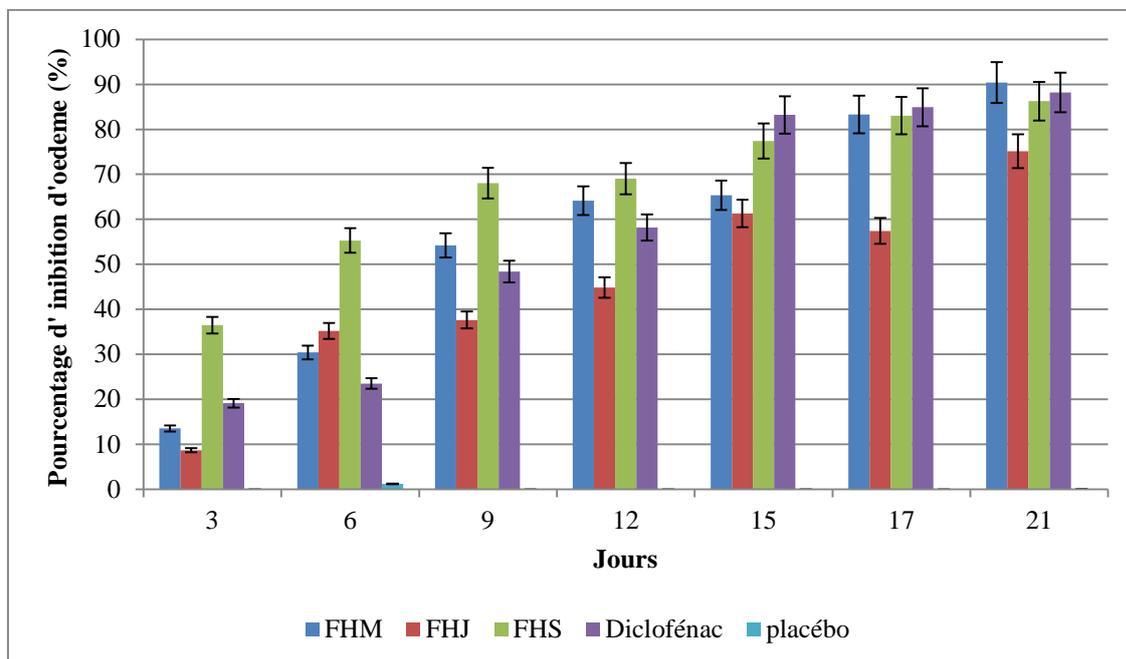


Figure 43 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème pendant le traitement. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5).

La pommade FHS a inhibé de manière significative l'inflammation par rapport à la FHM qui a donné un effet identique à celui du groupe traité au diclofénac. Cependant, L'inhibition de l'augmentation du diamètre des pattes des animaux traités par la formulation FHJ a donné un effet inhibiteur notable avec un pourcentage de 75.14 % par rapport au groupe placebo qui a donné une inhibition de 0.048 % au 21^{ème} jour. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par les huiles essentielles dans l'étude *in vitro* ci-dessus. Cette différence peut être interprétée par la composition chimique des huiles essentielles. Des études ont prouvé que le 1,8-Cineole, le Vanadium- Pentacarbonyl(.Eta.3-2-Propenyl) présente une activités anti-inflammatoires significatives (Santos et Rao, 2000 ; Semiz., 2022). D'autre part, le caryophyllène Oxide et le Kaur-16-ène sont des puissants agents analgésiques et anti-inflammatoires (Chamorro, 2008 ; Chavan et al., 2010). Le trans-phytol s'est avéré posséder une activité antioxydante et contre l'arthrite (Shimizu et Tomoo, 2008).

Touaibia (2018) a été onvestigué *in vivo* l'effet anti-inflammatoire du myrte commun algérien sur l'œdème induit par la carraghénane. Il a été prouvé que l'huile essentielle de myrte commun (100 mg/kg) était capable de réduire les œdèmes de la patte arrière avec un effet comparable à celui observé avec le Diclofénac® (témoin positif).

Une étude *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire d'extraits méthanoliques de fruits et de feuilles de *J. oxycedrus subsp. Oxycedrus* de Turquie a montré la présence d'un effet inhibiteur remarquable contre le modèle d'œdème aigue induit par la carraghénane à une dose de 100 mg/kg. Ils ont également présenté une réduction significative de l'œdème induit par la PGE2 (Akkol et al., 2009).

Néanmoins, aucune évaluation inflammatoire *in vivo* des huiles essentielles de *S. olusatrum L.* n'a été réalisée.

7.3. Indice de thymus et poids relatif des organes

A la fin de la période expérimentale, les rats ont été sacrifiés et le poids des organes (cœur, poumons, foie, reins) a été pris pour observer les effets de l'inflammation ainsi que l'efficacité des différents traitements sur les organes. Les valeurs de poids des organes par rapport à celui de l'organisme sont indiquées dans la figure 44.

Les résultats illustrent une légère augmentation du poids relatif du foie chez les rats malades non traités par rapport aux autres groupes. En effet, l'augmentation du poids relatif

du foie est due aux manifestations hépatiques qui accompagnent les maladies rhumatologiques (Falgarone et al, 2013).

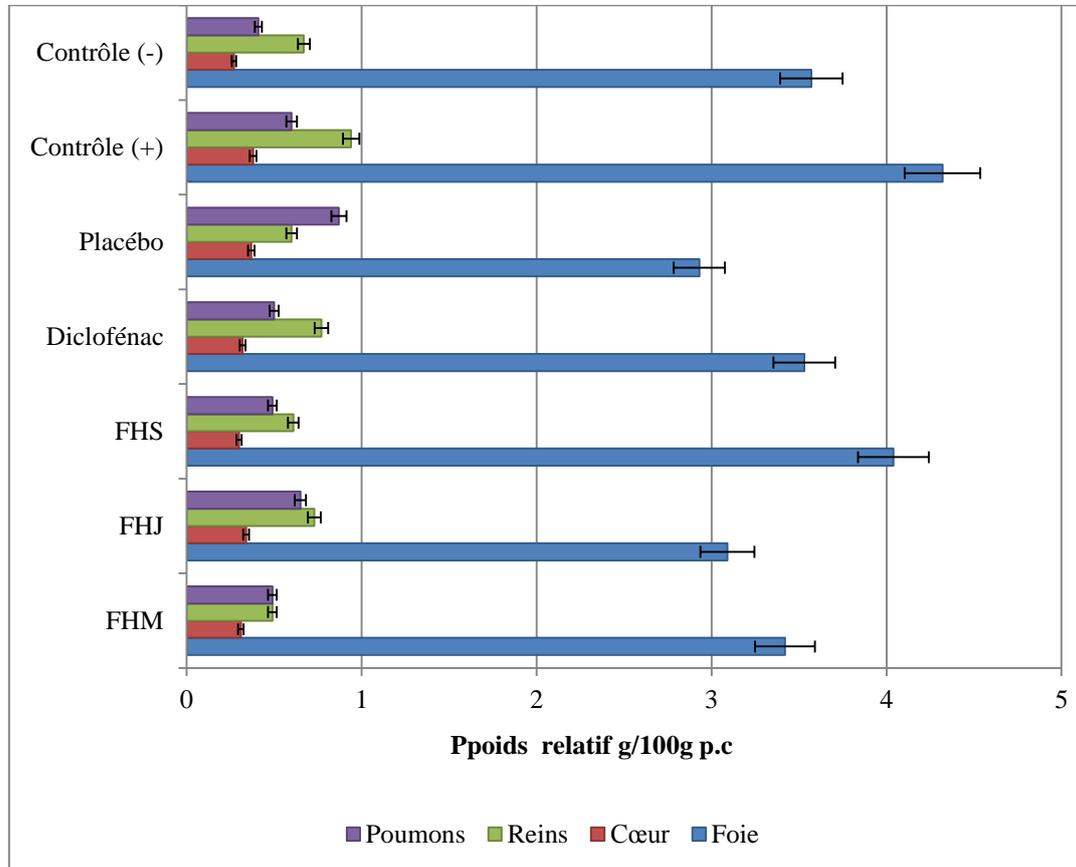


Figure 44 : Poids relatif des organes. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)

Pour l'indice de thymus et de la rate, les résultats sont mentionnés dans la figure 46. Une différence significative a été observée entre les groupes traités avec les formules FHM, FHS, FHS par rapport au contrôle positif et le groupe traité par le placebo qu'ils ont enregistré des valeurs significativement ($P < 0,05$) plus élevées que celles du groupe témoin sain. Par contre, une augmentation très significative des valeurs de l'indice thymus des groupes induits traités avec du gel de diclofénac par rapport au groupe de rats témoins sains.

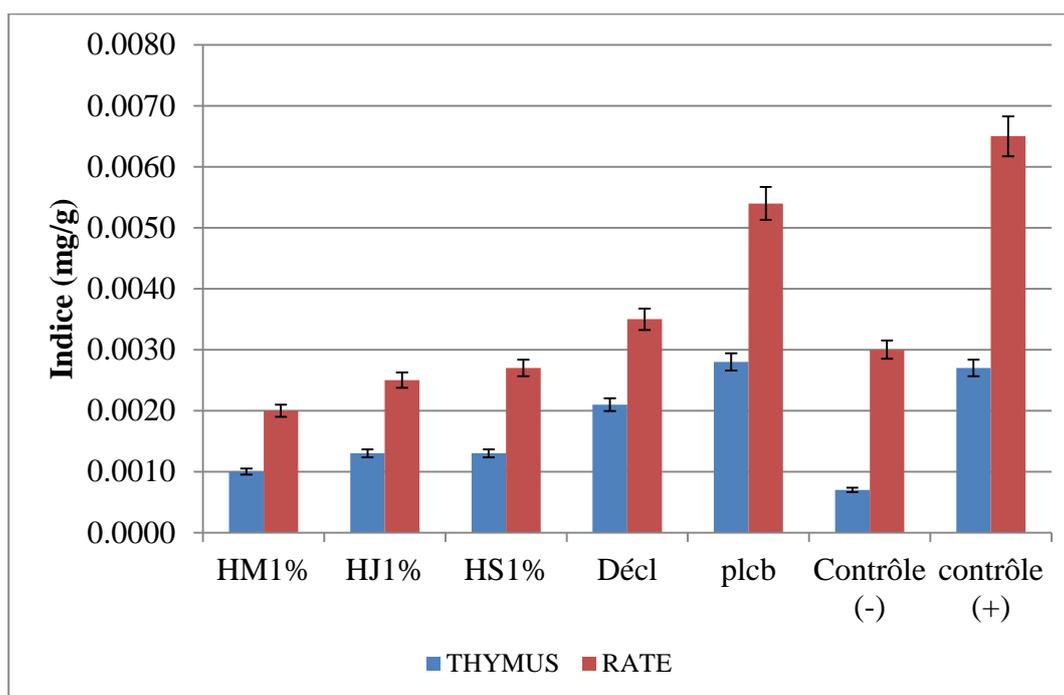


Figure 45 : Indices de la rate et du thymus de rats traités par FHM, FHJ, FHS, diclofénac, placebo et des rat témoins sains (contrôle négatif) et rats induits non traités (contrôle positif)
Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)

L'inflammation induite par l'adjuvant complet de Freund (Attou, 2021) provoque une augmentation significative de l'indice du thymus et de la rate chez les rats induits non traités, ce qui est cohérent avec ce que nous avons trouvé. Cette augmentation du poids des organes lymphoïdes (thymus et rate) est probablement due à l'hyperplasie des cellules immunitaires et à l'amplification de la réponse immunitaire humorale et cellulaire consécutive à l'induction de l'inflammation (Rodríguez-Hernández et al, 2013).

7.4. Evaluation des paramètres biochimique

La détermination quelques paramètres biochimiques tels que la protéine réactive C (CRP), la vitesse de sédimentation et l'hémogramme est devenu important pour évaluer une inflammation chronique.

7.4.1. La vitesse de sédimentation et taux de la CRP

La protéine C réactive (CRP) et la vitesse de sédimentation des globules rouge (VS) sont les principaux marqueurs de l'inflammation utilisés au cours de la polyarthrite rhumatoïde

(PR). Les résultats de dosage de CRP et VS dans le sérum des rats sacrifiés sont illustrés dans les figures 46 et 47.

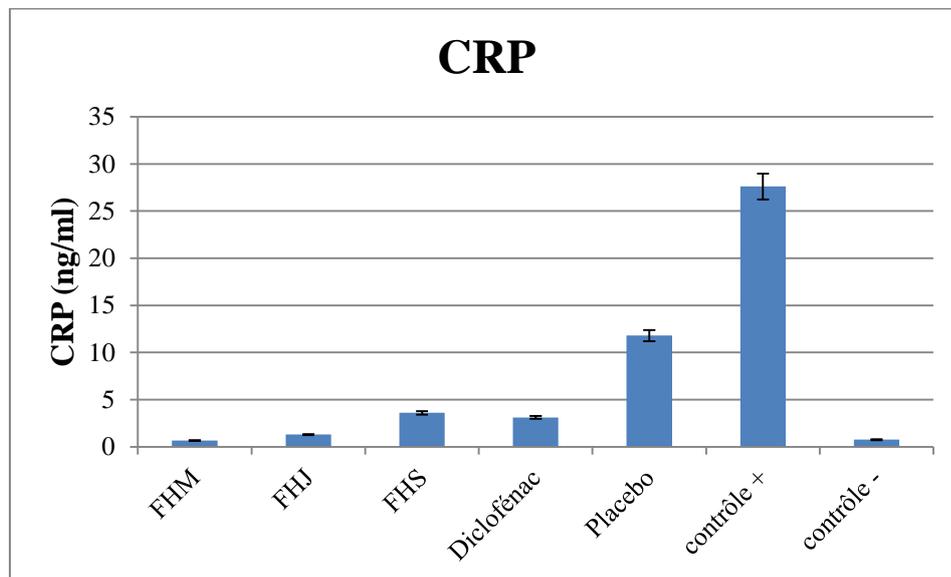


Figure 46: Valeurs de la CRP. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)

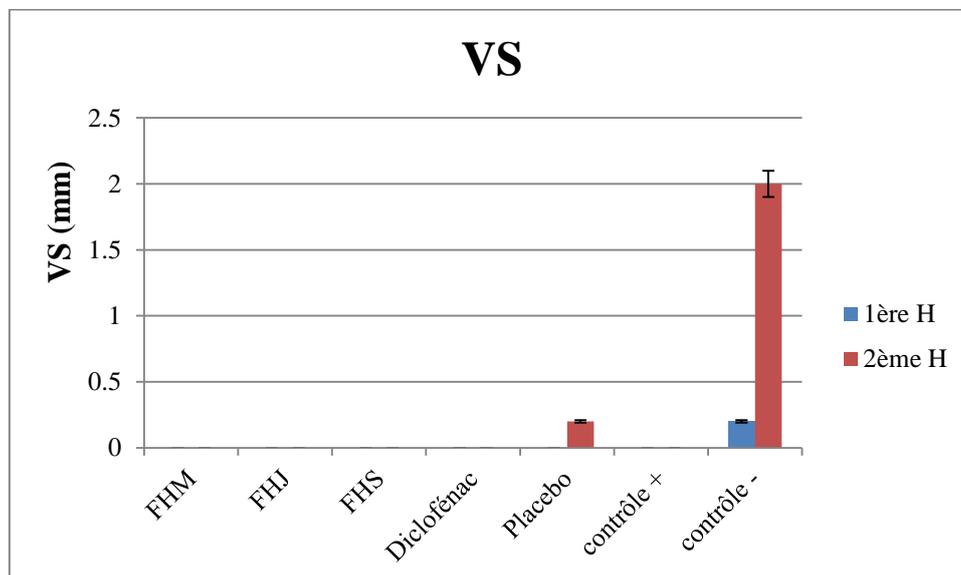


Figure 47: Valeurs de la vitesse de sédimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)

Nous avons noté que les valeurs de la CRP et de VS obtenu chez les rats induits non traité et les rats traités par le placebo était significativement importante par rapport aux rats traités avec les pommades à base des huiles essentielles et de gel de diclofénac qu'ils enregistrent des valeurs proche de celui du groupe témoin (ct-). La CRP est un marqueur de l'inflammation aiguë. C'est une protéine hépatique dont sa demi-vie biologique est courte, de l'ordre de 8 à 12 heures. La vitesse de sédimentation érythrocytaire est liée à l'augmentation de certaines protéines de l'inflammation, dont le fibrinogène, qui inhibe les charges électrostatiques négatives présent à la surface des hématies. Ce qui favorise l'agrégation des hématies entre elles et augmente leur vitesse de sédimentation (Kerrour, 2020). Boukhari et al. (2019) ont prouvé l'existence d'une corrélation entre la VS et la CRP dans la recherche d'un syndrome inflammatoire (VS accélérée/CRP positive). La CRP est un très bon marqueur de l'inflammation, plus sensible que la VS, non dépendant de l'âge ni de sexe et dont la mesure est plus reproductible (Hay-Lombardie, 2020).

7.4.2. La numération-formule sanguine (NFS)

L'hémogramme peut s'accompagner de certaines anomalies au cours d'un syndrome inflammatoire. Les valeurs des lignee erythrocytaire, leucocytaire et plaquetaires sont illustrées dans les figures 48 et 49.

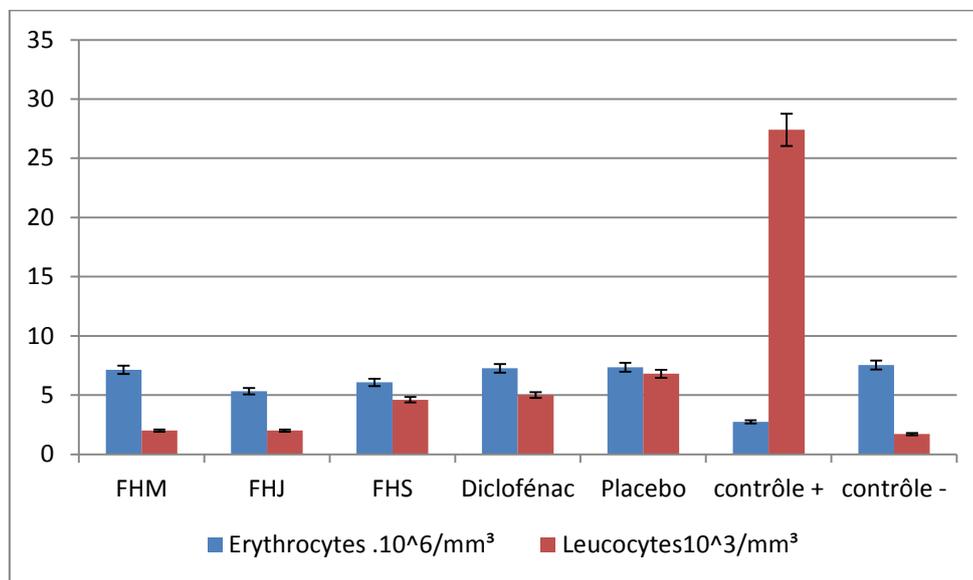


Figure 48: Valeurs de leucocytes et érythrocytes . Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)

D'après nos résultats, les valeurs de leucocyte chez les rats induits non traité présenté dans la figure 49 sont significativement supérieures par rapport au groupe témoin. En revanche, une différence non significative a été enregistrée chez les rats traité. L'hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles est plutôt un marqueur d'infection notamment à pyogènes mais peut aussi se voir au cours de certaines maladies inflammatoires: polyarthrite rhumatoïde et vascularites (Kerrou, 2020).

Par ailleurs, les valeurs des erythrocytes chez les rats de groupe contrôle positif sont significativement diminué au 21^{ème} jour par rapport au rats sains. L'anémie est fréquente en cas d'inflammation chronique (Kerrou, 2020).

Le nombre des plaquettes par millimètre cube de sang chez les rats induits traité et non traité et les rats sains est représentés dans la figure ci-dessous (figure 49).

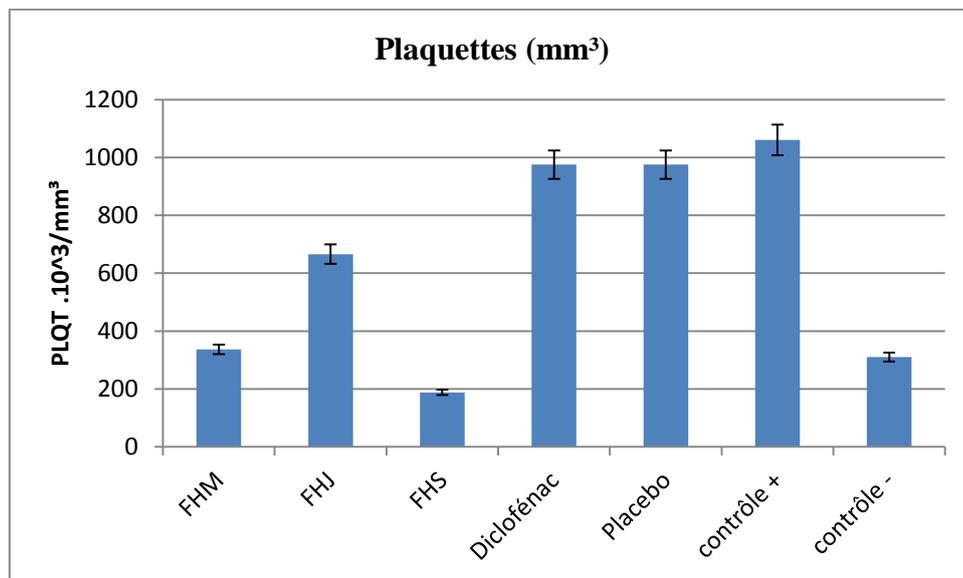


Figure 49 : Valeur des plaquettes. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n =5)

Les résultats ont enregistré une augmentation du nombre de plaquettes dans le groupe induit non traité et dans les groupes traités avec le placebo et le diclofénac. En revanche, chez les rats traités par FHS et FHM, le nombre de plaquettes est proche de celui du contrôle (-). L'hyperplaquettose est un signe d'inflammation prolongée (Kerrou, 2020). Cette thrombocytose s'interprète par le rôle pro-inflammatoire des plaquettes qui produisent des

microparticules libérant des molécules immunoactives. L'augmentation du taux de plaquettes au cours de la PR est corrélée à une augmentation des taux de la CRP et de la VS (Slouma et al., 2021).

Nous concluons que les formulations naturelles ont une grande activité anti-inflammatoire traduite biologiquement par une réduction de certaines protéines plasmatiques résultant de processus inflammatoires

7.5. Analyse radiologique

L'examen radiologique est un examen complémentaire aux analyses biochimiques, il permet d'apprécier l'évolution de la maladie et de vérifier l'efficacité thérapeutique des formulations galéniques préparées.

Les images radiologiques illustrées dans la figure 50 montrent que l'inflammation induit au niveau de la cheville atteint l'articulation du genou. Les aspects radiographiques de l'articulation tibio-fémorale chez les rats traitées sont hautement comparables à ceux des autres groupes et leur effet thérapeutique semble plus convaincant.

Rats traitées au FHM ; La radiographie de l'articulation fémorale montre une opacification prononcée centrée principalement au niveau du condyle fémoral compatible avec des callosités osseuses cicatricielles, associée à une lyse du cartilage articulaire prononcée à une oblitération de l'espace interarticulaire.

La radiographie de l'articulation tibio-fémorale d'un rat traité par FHJ montre une légère opacification principalement concentrée au niveau du condyle fémoral correspondant à un cal osseux cicatriciel, associée à une dégénérescence du cartilage articulaire. L'espace inter articulaire est effacé.

La radiographie de l'articulation fémorotibiale d'un rat traité par FHS présente une légère opacité essentiellement concentrée au niveau du condyle fémoral correspondant à une cal osseuse cicatricielle, associée à une lyse du cartilage articulaire prononcée dans la région poplitée avec conservation de l'espace inter-articulaire.

FHM



FHJ



FHS



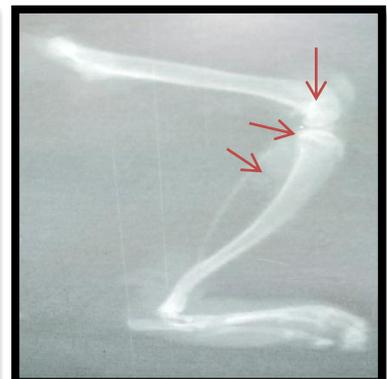
Diclofénac



Placébo



Contrôle (+)



Contrôle (-)



Figure 50: Radiographie des de pattes des rats non traités et des rats .traités par FHM ; FHJ , ; FHS ; diclofénac ; placebo ;Contrôle (+) et contrôle (-) .

Radiographie de l'articulation fémoro-tibiale d'un rat traité par diclofénac (traitement standard) et le placebo présente une nette opacité diffuse sur toute la surface articulaire correspondant à une cale osseuse cicatricielle important qui remplace le cartilage osseux, ce qui rend l'articulation ankylosée. L'aspect radiographique de l'arthrose du genou est fortement prononcé sur le cliché PLC avec une extension invasive de cal osseux sur les extrémités poplitées de l'articulation.

Par contre la radiographie de l'articulation fémoro-tibiale des rats induits non traités (CTR+) atteinte d'une GONARTHROSE, notez la présence d'une lyse osseuse, usure du cartilage de l'articulation du genou et instabilité articulaire.

Articulation fémoro-tibiale de groupe CTR- montre un aspect radiographique normal associer à une opacité normale et aspect bicondylien normal.

Le phénomène arthrosique (gonarthrose) est fortement réduit après traitement à pommade a base des huiles essentielles en comparaison au groupe traité par le diclofénac et placebo. Le traitement FHS semble meilleur, tandis que les autres traitements n'ont pas donnez de bon résultats bien au contraire les articulations se sont cicatrisé et la calcification est fortement prononcée avec aggravation de de la gonarthrose.

Chez les rats souffrant d'arthrite induite par une injection unique de le formaldéhyde (2%), un gonflement des tissus mous ainsi qu'un rétrécissement des espaces articulaires ont été observés, ce qui implique la destruction osseuse en cas d'arthrite (Chinnasamy et al., 2019).

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le but de la recherche de nouveaux principes actifs afin de valoriser les plantes utilisées en médecine traditionnelle en Algérie est surtout dans la wilaya de Mascara. Nous avons pour cela sélectionné trois plantes aromatiques médicinales : *Myrtus communis* L., *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus* et *Smyrniolus atrum* L. Nous avons exploité les extraits biologiques à partir de ces espèces et étudié leurs capacité antioxydante ainsi que d'étudier leurs efficacité thérapeutique contre les dommages liées aux troubles inflammatoire.

Des analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées pour identifier les composants chimique des biomolécules ; extraits phénoliques et huiles essentielles. Les résultats de chromatographie GC-MS ont démontré clairement que les huiles essentielles sont riches en éléments bioactifs spécifiquement le groupe des monoterpènes tels que Alpha-Pinene et le 1,8 cinéole. Le dosage colorimétrique indique l'efficacité du mélange méthanol-eau pour l'extraction polaire. L'identification chromatographique (HPLC) révèle la richesse des extraits en biomolécule avec la dominance de la rutine dans l'extrait méthanolique de myrte alors que l'acide chlorogénique est le composant majeur dans les extraits de *J. oxycedrus* et de *S. olsatrum* L.

L'étude de l'activité antioxydante par le test DPPH et l'activité antioxydante totale a démontré une efficacité majeur des huiles essentielles et des extraits hydrométhanolique avec des valeurs IC50 faible et proche. . Les huiles essentielles possèdent *in vitro* une grande capacité inhibitrice de la dénaturation des protéines ce qui nous amène à les choisir comme candidates pour l'étude *in vivo*.

L'absence de signes cliniques graves de toxicité ou de mortalité chez les rats Wistar pendant la période d'observation indique que l'huile de *M. communis*, *J. oxycedrus ssp oxycedrus* et même *Solusatrum* L. administrée par voie orale est dénuée de toxicité aiguë.

Les formulations galéniques sont préparées à base d'huiles essentielles, des analyses sensorielles, microbiologique et le test de toxicité cutanée *in vivo* sont effectués. Les résultats indiquent la bonne qualité et la sécurité de ces pommades avec l'absence de toute irritation cutanée.

L'effet thérapeutique des formes galéniques préparées est examiné sur un modèle d'arthrite rhumatoïde chronique induite par injection intra-plantaires de formaldéhyde. D'après les résultats obtenus, les rats induits non traités montrent une perte du poids corporel et une

décroissance lente du diamètre d'œdème avec une augmentation remarquable des valeurs biochimiques de l'inflammation (CRP, VS et de leucocytes). Par contre les pommades à base des huiles essentielles et principalement FHS et FHM ont diminués l'œdème et montré un rétablissement des valeurs de marqueurs biochimiques avec une certaine différence dans le degré d'influence. La lecture consensuelle de la radiographie a révélé l'effet inflammatoire chronique du formol qui s'étend au-delà du pied vers les genoux chez le rat. Une résolution osseuse est observée chez les rats traités par FHS et FHM, ce qui confirme les résultats précédents.

Nos résultats montrent que les trois plantes *M.communis*, *S.olusatrum* et *J.oxycedrus* possèdent des activités anti-inflammatoires et antioxydantes *in vivo* et *in vitro*. Il est donc intéressant de compléter cette étude par d'autres travaux :

1/Réaliser des coupes histologiques des pattes des rats.

2/Fractionnement et isolement des biomolécules actives contenues dans les extraits phénoliques et les huiles essentielles et évaluation de ces effets biologiques.

3/ Préparez un autre type de forme galénique et évaluez leur toxicité et leurs effets thérapeutiques par rapport à un autre modèle inflammatoire *in vivo*.

Références bibliographiques

- Abdul Aziz Z. A., Ahmad A., Setapar S. M. M., Karakucuk A., Azim M. M., Mohd L. D., Ganash M., Kamal M. A., Ashraf G. M., 2018. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential – A Review. *Current Drug Metabolism*, 19: 1-19.
- Adams R. P., Morris J. A., Pandey R. N., & Schwarzbach A. E., 2005. Cryptic speciation between *Juniperus deltoides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33(8), 771-787.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum*. 74 : 636-643.
- Aichour R., Charef N., Baghiani A., & Arrar L., 2016. Immunomodulatory effects of Algerian caper. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 51-54.
- Akin M, Aktumsek A, Nostro A. 2012. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *Afr J Biotechnol* 9: 531–535.
- Akkol E. K, Güvenç A., Yesilada E. ,2009. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *Journal of ethnopharmacology*. 125(2): 330-336.
- Alaoui K., Lagorce J. F., Cherrah Y., Hassar M., Amarouch H., & Roquebert J., 1998. Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*. *Annales Pharmaceutiques Françaises (France)*, 56(5).
- Amensour M, Sendra E, Abrini J, Bouhdid S, Perez-Alvarez JA, Fernandez-Lopez J. 2009. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat Prod Commun* 4: 819–824.
- Amiot M.J., Riva C. and Vinet A., 2016. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obesity reviews*, 17, 573–586
- Amira S, Dade M, Schinella G, Ríos J-L. 2012. Anti-inflammatory, antioxidant and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak J Pharm Sci* 25: 65–72.
- Amita Pandey, Shalini Tripathi. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug(2013). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2014; 2 (5): 115-119.

- Ananga A., Georgiev V., & Tsoleva V., 2013. Manipulation and engineering of metabolic and biosynthetic pathway of plant polyphenols. *Current pharmaceutical design*, 19(34), 6186-6206.
- Anonyme: https://www.docteurcliv.com/galerie-photos/image_4431_245.jpg
- Anwar F., Ali M., Hussain A. I., & Shahid M., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(4), 170-176.
- APG III (The angiosperm phylogeny group), 2009. Une mise à jour de la classification Angiosperm Phylogeny Group pour les ordres et familles de plantes à fleurs : APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105–121.
- Appendino G, Maxia L, Bettoni P, et al., 2006. Antibacterial Galloylated Alkylphloroglucinol Glucosides from Myrtle (*Myrtus communis*). *J Nat Prod* 69: 251–254.
- Ashley N. T., Weil Z. M., & Nelson R. J., 2012. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 385-406.
- Asif H, Akram M, Uddin S, et al., 2011. *Myrtus communis* Linn. (Pharmacological activity). *J Med Plants Res* 5, 6257–6259.
- Association Française de Normalisation (AFNOR). *Huiles Essentielles, Tome 2, Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles*, 6th ed.; Paris, France, 20.
- Attou S., 2021. Flavonoïdes et tanins contenus dans les extraits aqueux de la plante *Aristolochia*: formulation galénique et application thérapeutique. Thèse de Doctorat, Faculté des sciences de la nature et de vie, Université Mascara, Algérie.
- Ayoola G. A., Coker H. A., Adesegun S. A., Adepoju-Bello A. A., Obaweya K., Ezennia E. C., & Atangbayila T. O., 2008. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical journal*
- Baba Aissa ., 1999. *Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb : substances végétales d'Afrique*. first ed. Edition moderne, Rouiba, Algérie. P368.
- Bailey-Shaw Y. A., Williams L. A., Green C. E., Rodney S., & Smith A. M., 2017. *In-vitro* evaluation of the anti-inflammatory potential of selected jamaican plant extracts using the bovine serum albumin protein denaturation assay. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 47(1), 145-153.
- Barouki R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, 22(3), 266-272.

- Belkhodja H., Meddah, B., & Gezici S., 2017. Anti-inflammatory effects of essential oils from *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba* on experimental models of acute and chronic inflammation in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), 180-184.
- Bello R, Moreno L, Beltran B, Primo Yufera E. and Esplugues J. 1997. Effects on arterial blood pressure of methanol and dichloromethanol extracts from *Juniperus oxycedrus L.* *Phytotherapy Research* 11, 161-162.
- Belmimoun A., 2016 Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales. THèse de Doctorat, Faculté des sciences de la nature et de vie, Université Mascara , Algerie.
- Ben I. O., Etim O. E., Udo N. M., 2016 Anti-inflammatory effects of *Napoleona imperialis P. Beauv.* (Lecythidaceae) on rat model of inflammation. *Indian j health sci* .9:89-95.
- Ben Mrid R., Bouchmaa N., Bouargalne Y., Ramdan B., Karrouchi K., Kabach I., 2019. Phytochemical Characterization, Antioxidant and In *Vitro* Cytotoxic Activity Evaluation of *Juniperusoxycedrus Subsp. oxycedrus* Needles and Berries. *Molecules*. 24:502
- Benavente-Garcia O. & Castillo J., 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6185-6205.
- Bene, K., Camara, D., Soumahoro, I. A., Kanga, Y., & Zirihi, G. N. (2017). Formulation galénique d'une pommade antimicrobienne à base d'un extrait hydroalcoolique de *Bersama abyssinica Fresen.* (Melianthaceae). *Ethnopharmacologia*, 58, 24-33..
- Benelli G., Pavela R., Canale A., Nicoletti M., f R., Cappellacci L., ... & Maggi F., 2017. Isofuranodiene and germacrone from *Smyrniium olusatrum* essential oil as acaricides and oviposition inhibitors against *Tetranychus urticae*: Impact of chemical stabilization of isofuranodiene by interaction with silver triflate. *Journal of Pest Science*, 90, 693-699.
- Bensakhria A., 2018. Toxicité Aigüe. *Toxicologie Générale*, Chapitre II, 21-28.
- Bergman M.E., Davis B., 2019. Phillips M.A. Medically useful plant terpenoids: Biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. *Molecules*, 24, 3961.
- Bertaudière-Montes V. and Montès N., 2004. *Le Genévrier*, éd. Actes Sud, Le Nom de l'arbre, 96 pp.
- Bhar H et Balouk A., 2011. *Plantes Aromatique et Médicinales Du Maroc. L'espace marocain*, 68, 20 – 46.

- Boizot N., and Charpentier .J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. Pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008)
- Bothorel P., 2011. Implication du stress oxydant dans la biologie tumorale et intérêt d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie (Doctoral dissertation).
- Bouaziz A., khennouf S., Abu zarga M., Abdalla S., Baghiani A., Chare N.. Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2015; 5(1): 19-28
- Bouchenak, O., Yahiaoui, K., Benhabyles, N., Laoufi, R., Toubal, S., El, H. D., ... & Blizak, D. A. K. (2020). Phytochemical screening and evaluation of the antioxidant power of leaves of *Myrtus communis* L. and *Rhamnus Alaternus* L.
- Boudiba S., Tamfu A. N., Berka B., Hanini K., Hioun S., Allaf K., ... & Ceylan O., 2021. Anti-quorum sensing and antioxidant activity of essential oils extracted from *Juniperus* species, growing spontaneously in Tebessa Region (East of Algeria). Natural Product Communications, 16(6), 1934578X211024039.
- Boukhari A. A., Hartani M., & Boumesbah S.,2019. Etude de la corrélation entre la vitesse de sédimentation des hématies et la protéine C réactive dans la recherche d'un syndrome inflammatoire.
- Boukhenoufa A., 2020. La formulation des extraits naturels de plantes médicinalesde la région de Mascaraet évaluation de l'activité antifongique sur *Candida albicans*isolée cliniquement. Thèse de Doctorat, Faculté des sciences de la nature et de vie, Université Mascara , Algerie.
- Boukhira S., Balouiri M., el Mansouri L., El youbi A. E. H., Bouarfa M., Lebtar S., ... & Bousta D., 2017. Development of natural preservative from *Silene vulgaris* extract in topical formulation under a challenge test and its stability stud. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7, 142-148.
- Bouzabata A., 2015. Contribution à l'étude d'une plante médicinale et aromatique *Myrtus communis* L. Sciences pharmaceutiques. Faculté de Médecine, Université Badji-Mokhtar, Annaba, Algérie.Français. NNT : tel-01493134f.
- Brownlee G., 1950. Effect of deoxycortone and ascorbic acid on formaldehyde-induced arthritis in normal and adrenalectomised rats. Lancet, 268, 157-159.
- Bruneton J.,1999. Toxic plants dangerous to humans and animals. Intercept Limited.

- Buyukokuroglu M.E., Gulcin I., Oktay M., Kufrevioglu O.I., 2001. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol. Res.* 44: 491-494.
- Calvino B.,2023. Inflammation aiguë, inflammation chronique: arthrite rhumatoïde (AR) et ostéoarthrite (OA). *Douleurs: Évaluation-Diagnostic-Traitement*, 24(3), 130-146.
- Chamorro, 2008. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers, *The Journal of Argentine Chemical Society*, 96(1-2), 80-86.
- Chaouche T.M., Haddouchi F, Atik-Bekara F., Ksouri R., Azzi R., Boucherit Z., Tefiani C., Larbat. R, 2015 Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MSn characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus*. *Industrial Crops and Products*. 64:182-187.
- Chaouche T.M., Haddouchi F., Ksouri R., Medini F., Atik-Bekara F., 2013. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus*. *Phytothérapie*. 11: 244–249
- Chavan M. J., Wakte P. S., & Shinde D. B., 2010. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L.bark. *Phytomedicine*, 17(2), 149-151.
- Chavan U. D., Shahidi F., & Naczki M., 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food chemistry*, 75(4), 509-512.
- Chinnasamy V., Subramaniyan V., Chandiran S., Kayarohanam S., Kanniyar D. C., Velaga V. S. S. R., & Muhammad S., 2019. Antiarthritic Activity of *Achyranthes Aspera* on Formaldehyde-Induced Arthritis in Rats. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 7(17), 2709.
- Cillard J., Cillard P., 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*, 13(1) : 24–29.
- Conforti F., Marrelli M., Carmela C., Menichini F., Valentina P., Uzunov D., ... & Menichini F.,2011. Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), *in vitro* inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food chemistry* 129(4), 1413-1419.
- Conforti F., Sosa S., Marrelli M., Menichini,F., Statti G. A., Uzunov D., ... & Della Loggia R., 2008. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 144-151.

- Daroui-Mokaddem H., Kabouche A., Bouacha M., Soumati B., El-Azzouny A., Bruneau C., & Kabouche Z., 2010. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the essential oil of fresh leaves of *Eucalyptus globulus*, and leaves and stems of *Smyrniolobos olusatrum* from Constantine (Algeria). *Natural product communications*, 5(10), 1934578X1000501031.
- Das S., Mishra B., Gill, K., Ashraf M. S., Singh A. K., Sinha M., ... & Dey S., 2011. Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 38-43.
- De Graft-Johnson J., Kolodziejczyk K., Krol M., Nowak P., Krol B., Nowak D., 2007. Ferric reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*; 100:345–352.
- Defraigne J.O., Degruene F., Malherbe C., Paquot N., Pincemail J., Voussure S. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*. 21 : 66-75.
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W., 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review *Medicines*, 3, 25; doi:10.3390/medicines3040025.
- Do Q. D., Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen P. L., Huynh L. H., Soetaredjo F. E., Ismadji S., Ju Y. H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica* J. *Food Drug Anal.* 22: 296–302
- Dob T., Dahmane D., Chelghoum C., 2006. Essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* growing in Algeria. *Pharm Biol.* 44(1):1–6.
- Durand D., Gobert M., Gatellier P., Herbivores U., & QuaPA U. , 2012. Oxydation des lipides et des protéines des viandes au cours des processus de transformation: mécanismes, conséquences et prévention. HORS-SÉRIE.
- Ebrahimzadeh M.A., Pourmmorad F., Hafezi S., 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turk J Biol*, 32(1): 43–49.

- El Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala, M., Addi E.H.A., Casabianca H., El Mousadik A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F.N.R., Elaissari A, 2009. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.*, 483, 220–243.
- El Jemli M., Kamal R., Marmouzi I., Zerrouki A., Cherrah Y., Alaoui K., 2016. Radical-scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Advances in pharmacological sciences*.
- Eryilmaz M, Tosun A, Tumen I (2016) Antimicrobial activity of some species from pinaceae and cupressaceae. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13: 35–40.
- Fadel H., Benayache F., Chalchat J. C., Figueredo G., Chalard P., Hazmoune H., & Benayache S., 2021. Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae) growing in Aures region of Algeria. *Natural Product Research*, 35(15), 2616-2620.
- Falgarone G., Nahon P., Boissier M.C., 2013. Atteintes hépatiques de la polyarthrite rhumatoïde. *L'Actualité rhumatologique*. Elsevier Masson SAS. Chapitre 2.
- Favier, 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* - novembre-décembre, 108-115.
- Favier A., 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.
- Ferrero-Millani L., Nelsen O.H., 2007. Anderson PS, Girardin SE. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 beta generation. *Clin. Exp. Immunol.* 2007;147:227-235.
- Fonc J.H., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. P : 629.
- Fraga C. G., Croft, K. D., Kennedy D. O., & Tomás-Barberán F. A., 2019. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*. doi: 10.1039/c8fo01997e
- Franceschini P., 2016. *Myrtus communis* L. en Corse et en Méditerranée : de sa composition chimique jusqu'à ses utilisations thérapeutiques. *Sciences pharmaceutiques*. dumas-01315207.

- Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T., & Komaitis M., 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*, 107(3), 1120-1130.
- Gardès-Albert M., 2006. Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 365–372. doi:10.1016/s0003-4509(06)75331-7
- Ghada BEN SALHA. Déterpénation de l'huile essentielle d'*Origanum Majorana* L. et évaluation des activités biologiques. Thèse de Doctorat en Cotutelle. https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/45872/TESIS_BEN_SALHA_GHADA.pdf
- Ghosh R., Alajvegovic A., Gomes A.V., 2015. NSAIDs and cardiovascular diseases: Role of reactive oxygen species. *Oxid Med Cell Longev*. 536962Guenther E., 1948The Essential Oils; D. Van Nostrand Company Inc.: New York, NY, USA, p. 427.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*. 62 : 10 : 628-638.
- Hano C., & Tungmunnithum D., 2020. Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases. *Medicines*, 7(5), 26. doi:10.3390/medicines7050026
- Hayder N., 2004. Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R. B., Mahmoud, A., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L.. Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 564(1), 89-95.
- Hay-Lombardie A.,2020. La vitesse de sédimentation est-elle obsolète. *Correspondances en Onco-Hématologie*, 142-4.
- Hayta S., & Bagci E., 2014. Essential oil constituents of the leaves, bark and cones of *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus* L. from Turkey. *Acta botanica gallica*, 161(2), 201-207.
- Henzen C. 2003. Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. In *Forum Med. Suisse* (Vol. 19, pp. 442-446).
- Kamal R. M., Razis A. F. A., Sukri N. S. M., Perimal E. K., Ahmad H., Patrick R., Djedaini-Pilard F., Mazzon E., Rigaud S., 2022. Beneficial Health Effects of Glucosinolates-Derived Isothiocyanates on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 27, 624.

- Kanoun K, 201. Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaïne). Thèse de magister : Université de Tlemcen. (Algérie).
- Karaman I., Sahin F., Güllüce M., Ögütçü H., Sengül M., Adıgüze A., 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology* .85: 231–235.
- Kerrou M., 2020. Cours de physiopathologie . Institut des sciences vétérinaire
- Kessler M., Ubeaud G., Jung L., 2003. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 55(1):131-142.
- Khebri S., 2011. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de trois *Artemisia*. Thèse de doctorat. Batna, Université El Hadj Lakhder. Faculté des Sciences.
- Kim H. P., Son K. H., Chang H. W., & Kang S. S., 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 96(3), 229-245.
- Kızıllarlan-Hançer Ç., & Akalin E., 2014. Anatomical and micromorphological studies on an unknown vegetable in Turkey, *Smyrniolum olusatrum* L. (Apiaceae). *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 44(2), 193-199.
- Klimczak I., Małacka M., Szlachta M., & Gliszczyńska-Świąło A., 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of food composition and analysis*, 20(3-4), 313-322.
- Klimko, M., Boratyńska, K., Montserrat, J. M., Didukh, Y., Romo, A., Gómez, D., ... & Boratyński, A., 2007. Morphological variation of *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 202(2), 133-147.
- Koechlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Krishnaveni M., Durairaj S., Madhiyan P., Amsavalli L., Chandrasekar R., 2013. In vitro free radical scavenging activity of aqueous leaf extract of plants near thermal power plant, Mettur, Salem. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.4(9): 3659.

- Landoulsi A., 2016. Etude chimiotaxonomique et activité biologique des métabolites secondaires des plantes du genre *Eryngium* (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II; Université de Tunis El Manar).
- Larsen G. L., & Henson P. M., 1983. Mediators of inflammation. *Annual review of immunology*, 1(1), 335-359.
- Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* (51):7292-7295.
- Li X.M., Tian S.L., Pang Z.C., Shi J.-Y., Feng Z.-S., Zhang Y.- M., 2009. Extraction of *Cuminumcuminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chem.*, 115, 1114–1119.
- Loizzo M.R., Tundis R., Conforti F., Saab A.M., Statti GA and Menichini F., 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry Journal* 105: 572-578.
- Lopez G.V., Batthyany C., Blanco F., Botti H., Trostchansky A., Migliaro E., Radi R., Gonzalez M., Cerecetto H., Rubbo H. (2005). Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorg. Med. Chem.* 13 : 5787-5796.
- Lusina D., Estève V., Cécille A., Soni T., Porcheret H., Maisonneuve L., & Le Pennec M. P. , 2002. Évaluation du dosage de la C Reactive Protein sur automate d'hématologie micros CRP®. *Revue Francaise des Laboratoires*, 2002(347), 63-66.
- Lyu X., Lee J., and Chen W. N., 2019. Potential natural food preservatives and their sustainable production in yeast: terpenoids and polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 67, 4397–4417. doi: 10.1021/acs.jafc.8b07141.
- Maggi F., Barboni L., Papa F., Caprioli G., Ricciutelli M., Sagratini G., Vittori S., 2012. A forgotten vegetable (*Smyrniolum olusatrum* L., Apiaceae) as a rich source of isofuranodiene, *Food. Chem.*, 135: 2852-2862.
- Maggi F., Papa F., Giuliani C., Maleci Bini L., Venditti A., Bianco A., ... & Vittori S. , 2015. Essential oil chemotypification and secretory structures of the neglected vegetable *Smyrniolum olusatrum* L. (Apiaceae) growing in central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(2), 139-159.

- Maleki S. J., Crespo J. F., & Cabanillas B. 2019. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food chemistry*, 299, 125124.
- Mandl J, Szarka A, Banhegyi G. Vitamin C : update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 2009, vol. 157, n° 7, p. 1097-110.
- Mansour A. M., Pulido J. S., & Arevalo, J. F., 2015. Diabetic macular edema: from old concepts to new therapeutic avenues. *Medical Hypothesis, Discovery and Innovation in Ophthalmology*, 4(4), 130.
- Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El Ghadraoui L., Aafi A., & Farah A., 2010. Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie*, 8(3), 166-170.
- Marfak A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Mémoire, Université de Limoges, Limoges.
- Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Falconieri D., Frau M.A., Maxia A., Gonçalves M.J., Cavaleiro C., Salgueiro L., 2012. Antifungal activity and chemical composition of essential oils from *Smyrniium olusatrum*L. (Apiaceae) from Italy and Portugal. *Natural Product Research*, 26(11), 993–1003. doi:10.1080/14786419.2010.541876
- Marongiu B., Porcedda S., Caredda A., De Gioannis B., Vargiu L., & Paolo La Colla. , 2003. Extraction of *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(5), 390-397.
- Marwa R., & Benoudina M., 2019. Le rôle des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif (Doctoral dissertation, Abdelhafid boussouf university Centre mila).
- Mayouf N., 2019. Propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et immunomodulatrice des extraits d'*Asphodelus microcarpus*. THÈSE de Doctorat, Faculté des sciences de la nature et de vie, Université Farhat ABBES , Algerie.
- Medini H., Manongiu B., Aicha N., Chekir-Ghedira L., Harzalla-Skhiri F., & Khouja M. L., 2013. Chemical and antibacterial polymorphism of *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus ssp. macrocarpa* (Cupressaceae) leaf essential oils from Tunisia. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Mendes M. M., Gazarini L. C., & Rodrigues M. L. ,2001. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments—effects on structure and

- chemical composition of foliage and plant water relations. *Environmental and experimental botany*, 45(2), 165-178.
- Mesbahi M. A., Ouahrani M. R., Rebiai A., Amara D. G., & Chouikh A., 2019. Characterization of *Zygophyllum album* L monofloral honey from El-Oued, Algeria. *Current Nutrition & Food Science*, 15(5), 476-483.
 - Messaoud C., Benabdallah A., & Boussaid M., 2013. Phytochemicals, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of *Smyrniium olusatrum* L. leaf, flower and fruit. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies* 17, 212-220.
 - Messaoud C., Laabidi A., & Boussaid, M., 2012. *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities. *Journal of food science*, 77(9), C941-C947.
 - Miceli N., Marino A., Koroğlu A., Cacciola F., Dugo P., Mondello L. et al., 2020. Comparative study of the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts of five *Juniperus* L.(Cupressaceae) taxa growing in Turkey. *Natural Product Research*, 34(11):1636-1641.
 - Migliore J., 2011. Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre *Myrtus* en méditerranée et au Sahara. Thèse de Doctorat. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III. Faculté des Sciences et Techniques, Discipline Biologie des populations et Ecologie
 - Migliore J., Baumel A., Juin M., & Médail, F., 2012. From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography* 39(5), 942-956.
 - Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*. 3 : 173-193.
 -
 - Mimica-Dukić N., Bugarin D., Grbović S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić B., Orčić D., ... & Couladis, M., 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules*, 15(4), 2759-2770.
 - Minareci E., & Kalyoncu F., 2012. Proximate composition, antimicrobial and antioxidant activities of six wild edible celeries (*Smyrniium* L.). *AJPP*, 6(13), 968-972.

- Mohammadi Z., & Atik F., 2012. HPLC-UV Analysis and antioxidant potential of phenolic compounds from endemic shrub of arid environment *Tamarix pauciovulata* J. Gay. *Journal of Life Sciences*, 6(8), 883.
- Mohammadi Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p.
- Monique S., Claude M. M., 1996. Formes pharmaceutiques pour application locale. Edition Tec et Doc Lavoisier. p.98, 101-102,141-142
- Moreno L, Bello R, Primo-Yúfera E and Espluges J., 1997. *In vitro* studies of methanol and dichloromethanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Phytotherapy Res* 11[4]: 309–311.
- Moreno, L., Bello, R., Beltran, B., Calatayud, S., Primo-Yufer, E., Espluges, J., 1998. Pharmacological screening of different *J. oxycedrus* L. extracts. *Pharmacology and Toxicology* 82, 108–112
- Muster D., 2005. Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 21-29.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G. N., Traoré D. & Aké-Assi L., 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire).
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D., & Aké-Assi L., 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
- Nair V., Singh S., & Gupta Y. K. (2012). Evaluation of disease modifying activity of *Coriandrum sativum* in experimental models. *The Indian Journal of Medical Research*, 135(2), 240.
- Nassar M. I., Aboutabl E. S. A., Ahmed R. F., El-Khrisy E. D. A., Ibrahim K. M., & Sleem A. A., 2010. Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy research*. 2(6), 325.
- Nawrot-Chorabik K., Sułkowska M., & Gumulak N., 2022. Secondary Metabolites Produced by Trees and Fungi: Achievements So Far and Challenges Remaining. *Forests*, 13(8), 1338.
- Noack, M., Kolopp-Sarda, M. (2018). Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018 (499), 28-37.

- Nordberg J., Arner E. S., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 31, n° 11, p. 1287-312.
- Northrop-Clewes C.A., Thurnham D.I., 2007. Monitoring micronutrients in cigarette OCL. 13 (1) : 24-29.
- OCDE. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë, N° 423, (2001)
- OCDE., 2004. Ligne directrice 428 - Absorption cutanée : méthode *in vitro*. OCDE, Paris.
- Ofosu F. K., Daliri E. B.-M., Elahi F., Chelliah R., Lee B.-H., & Oh D.-H., 2020. New Insights on the Use of Polyphenols as Natural Preservatives and Their Emerging Safety Concerns. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. doi:10.3389/fsufs.2020.525810.
- Oguntibeju OO., 2018. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *J Inflamm Res*. 11:307.
- Orhan N., Akkol E and Ergun F., 2012. Evaluation of antiinflammatory and antinociceptive effects of some *Juniperus* species growing in Turkey. *Turk J Biol* 36: 719-726
- Oyedapo O., Akinpelu B., Akinwunmi K., Adeyinka M., Sipeolu F., 2010. Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *Int J Plant PhysiolBiochem*. 2:46-51.
- Papaioannou F., Koutsaviti A., & Tzakou O., 2010. Volatile constituents of different parts of *Smyrniolum olusatrum* from Greece. *Natural Product Communications*, 5(11), 1934578X1000501124.
- Patel V.R., Patel P.R. , Kajal S.S., 2010. Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in Western Region of India. *Advan. Biol. Res*. 4(1):23-
- Pavoni L., Cespi M., Bonacucina G., Maggi F., Pavela R., & Benelli G. , 2019. Isofuranodiene microemulsions as novel larvicides to manage *Culex quinquefasciatus* mosquito vectors. In VIII SYRP: SI Fit. Young Researchers Project (pp. 17-17). SI Fit..
- Petrelli R., Ranjbarian F., Dall'Acqua S., Papa F., Iannarelli R., Kamte S. L. N., ... & Cappellacci L., 2017. An overlooked horticultural crop, *Smyrniolum olusatrum*, as a potential source of compounds effective against African trypanosomiasis. *Parasitology international*, 66(2), 146-151.
- Pharmacopée européenne., 2016. 9ème édition. Test des germes spécifiques. Examen microbiologique des produits non stériles. P4404-4414.

- Pillon, F., Michiels Y. (2013). Épidémiologie et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(531), 1–2. doi:10.1016/j.actpha.2013.09.018
- Poisson C., 2013 ; Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique.
- Potter C. M., & Jones D. L., 2021. Polyphenolic profiling of green waste determined by UPLC-HDMSE. *Processes*, 9(5), 824.
- Prats E., Galindo J.C., Bazzalo M.E., León A., Macías F.A., 2007. Antifungal activity of a new phenolic compound from Capitulum of a head rot-resistant sunflower genotype. *Journal of Chemical Ecology*;33:2245-2253.
- Preston, S. J., Wilson, C., Jennings, S., Provan, J., & McDonald, R. A. (2007). The status of *Juniperus communis* L. in Northern Ireland in 2005. *The Irish Naturalists' Journal*, 372-378.
- Prieto P., Pineda M., & Aguilar M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Quassinti L., Bramucci M., Lupidi G., Barboni L., Ricciutelli M., Sagratini G., ... & Maggi F., 2013. *In vitro* biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniurn olusatrum* L. (Apiaceae). *Food chemistry*, 138(2-3), 808-813.
- Quezel P. and Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, 636p
- Rimbach G., Moehring J., Huebbe P., & Lodge J. K., 2010. Gene-regulatory activity of α -tocopherol. *Molecules*, 15(3), 1746-1761.
- Rodríguez-Hernández H., Simental-Mendía L. E., Rodríguez-Ramírez G., & Reyes-Romero M. A., 2013. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *International journal of endocrinology*, 2013.
- Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Vincieri F. F., & Tattini M., 1999. Identification and quantitation of polyphenols in leaves of *Myrtus communis* L. *Chromatographia* 49, 17-20.
- Rosato A., Maggi F., Cianfaglione K., Conti F., Ciaschetti G., Rakotosaona R., ... & Corbo F., 2018. Chemical composition and antibacterial activity of seven uncommon essential oils. *Journal of Essential oil Research*, 30(4), 233-243..
- Ruberto G., Baratta M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem*, 68, 167–174.

- Sachde S., & Davies, K. J., 2008. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 215-223.
- Sadgrove N. J., Padilla-González G. F., Phumthum M., 2022. Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. *Plants*, 11(6), 789.
- Saida C. H., Imane Z., Fairouz S., Nabahat B., González-Mas M. C., Blázquez M. A., ... & Mohamed A., 2020. Chemical composition and antibacterial effect of *Smyrniolum olusatrum* L. Fruit Essential Oil. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 10(6), 577-584.
- Sánchez-Moreno C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Sanogo R., Konipo A., Maiga A., Arama A.E., Diallo D., Bougoudogo F, et al., 2006. Formulation d'une pommade dermique à base d'extraits de *Mitracarpus scaber* (ZUCC) *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 2006, Vol. XIV. pp. 159-177.
- Santos F. A., & Rao V. S. N., 2000. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 14(4), 240-244.
- Sela F, Karapandzova M, Stefkov G, Cvetkovikj I, Trajkovska-Dokikj E, Kaftandzieva A and Kulevanova S., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of berry essential oil of *Juniperus oxycedrus* L. [Cupressaceae] grown wild in Republic of Macedonia. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin* 59 [1, 2] : 41 - 48
- Semerdjieva I., Zheljaskov V. D., Radoukova T., Radanović D., Marković T., Dincheva I., ... & Kačániová M., 2019. Essential oil yield, composition, bioactivity and leaf morphology of *Juniperus oxycedrus* L. from Bulgaria and Serbia. *Biochemical systematics and ecology*, 84, 55-63.
- Semiz S., 2022. Vanadium as potential therapeutic agent for COVID-19: A focus on its antiviral, antiinflammatory, and antihyperglycemic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 69, 126887.
- Serafini M., Peluso I., & Raguzzini A., 2010. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 273-278.

- Serra V., Salvatori G., & Pastorelli G., 2021. Dietary polyphenol supplementation in food producing animals: Effects on the quality of derived products. *Animals*, 11(2), 401. doi:10.3390/ani11020401.
- Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 1992. 32(1): 67-103.
- Shimizu M., & Tomoo T., 1994. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. V. Constituents and anti-inflammatory effect of Aoki, *Aucuba japonica* Thunb. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 17(5), 665-667.
- Singleton V. L., Orthofer R., & Lamuela-Raventós R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Slouma M., Bettaieb H., Dhahri R., Metoui L., Boussetta N., Sayhi S., ... & Bassem L., 2021. Le taux de plaquettes au cours de la polyarthrite rhumatoïde: un nouveau marqueur de l'inflammation?. *Revue du Rhumatisme*. 88, A259-A260.
- Strehl J. D., Hartmann A., & Agaimy A., 2011. Numerous IgG4-positive plasma cells are ubiquitous in diverse localised non-specific chronic inflammatory conditions and need to be distinguished from IgG4-related systemic disorders. *Journal of clinical pathology*, 64(3), 237-243.
- Sumbul, S., Ahmad, M. A., Asif, M., Saud, I., & Akhtar, M., 2010. Evaluation of *Myrtus communis* Linn. berries (common myrtle) in experimental ulcer models in rats. *Human & experimental toxicology*, 29(11), 935-944.
- Tongnuanchan P., Benjakul S., 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J. Food Sci.*, 79, 1231–1249.
- Tongnuanchan P., Benjakul S., 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J. Food Sci.*, 79, 1231–1249.
- Torres-Rêgo M., Furtado A.A., Bitencourt M.A.O., Lima M.C.J.D.S., Andrade R.C.L.C.D., Azevedo E.P.D., et al., 2016. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancorniaspeciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16(1):1-10.
- Touaibia M., & Chaouch F. Z., 2014. Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus in situ et in vitro. *Nature & Technology/Nature & Technologie*, (10).
- Tréchet P., & Jouzeau J.-Y., 2014. Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Revue Française d'Allergologie*, 54(3), 212–217. doi:10.1016/j.reval.2014.01.026

- Valentini G., Bellomaria B., Maggi F., & Manzi A., 2003. The leaf and female cone oils of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *oxycedrus* and *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Ball. from Abruzzo. *Journal of Essential Oil Research*. 15(6), 418-421.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.
- Van Acker S. A., Tromp M. N., Griffioen D. H., Van Bennekom W. P., Van Der Vijgh W. J., & Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology and medicine*, 20(3), 331-342.
- Vane J.R., Botting R.M., 1995. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*. 44:1-10..
- Vian M.A., Fernandez X., Visinoni, F., Chemat F., 2008. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *J. Chromatogr. A*, 1190, 14–17.
- Vilar L., Caudullo G., & de Rigo D., 2016. *Juniperus oxycedrus* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species*. Publication Office of the European Union, European Commission, Luxembourg, 105.
- Vinita S., Deepak V., Rajshree P., & Sheikh I. A., 2015. *Pleurotus ostreatus* produces antioxidant and antiarthritic activity in wistar albino rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)*, 4(5), 1230-1246.
- Wallace J.L., Vong L, 2008. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs*. 9:1151–6.
- Wannes A.W, Mhamdi B, Marzouk B. , 2009. Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. *Food Chem* 112: 621–626.
- Wannes W. A., Mhamdi B., Sriti, J., Jemia M. B., Ouchikh O., Hamdaoui G., ... & Marzouk B., 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1362-1370.
- Weill B., Batteux F., 2003. *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. Eds, De Boeck Supérieur, Paris. 12-23.
- Whitehouse M.W., 2011. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: Reflections after 60 years. *Inflammopharmacology*. 19(1):1–19.

- WHO, 1980. Expert Committee on Diabetes Mellitus Second Report. Technical Report Series 646. World Health Organization, Geneva, pp. 66.
- Xu W. S., Dang Y. Y., Guo J. J., Wu G. S., Lu J. J., Chen X. P., et al., 2012. Furanodiene induces endoplasmic reticulum stress and presents antiproliferative activities in lung cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Yaglioglu A.S. and Eser F., 2017. Screening of some Juniperus extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *South African Journal of Botany*. 13:29-33.
- Yang J., Guo J., Yuan J., 2008. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*. 2008; 41(6):1060–1066
- Yuan G., Wahlqvist M. L., He G., Yang M., & Li D., 2006. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 15(2).
- Zanotti E., 2003. *Juniperus oxycedrus*. MONACO NATURE ENCYCLOPEDIA. <https://www.monaconatureencyclopedia.com/juniperus-oxycedrus/?lang=en>
- Živić N., Milošević ., Dekić V., Dekić B., Ristić N., Ristić M., et al., 2019. Phytochemical and antioxidant screening of some extracts of *Juniperus communis* L. and *Juniperus oxycedrus* L. *Czech J. Food Sci.* 37:351–358.

Annexes

Les chromatogrammes de CPG/SM des huiles essentielles

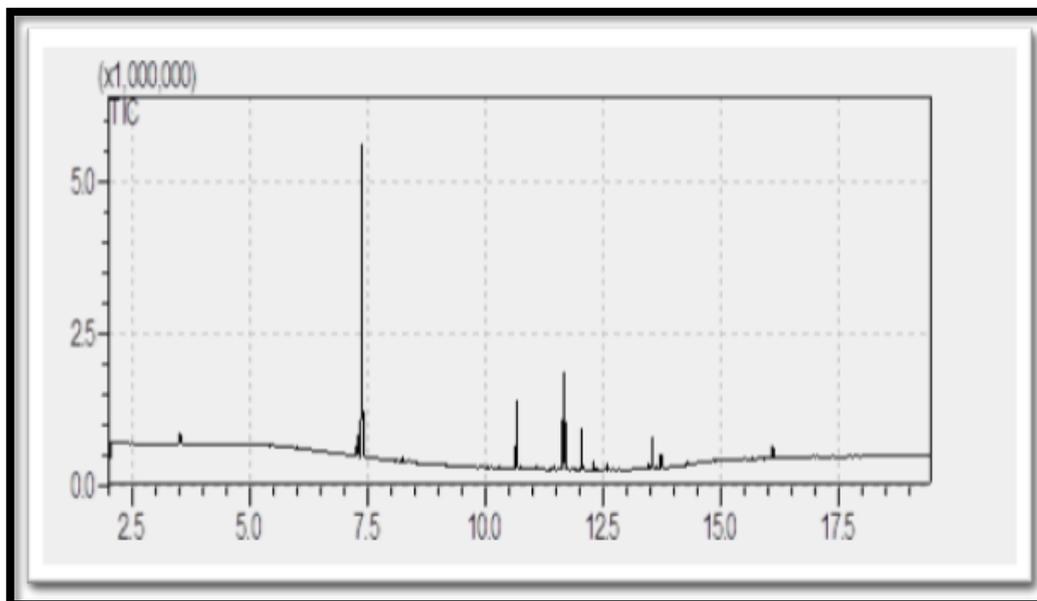


Figure 1: Chromatogramme de CPG/SM des HE de la partie aérienne de *Myrtus communis L.*

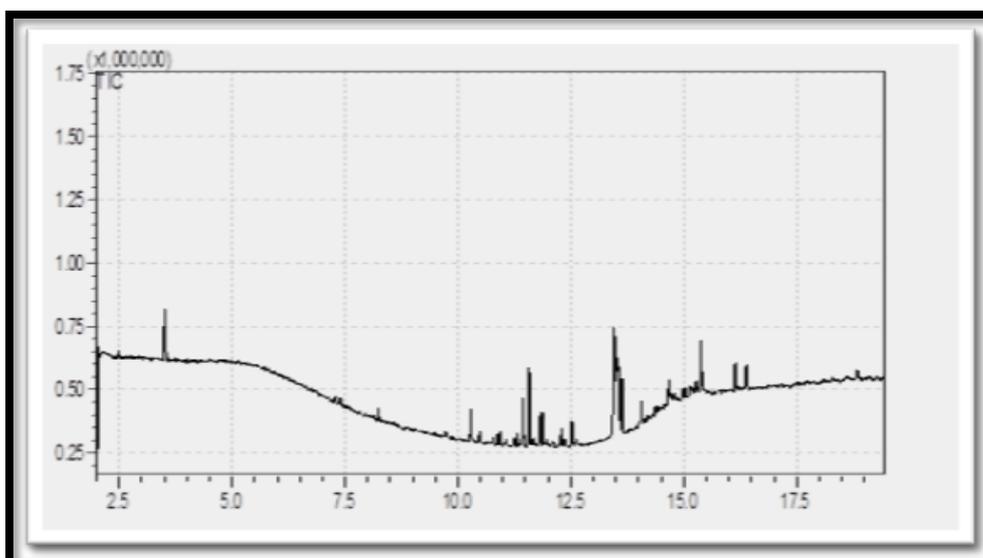


Figure 2: Chromatogramme de CPG/SM des HE de la partie aérienne de *Juniperus oxycedrus ssp oxycedrus.*

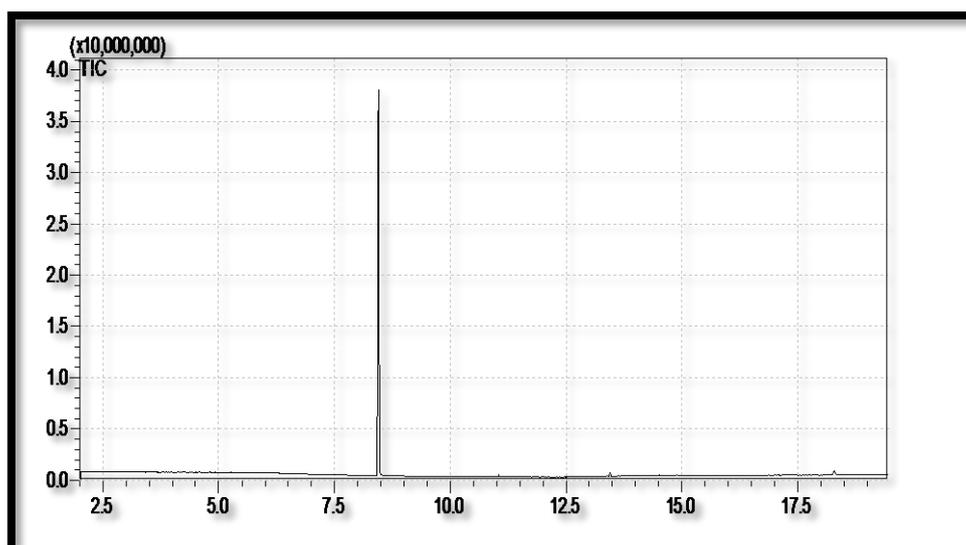


Figure 3: Chromatogramme de CPG/SM des HE de la partie aérienne de *Smyrniun olusatrum L.*

Etude statistique

1/Dosage des composées phénoliques

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
Composé	2	28881.713	14440.857	3.552	0.055
Residuals	15	60977.910	4065.194		

2/ Activité antioxydante

2.1/ DPPH

a/ Pourcentage d'inhibition

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
INF	9	2152.9807	239.2201	4.3874	0.0010
Dose	1	2260.8635	2260.8635	41.4649	0.0000
INF:Dose	9	958.5381	106.5042	1.9533	0.0819

Residuals	30	1635.7427	54.5248
-----------	----	-----------	---------

b/ IC50

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
INF	9	77390.726	8598.970	15.475	0.000
Residuals	20	11113.457	555.673		

2.2. Activité antioxydante totale

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
INF	9	393399.7719	43711.0858	73.3922	0.0000
Residuals	17	10124.8918	595.5819	NA	NA

3. Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
INF	9	26837.9	2982.0	0.7	0.7
Dose	1	13965.3	13965.3	3.5	0.1
Residuals	29	115653.9	3988.1	NA	NA

4. Etude de la toxicité orale aiguë

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
Toxic	3	905.458	301.819	13.541	0.000
Jours	1	1795.289	1795.289	80.545	0.000
Toxic:jours	3	83.582	27.861	1.250	0.325
Residuals	16	356.629	22.289		

5. Eude de l'activité anti-inflammatoire

5.1. Poids corporelle des rats

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
Inflam	6	10935.666	1822.611	9.37197854	1.58E-06
Jours	1	7617.36894	7617.36894	39.1689825	1.69E-07
Inflam:Jours	6	3674.42679	612.404466	3.14902166	0.01218172
Residuals	42	8167.9297	194.474517		

5.2. Température rectale

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
Inflam	6	6.22056418	1.0367607	3.2050026	0.01233065
Jours	1	0.06227779	0.06227779	0.19252319	0.66337643
Inflam:Jours	6	1.71498233	0.28583039	0.88360519	0.51656936
Residuals	37	11.9688345	0.32348201	NA	NA

5.3. Diamètre de l'œdème

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
Inflam	6	78.0062402	13.00104	7.17206267	2.61E-05
Jours	1	0.00480613	0.00480613	0.00265131	0.95917846
Inflam:Jours	6	11.260361	1.87672683	1.03530198	0.41630709
Residuals	42	76.1348173	1.81273374	NA	NA

5.4. Pourcentage d'inhibition de l'œdème

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
Inflam	4	19962.01	4990.50	157.73	2.39E-17
Jours	1	10000.41	10000.41	316.07	1.07E-15
Inflam:Jours	4	3402.31	850.58	26.88	9.82E-09
Residuals	25	791.00	31.64		

5.5. Indice de thymus

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
INF	6	1.77E-05	2.96E-06	5.88E+00	2.44E-02
Thymus	1	1.34E-05	1.34E-05	2.66E+01	2.09E-03
Residuals	6	3.02E-06	5.03E-07	NA	NA

5.6. Poids relatif des organes

Source des variations	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Probabilité (>F)
INF	6	0.44484	0.07414	1.04544	0.4294
Organe	3	48.61290	16.20430	228.49264	1.64E-14
Residuals	18	1.27653	0.07092		

Milieux de culture

1/Tampon peptoné au chlorure de sodium pH 7 (TSE) :(g/l)

Peptone de caséine	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate de sodium, dibasique	9,0 g
Phosphate de potassium, dibasique	1,5g
Phosphate de sodium, 12H ₂ O	10 g
Thiosulfate de sodium, 5H ₂ O	0,8 g
Lécithine	0,3 g
L-Histidine,HCl	0,1 g
Tween® 80	3 g
pH = 7	

2/Gélose glucosée à l'extrait de levure (PCA) :(g/l)

Peptone de caséine	5.0
Extrait de levure	2.5
Dextrose	1.0
Agar	15.0
pH= 7.0 ±0.2 à 25 °C	

3/ Gélose Sabouraud SG 4% :(g/l)

Peptones	10,0 g
Glucose	40,0 g
Agar	15,0 g
pH = 5	

4/ Bouillon tryptone caséine - soja (TSB) : (g/l)

Peptone (origine non animale)	20 g
Glucose	2.5g
Chlorure de sodium (NaCl)	5g
Phosphate bipotassique d'hydrogène(K ₂ HPO ₄)	2.5g
pH = 7,3	

5/ Milieu gélosé-cétrimide :(g/l)

Peptone	20 g
sucre	10 g
sels biliaires n°3	1,5 g
rouge neutre	0,05 g
chlorure de sodium	5 g
Agar-agar	15 g
pH = 7,1	

6/Gélose Chapman : (g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande de bœuf	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar-agar	15 g
pH = 7,4	

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.7135281>

Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* extracts from Algeria

Soumia Djellouli ^{*1}, Khadidja Side Larbi ¹, Boumediene Meddah ¹, Abdelkrim Rebiai ²,
Aicha Tir Touil ¹, Pascal Sonnet ³

¹ Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety (LBGMSS), Faculty of Nature and Life Sciences, University Mustapha Stambouli of Mascara, Mascara, Algeria

² Laboratory Valorisation and Technology of Saharan Resources (VTRS), University of El-Oued, P.O. Box 789, El-Oued 39000, Algeria

³ AGIR Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Picardie, Amiens, France

* Corresponding author e-mail: soumia.djellouli@univ-mascara.dz

Received: 31 July 2022; Revised submission: 13 August 2022; Accepted: 27 September 2022



<https://jbrodka.com/index.php/ejbr>

Copyright: © The Author(s) 2022. Licensee Joanna Bródka, Poland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ABSTRACT: This study was conducted to examine chemical compositions, antioxidant and anti-inflammatory properties of methanolic and aqueous extracts from aerial parts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* growing in Mascara, Algeria. The quantitative assessment indicated that methanol extract was the most concentrated in phenolic, flavonoid and tannin contents (167.77±5.12 mg GAE/g DW, 90.56±2.23mg QE/g DE and 110.21±2.38 mg CE/g DE respectively). The chromatographic analysis by HPLC showed quantitative differences in phenolic constituents, noting that Chlorogenic acid was the major compound of both extracts. Moreover, the methanolic extract exhibited the highest antioxidant activity than the aqueous extract when tested by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (IC₅₀ 4.45±0.001 µg/mL) and phosphomolybdenum (328.52±0.071 mg of GAE/g DW) assays. Furthermore, the *in vitro* anti-inflammatory activity showed strong inhibition of albumin denaturation by the methanolic extract at different concentrations when compared to the standard drug diclofenac sodium. These findings confirm the richness of Algerian *Juniperus oxycedrus* extracts in bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory capacities.

Keywords: Anti-inflammatory; Antioxidant; *Juniperus oxycedrus*; HPLC; *In vitro*; Phenolic extracts.

1. INTRODUCTION

The developments concerning human health and its treatments have been increasing every passing day. Research of natural drugs with any side effects on human health has been a growing interest among scientists. Traditional medicine is used widely throughout the world including Algerian population. It is a system that relies on a wide range of practices. Recently there has been an upsurge of interest in the therapeutic potentials of plants, as antioxidants by interacting with free radicals, chelating, catalytic metals, and functioning as oxygen scavengers, in order to reduce oxidative damage produced by free radicals [1, 2]. Oxidative damage is considered as a pathogenic mechanism contributing to aging and the development of different chronic diseases

including diabetes, cancer, atherosclerosis, arthritis, and neurological disorders [3] and frequently is associated with inflammation [4]. Inflammation is a normal protective response to tissue injury and it involves a complex array of enzyme activation, mediator release, fluid extravasations, cell migration, tissue breakdown and repair [5]. Inflammation is a defense process that occurs when the body reacts to a variety of stimuli including infections, irritants, or various cellular and tissue damages [6]. As well, inflammation is associated with pain, and it involves an increase in protein denaturation, an increase in vascular permeability, and membrane alteration, among others [7]. Several synthetic anti-inflammatory and antioxidant products are widely available (non-steroidal and steroidal anti-inflammatory drugs, propyl gallate, butylated hydroxytoluene). However, their overuse can cause gastrointestinal, renal or cardiovascular complications, ulcers and osteoporosis [8, 9]. In this context, the anti-inflammatory and antioxidant properties of various medicinal plants are being investigated throughout the world to find out newer, effective, and safe drugs, in order to use them in foods and pharmaceutical preparations to replace synthetic ones [10]. Plants have a large number of secondary metabolites such as alkaloids, terpenoids and phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids, tannins, lignins, quinones, coumarins and others. These phenolics are responsible for biological properties like antimicrobial, anticarcinogenic, anti-inflammatory and other therapeutic effects [11]. *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* belonging to the *Cupressaceae* family is a shrub or small tree. It is endemic to the Mediterranean area and near East countries [12]. From the entire *Juniperus* genus, this tree is the most abundant subspecies in Algeria [13]. Commonly known as «taga» *Juniperus* has been used in folk medicine to treat bronchitis, cough, common colds, gynecological diseases, fungal infections on foot, hemorrhoids [14], bloating, wound healing [15], abdominal pain, stomach disorders, as digestive, hypoglycemic, against urinary inflammations and to pass kidney stone [16]. Extracts from the leaves, resin, bark, and berries have anti-cancer [17], analgesic [18], and antibacterial properties [19]. Moreover, cade oil, distilled from the wood of *J. oxycedrus*, is widely used in human and veterinary dermatology for treating skin diseases such as eczema [20].

The present study aimed to investigate the chemical composition of methanolic and aqueous extracts from aerial parts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, and then assess their *in vitro* antioxidant properties and anti-inflammatory effect against protein denaturation.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material

Juniperus oxycedrus subsp. *oxycedrus* aerial parts (leaves and stems) were collected in March 2018 from the forest of Nesmoth (latitude N 35°14', longitude E 0°22'52") in the Mascara region, north-western Algeria. The sample was identified in the laboratory of the University of Mascara, then the referenced specimen (J.O: 01) was air-dried in the shade at room temperature. The powder of the dried plant was stored away from heat, air and light until the moment of use.

2.2. Preparation of extracts

2.2.1. Infusion in water

Powdered plant material (500 g) was infused in 1L of boiling water and incubated at dark and at room temperature on a rotating shaker (300 rpm) for 1 hour. Then, the aqueous extract was filtered with Whatman filter paper No. 1 and dried at 40°C [21].



Figure 1. Aerial parts (leaves stems and fruits) of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* from Mascara, Algeria.

2.2.2. Maceration with methanol

The methanolic extract was prepared using maceration of 100 g of powder in methanol-water (70:30 v/v) at room temperature for 24 h. The filtrate was evaporated in a vacuum at 45°C by a rotary evaporator, and then the residue was dried in an oven at 40°C to yield dry extract.

The percentage of yield was calculated according to the following formula: (weight of extract/weight of dried plant material) × 100 [13].

2.3. Total phenolic content determination (TPC)

The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method with some modifications as described by Ismail et al. [22]. Briefly, 100 µL of a sample (1 mg/ml) was mixed with 750 µL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted to 10% in distilled water). After 5 minutes, 750 µL of a sodium carbonate solution (6% w/v) was added and the mixture was incubated in the dark at room temperature for 90 min. The absorbance of the resulting color solution was measured at 725 nm using a UV-Vis spectrophotometer. The calibration curve was prepared with gallic acid solutions. TPC was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per grams of the dry weight of plant extract (DW) ± standard deviation (SD).

2.4. Total flavonoid content determination

Total flavonoid content was determined by a colorimetric assay described by Attia et al. [23] with some modifications. A volume of 1000 µL of each sample was mixed with 1000 µL of aluminum chloride solution (2%) and allowed at room temperature for 30 min. the absorbance of the resulting solutions was then determined at 430 nm. Total flavonoid content was expressed as mg quercetin equivalent (QE) per gram extract (DW) ± SD.

2.5. Total tannins content determination (TTC)

The total tannins content in samples was determined using the vanillin-methanol solution as described by Chaouche et al. [24]. 250 µL of sample (1 mg/ml) were mixed with 1500 µL of vanillin solution (4% in methanol) and 750 µL hydrochloric acid. The mixture was incubated at room temperature for 15 min. The absorbance of the reaction mixture was measured at 500 nm. TTC was expressed as mg catechin equivalents (CE) per gram of dry weight extract (DW) ± SD.

2.6. High-performance liquid chromatography analysis (HPLC)

Phenolic compounds present in extracts were identified using a Shimadzu model prominence liquid

chromatography, thermostatic column compartment, online degasser and a UV-visible detector model SPD-20A (operating at 268 nm) using Shim-pack VP-ODS C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), (Shimadzu Co., Japan). The mobile phase consists of acetonitrile (A) and 0.2% acetic acid in water (B). The gradient linear method was: starting with 90% (B); then decreasing to 86% (B) in 6 min, to 83% (B) in 16 min, to 81% (B) 23 min, held at 77% (B) in 28-35 min, to 60% (B) in 38 min, to 90% (B) in 50 min [25]. The flow rate was 1 ml/min and the injection volume was 20 μL. All the samples and mobile phase were filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore). Stock solutions of standards references were prepared by dissolving 10 mg of purified polyphenol in a 50 mL volumetric bottle containing a sufficient volume of methanol (HPLC grade) to dissolve the polyphenol, it was sonicated for about 10 min and then brought to volume with the mobile phase. Identification of the chromatography peaks was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the reference standards: gallic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, vanillin, rutin, naringin, and quercetin. The quantification of separated peaks was performed by calibration with curves of standards. All chromatography operations were carried out at ambient temperature.

2.7. Evaluation of the antioxidant activity

2.7.1. Phosphomolybdenum antioxidant assay

The total antioxidant capacity was determined according to the phosphomolybdenum techniques. It is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by plant extract and the formation of a green-colored phosphate/Mo(V) complex at acidic pH. A volume of 300 μL of various extracts was added to 3000 μL of a reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 M ammonium molybdate). Test tubes were incubated at 95°C for 90 min. After the samples were cooled at room temperature, the absorbance was measured at 695 nm against the blank, which contained 3000 μL of methanol instead of the extracts. Ascorbic acid served as the reference standard. The total antioxidant capacity was expressed as milligrams gallic acid equivalent per gram dry weight (mg GAE/ DW) [26].

2.7.2. DPPH• Free radical scavenging assay

The antioxidant potential of plant extracts was investigated using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method as described by Wannan et al. [27]. Briefly, 500 μL of a 0.2 mmol/L DPPH methanolic solution was added to 1000 μL of sample solution prepared in methanol at different concentrations (1000, 500, 250, 125, 62.5 μg/mL). After agitation, the mixture was incubated at room temperature for 30 min. The absorbance was then measured at 517 nm against the blank. Ascorbic acid was used as a positive control. The percent inhibition of DPPH radical was calculated as follows: % inhibition = $[Ac - As] / Ac \times 100$, where Ac and As are the absorbance of the control sample and the test sample respectively.

The antiradical activity was expressed as IC₅₀ (μg/mL): the concentration of extract required to reduce 50% of the initial DPPH concentration. Values were estimated using linear regression.

2.8. Evaluation of the *in vitro* anti-inflammatory activity

This assay was evaluated by the protein denaturation method according to the protocol described by Sen et al. [28] with small modifications. Reaction mixtures were prepared using 0.2 mL of an aqueous solution of egg albumin (5%) and 2.8 mL of phosphate-buffered saline (pH 6.4). Then 2 mL of AJE, MJE or standard diclofenac sodium at different concentrations (125, 250, 500, 1000 μg/ml) was added. These mixtures were incubated at 37°C for 15 min. and kept in a water bath at 70°C for 10 min to induce denaturation. After cooling, the turbidity was measured at 660 nm. A similar volume of distilled water served as a control. The percentage

inhibition of protein denaturation was calculated using the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = (A_{\text{test sample}} - A_{\text{control}}) / A_{\text{control}} \times 100.$$

The extract/drug concentration for 50% inhibition (IC₅₀) was determined by plotting percentage inhibition with respect to control against treatment concentration.

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as the average of triplicate values of three independent experiments \pm standard deviation. Statistical comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test. Differences were considered significant at $p < 0.001$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Total phenolic, total flavonoid and total tannins contents

Table 1 summarized extraction yield, total phenolic, total flavonoid and total tannins contents of the extracts prepared from *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* aerial parts (AJE: aqueous extract, MJE: methanolic extract). The extraction with methanol gave a higher yield (14.21%). Moreover, MJE exhibited the highest values of total phenolic content (167.77 mg AGE/g DW), total flavonoid content (90.56 mg QE/g DW) and total tannins content (110.21 mg CE/g DW) compared to aqueous extract AJE (148.84 mg AGE/g DW, 74.06 \pm 3.71 mg QE/g DW, and 86.51 mg CE/g DW).

The difference between these results may be attributed to the polarity of the solvent. According to Do et al. [29], chemicals are more soluble in a mixture of water and organic solvents (methanol, ethanol, and acetone) than in water.

Compared to previous studies on the same plant, total phenolic, total flavonoid and total tannins levels in MJE and AJE are higher than those reported by Chaouche et al. [13] for the hydro-methanolic extracts in needles and roots bark from the plant collected in Tlemcen, Algeria (133.08 \pm 4.1 mg AGE/g DW, 61.52 \pm 3.1 mg CE/g DW and 26.43 \pm 2.6 CE/g DW respectively). However, TPC values are lower than those recorded by Ben Mrid et al. [30] for the same plant collected in Morocco.

Table 1. Yield percentage, total phenolic (TPC), total flavonoid (TFC) and total tannin content (TTC) in *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* extracts.

	Yield (%)	TPC (mg GAE/g DE)	TFC (mg QE/g DE)	TTC (mg CE/g DE)
AJE	9.6 \pm 2.04	148.84 \pm 2.99	74.06 \pm 3.71	86.51 \pm 0.64
MJE	14.21 \pm 0.33	167.77 \pm 5.12	90.56 \pm 2.23	110.21 \pm 2.38

Legend: AJE: *J. oxycedrus* aqueous extract, MJE: *J. oxycedrus* methanolic extract. Values were expressed as means \pm standard deviation of three separate experiments. Significant difference at ($p < 0.001$).

3.2. HPLC analysis of the extracts

The chemical composition of MJE and AJE was further investigated by HPLC analysis (Fig. 2, Fig. 3 and Table 2). Eight phenolic compounds including gallic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, banillin, rutin, naringin and quercetin were identified by matching their retention time values and UV spectrum with those of the corresponding commercial standards. Our results revealed that the total contents of the identified compounds varied among *Juniperus* extracts. MJE was most concentrated in phenolic compounds than AJE. This was in accordance with the results obtained by the colorimetric methods.

Phenolic acids are the major constituents of the aqueous extract, whereas flavonoids are the major components in *Juniperus* methanolic extract. Chlorogenic acid was detected as the most abundant phenolic compound in both AJE and MJE extract (13737.44 and 19872.01 $\mu\text{g/g}$ respectively), followed by naringin and rutin in methanolic extract. While in aqueous extract, gallic acid and p-coumaric acid were the main ones identified.

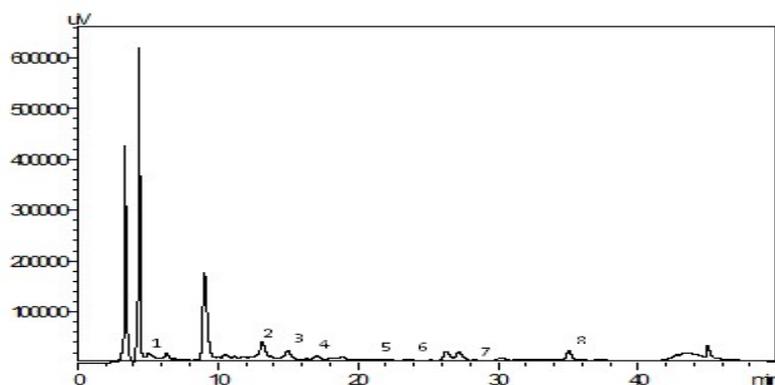


Figure 2. HPLC chromatogram of *J. oxycedrus* aqueous extracts detected at 268 nm. 1: gallic acid, 2: chlorogenic acid, 3: vanillic acid, 4: p-coumaric acid, 5: caffeic acid, 6: vanillin, 7: rutin, 8: naringin.

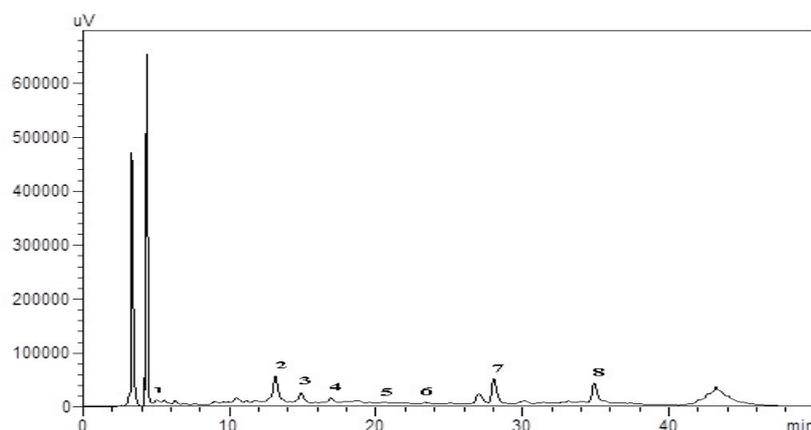


Figure 3. HPLC chromatogram of *J. oxycedrus* methanolic extracts detected at 268 nm. 1: gallic acid, 2: chlorogenic acid, 3: vanillic acid, 4: p-coumaric acid, 5: caffeic acid, 6: vanillin, 7: rutin, 8: naringin.

In a previous study, Seca and Silva [31] proved that coumarins (umbelliferone), flavonoids (amentoflavone, cupressuflavone, hinokiflavone, rutin), are found in various parts of *Juniperus oxycedrus*. According to Yaglioglu and Eser [32], catechin and rutin are the most abundant metabolites found in the leaves of plants growing in Turkey. On the other hand, Miceli et al. [33] have found that amentoflavone was the most abundant flavonoid compound, however protocatechuic acid was the only phenolic acid observed. Also, recent studies proved the occurrence of salicylic acid as the main compound in needles of the plant collected in Morocco (3398.1 mg/100 g and 2942.7 mg/100 g for aqueous and methanolic extracts respectively) followed by rutin, whereas gallic acid was not identified [30]. Quercetin hexose and quercetin are detected in *J. oxycedrus* root bark from Algeria [24], however, quercetin was not detected in MJE and AJE.

The difference between the results reported previously and the current results may probably be influenced by genetic factors [34] and environmental conditions like sunlight, temperature and precipitation [35].

3.3. In vitro antioxidant activity

According to previous studies, it has been reported that the extracts from different parts (needles, berries and root bark) of *J. oxycedrus* possessed antioxidant effect. *In vitro* antioxidant activity results are summarized in Table 2.

Table 2. Phenolic compounds ($\mu\text{g/g}$ DE) identified in aqueous (AJE) and methanolic (MJE) extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* aerial parts collected from Mascara, western Algeria.

N°	Phenolic compounds	Rt (min)	AJE	MJE
1	Gallic acid	5.29	2747.97	1374.514
2	Chlorogenic acid	13.39	13737.44	19872.01
3	Vanillic acid	15.53	329.30	770.77
4	Caffeic acid	16.28	566.40	2161.58
5	p-Coumaric acid	23.82	1217.81	237.58
6	Vanillin	21.46	653.09	1067.96
7	Rutin	28.37	789.98	12078.10
8	Naringin	34.79	887.87	13950.33
9	Quercetin	45.05	ND	ND

Legend: AJE: *J. oxycedrus* aqueous extract, MJE: *J. oxycedrus* methanolic extract, Rt: Retention time (minute), ND: Not detected.

The phosphomolybdenum assay is a simple quantitative method to evaluate the total antioxidant capacity. It was determined by measuring the absorbance of the green phosphomolybdenum complex at 695 nm [36]. The total antioxidant capacity ranged from 195.73 mg GAE/g DW to 328.52 mg GAE/g DW for AJE and MJE respectively in comparison with ascorbic acid 374.08 GAE/g DW. The results obtained were comparatively higher than those obtained by Chaouche et al. [13] for the hydro-methanolic extracts (115.32 mg of GAE/g DW).

The DPPH assay is a simple and widely used method for testing the antioxidant activity in vitro. It is based on the ability of extracts to transfer electrons or H atoms to the free radical DPPH to become a stable molecule. Table 2 showed that the radical scavenging activity of *Juniperus oxycedrus* extracts increased in a dose-dependent manner suggesting that both extracts have greater antioxidant potential. MJE was found to be more active than AJE. IC_{50} values of the methanolic extract ($4.45 \pm 0.001 \mu\text{g/mL}$) were lower than ascorbic acid ($10.34 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$), indicating a strong ability of this extract to scavenge free radical DPPH. Although IC_{50} value of aqueous extract ($155.32 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$) was higher, the extract still showed good free radical scavenging activity. The IC_{50} value of MJE was lower compared to those reported by Chaouche et al. [13] for *J. oxycedrus* needle extracts with an IC_{50} $10.95 \mu\text{g/mL}$. In studies on the antioxidant activity of Moroccan and Turkish *J. oxycedrus* extracts [30, 33, 37], IC_{50} values obtained are much higher compared to our results.

In the aforementioned studies, methanolic extracts exhibited higher antioxidant properties than the aqueous extracts which is in accord with our results. This could be due to the difference in phenolic and flavonoid contents between the extracts. According to El Jemli et al. [37], extracts prepared to utilize a pure and aqueous organic solvent have a higher radical scavenging capacity. A strong correlation between antioxidant activity and total phenolic content has been proven. In addition, Krishnaveni et al. [38] suggested that free

radical scavenging activities of plants depend on the presence and the concentration of secondary metabolites. Moreover, Yang et al. [39] indicated that rutin is a powerful free radical inhibitor. More specifically, several flavonoid compounds such as catechol, quercetin, catechin, rutin and gallic acid contribute significantly to free radical reducing power [40, 41].

Table 3. DPPH* scavenging effect (percentage %), inhibition DPPH*concentration (IC50) values ($\mu\text{g/mL}$) and total antioxidant capacity of *J. oxycedrus* aqueous and methanolic extracts.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibition of DPPH*					IC50 _(DPPH) ($\mu\text{g/mL}$)	TAA (mg of GAE/g DW)
	31.25	62.5	125	250	500		
AJE	16.44	39.48	48.54	59.91	66.97	155.32 \pm 0.04 ^a	195.73 \pm 0.07 ^b
MJE	64.05	70.05	72.5	79.88	84.02	4.45 \pm 0.001 ^b	328.52 \pm 0.071 ^a
Ascorbic acid	56.84	66.67	68.36	72.81	78.49	10.34 \pm 0.008 ^b	374.08 \pm 0.18 ^a

Values were expressed as means \pm standard deviation of three separate experiments. Significant difference at ($p < 0.001$).

3.4. *In vitro* anti-inflammatory activity

The *in vitro* anti-inflammatory effect of *J. oxycedrus* was investigated by the egg albumin denaturation method. Table 3 shows a significant ($p < 0.001$) inhibitory effect on protein denaturation caused by the heat of Sample extracts and diclofenac sodium (reference drug) in a dose-dependent manner displayed at different concentrations.

The percent inhibition of albumin denaturation observed in MJE was important and comparable to diclofenac sodium (81.95 and 91.51% respectively at a concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$), whereas the aqueous extract (AJE) has shown the least inhibitory activity with 32.48% at the same concentration. The richness of MJE in phenolic compounds may explain its high ability to prevent thermal protein denaturation. In many previous studies, the anti-inflammatory properties could be related to the concentration of phytochemicals contained in plant extracts such as luteolin, rutin quercetin and to their antioxidant capacity [42, 43]. It is therefore expected that phytochemicals compounds such as alkaloids, saponins, phytosterols, tannins and flavonoids present in medicinal plants reduced inflammatory events [44]. Furthermore, Torres-Rêgo et al. [45] revealed that rutin and chlorogenic acid operate synergistically to suppress inflammatory processes.

In a study conducted by Moreno et al. [46], *J. oxycedrus* extracts prepared with methanol and dichloromethanol could partially antagonize the contractile response to histamine, serotonin and acetylcholine in a concentration-dependent manner. Therefore, the stem and leaves of the same plant significantly reduced edema induced by carrageenan in rat hind [47].

Table 4. *In vitro* anti-inflammatory activity of AJE, MJE and diclofenac sodium.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Percent inhibition (%)		
	Diclofenac	AJE	MJE
1000	91.51 \pm 0.025	32.48 \pm 0.027	81.95 \pm 0.03
500	61.99 \pm 0.017	23.35 \pm 0.011	62.85 \pm 0.002
250	46.49 \pm 0.012	3.82 \pm 0.01	49.89 \pm 0.016
125	24.2 \pm 0.016	1.69 \pm 0.15	43.31 \pm 0.006

Values were expressed as means \pm standard deviation of three separate experiments. Significant difference at ($p < 0.001$).

4. CONCLUSION

The results of the present study suggest that the aerial parts of *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* growing in Mascara, Algeria are rich in phenolic compounds. HPLC analyses identified eight phenolic compounds. Consequently, the methanolic extract exhibited the highest phenolic concentration which could explain its excellent antioxidant and anti-inflammatory activities *in vitro*. Therefore, these findings may justify the popular use of this species in traditional medicine and support their application as a natural antioxidant in the food industry and the development of phytopharmaceutical products with a critical role in resolving inflammatory troubles. Further investigations should be carried out to ensure the efficacy of this plant *in vivo*.

Authors' Contributions: SD, BM designed the study. SD performed the experiments. AR did the chromatographic identification. SD wrote the paper with input from of BM, KS and PS. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement: The authors would like to thank the Algerian ministry of high education and scientific research for support as well as the laboratory of Research Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety, University of Mustapha Stambouli Mascara for technical assistance. Special thanks extended to Mr. Righi Kada for identification of plant species and Mr. Louissi Abdelkader for the statistical analysis.

REFERENCES

1. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1992; 32(1): 67-103.
2. Buyukokuroglu ME, Gulcin I, Oktay M, Kufrevioglu OI. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol Res.* 2001; 44: 491-494.
3. Patel VR, Patel PR, Kajal SS. Antioxidant Activity of Some Selected Medicinal Plants in Western Region of India. *Adv Biol Res.* 2010; 4(1): 23-26.
4. Ghosh R, Alajvegovic A, Gomes AV. NSAIDs and cardiovascular diseases: Role of reactive oxygen species. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 536962.
5. Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflam Res.* 1995; 44: 1-10.
6. Oyedapo O, Akinpelu B, Akinwunmi K, Adeyinka M, Sipeolu F. Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *Int J Plant Physiol Biochem.* 2010; 2: 46-51.
7. Ferrero-Millani L, Nelsen OH, Anderson PS, Girardin SE. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 beta generation. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147 :227-235.
8. Wallace JL, Vong L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008; 9: 1151-1156.
9. Whitehouse MW. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: Reflections after 60 years. *Inflammopharmacology.* 2011; 19(1): 1-19.
10. De Angelis L. Brain tumors. *New Engl J Med.* 2001; 344: 114-123.
11. Živić N, Milošević S, Dekić V, Dekić B, Ristić N, Ristić M, et al. Phytochemical and antioxidant screening of some extracts of *Juniperus communis* L. and *Juniperus oxycedrus* L. *Czech J Food Sci.* 2019; 37: 351-358.
12. Mansouri N, Satrani B, Ghanmi M, Aafi A, El ghadraoui L, Farah A. Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie.* 2010; 8(3): 166-170.
13. Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, Atik-Bekara F. In vitro evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytothérapie.* 2013; 11: 244-249.

14. Sezik E, Yesilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T. Traditional medicine in Turkey. X. Folk medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol.* 2001; 75: 95-115.
15. Yesilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Goto K, Ikeshiro Y. Traditional medicine in Turkey. IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *J Ethnopharmacol.* 1993; 39: 31-38.
16. Honda G, Yesilada E, Tabata M, Sezik E, Fujita T, Takeda Y, et al. Traditional medicine in Turkey. VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Mugla, Aydın provinces. *J Ethnopharmacol.* 1996; 53: 75-87.
17. De Marino S, Festa C, Zollo F, Rusolo F, Capone F, Guerriero E, et al. Phytochemical profile of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berries: A new monoterpeneglucoside and evaluation of the effects on cancer cell lines. *Phytochem Lett.* 2014; 10: 152-159.
18. Al-Snafi A. Pharmacological and therapeutic effects of *Juniperus oxycedrus* – A Review. *Indo Am J Pharmac Sci.* 2018; 5: 2198-2205.
19. Eryilmaz M, Tosun A, Tumen I. Antimicrobial activity of some species from Pinaceae and Cupressaceae. *Turkish J Pharmac Sci.* 2016; 13: 35-40.
20. Bouhlal K, Meynadier JM, Peyron JL, Peyron L, Marion JP, Bonetti G, et al. Le cade en dermatology. *Parfums Cosmetiques Aromes.* 1988; 83: 73-82.
21. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Sengül M, Adıgüze A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol.* 2003; 85: 231-235.
22. Ismail A, Marjan ZM, Chin W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.* 2004; 87: 581-586.
23. Attia R, Messaoud C, Arraki K, Zedet A, Demougeot C, Boussaïd M, et al. Phytochemical screening and arginase inhibitory activity of extracts from several Tunisian medicinal plants. *South Afr J Bot.* 2019; 120: 313-318.
24. Chaouche TM, Haddouchi F, Atik-Bekara F, Ksouri R, Azzi R, Boucherit Z, et al. Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSn characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Indust Crops Prod.* 2015; 64: 182-187.
25. Mesbahi MA, Ouahrani MR, Rebiai A, Amara DG, Chouikh A. Characterization of *Zygophyllum album* L Monofloral Honey from El-Oued, Algeria. *Curr Nutr Food Sci.* 2019; 15: 476-483.
26. Agarwal M, Kumar A, Gupta R, Upadhyaya S. Extraction of Polyphenol, Flavonoid from *Embllica officinalis*, *Citrus limon*, *Cucumis sativus* and Evaluation of their Antioxidant Activity. *Oriental J Chem.* 2012; 28(2): 993-998.
27. Wannas WA, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, et al. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(5): 1362–1370.
28. Sen S, Chakraborty R, Maramsa N, Basak M, Deka S, Dey BK. In vitro anti-inflammatory activity of *Amaranthus caudatus* L. leaves. *Indian J Nat Prod Resour.* 2015; 6(4): 326-329.
29. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica* J. *Food Drug Anal.* 2014; 22: 296-302.
30. Ben Mrid R, Bouchmaa N, Bouargalne Y, Ramdan B, Karrouchi K, Kabach I. Phytochemical Characterization, Antioxidant and In Vitro Cytotoxic Activity Evaluation of *Juniperus oxycedrus* Subsp. *oxycedrus* Needles and Berries. *Molecules.* 2019; 24: 502.
31. Seca AML, Silva AMS. The chemical composition of the *Juniperus* genus (1970–2004). *Recent Progress Med Plants.* 2006; 16: 401-522.
32. Yaglioglu AS, Eser F. Screening of some *Juniperus* extracts for the phenolic compounds and their antiproliferative activities. *South Afr J Bot.* 2017; 113: 29-33.

33. Miceli N, Marino A, Köroğlu A, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, et al. Comparative study of the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts of five *Juniperus* L. (Cupressaceae) taxa growing in Turkey. *Nat Prod Res.* 2020; 34(11): 1636-1641.
34. Ebrahimzadeh MA, Pourmmodad F, Hafezi S. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turk J Biol.* 2008; 32(1): 43-49.
35. Engida AM, Kasim NS, Tsigie YA, Ismadji S, Huynh LH, Ju Y-H. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarangsemut (*Myrmecodia pendan*). *Indust Crops Prod.* 2013; 41: 392-396.
36. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999; 269(2): 337-341.
37. El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. Radical-scavenging activity and ferric reducing ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Adv Pharmacol Sci.* 2016; 2016: 6392656.
38. Krishnaveni M, Durairaj S, Madhiyan P, Amsavalli L, Chandrasekar R. In vitro free radical scavenging activity of aqueous leaf extract of plants near thermal power plant, Mettur, Salem. *Int J Pharmac Sci Res.* 2013; 4(9): 3659.
39. Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. *Food Sci Technol.* 2008; 41(6): 1060-1066.
40. Kessler M, Ubeaud G, Jung L. Anti-and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55(1): 131-142.
41. De Graft-Johnson J, Kolodziejczyk K, Krol M, Nowak P, Krol B, Nowak D. Ferric reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007; 100: 345-352.
42. Gunathilake KDPP, Ranaweera KKDS, Rupasinghe HP. In vitro anti-inflammatory properties of selected green leafy vegetables. *Biomedicines.* 2018; 6(4): 107.
43. Marrassini C, Peralta I, Anesini C. Comparative study of the polyphenol content-related anti-inflammatory and antioxidant activities of two *Urera aurantiaca* specimens from different geographical areas. *Chin Med.* 2018; 13(1): 1-12.
44. Oguntibeju OO. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *J Inflamm Res.* 2018; 11: 307.
45. Torres-Rêgo M, Furtado AA, Bitencourt MAO, Lima MCJDS, Andrade RCLCD, Azevedo EPD, et al. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complem Altern Med.* 2016; 16(1): 1-10.
46. Moreno L, Bello R, Beltran B, Calatayud S, Primo-Yúfera E, Esplugues J. Pharmacological screening of different *Juniperus oxycedrus* L. extracts. *Pharmacol Toxicol.* 1998; 82(2): 108-112.
47. Akkol EK, Güvenç A, Yesilada E. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J Ethnopharmacol.* 2009; 125(2): 330-336.